

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

NATHALIA FOGAÇA DOS SANTOS CROSARA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO NEROLIDOL E DE UM SURFACTANTE:
ASSOCIAÇÃO COM RIGIDEZ DE MEMBRANA EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*
E MACRÓFAGOS INFECTADOS.**

GOIÂNIA
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Nathalia Fogaça dos Santos Crosara

Título do trabalho: "ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO NEROLIDOL E DE UM SURFACTANTE: ASSOCIAÇÃO COM RIGIDEZ DE MEMBRANA EM LEISHMANIA AMAZONENSIS E MACRÓFAGOS INFECTADOS."

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 09/06/2025, às 20:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nathalia Fogaça Dos Santos Crosara, Discente**, em 10/06/2025, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5427979** e o código CRC **AD7A383A**.

Referência: Processo nº 23070.028101/2025-83

SEI nº 5427979

NATHALIA FOGAÇA DOS SANTOS CROSARA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO NEROLIDOL E DE UM SURFACTANTE:
ASSOCIAÇÃO COM RIGIDEZ DE MEMBRANA EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*
E MACRÓFAGOS INFECTADOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.
Coorientadora: Ellyêssa do Nascimento Borges.

GOIÂNIA
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Crosara, Nathalia Fogaça dos Santos
Atividade leishmanicida do nerolidol e de um surfactante:
associação com rigidez de membrana em *Leishmania amazonensis* e
macrófagos infectados. [manuscrito] / Nathalia Fogaça dos Santos
Crosara. - 2025.
78 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Alonso; co-orientadora Ellyêssa do
Nascimento Borges.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia,
2025.

Bibliografia.

Inclui fotografias, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Leishmania*. 2. Nerolidol. 3. Surfactante iônico. 4. Fluidez de
membrana. 5. Ressonância Paramagnética Eletrônica. I. Alonso, Antônio,
orient. II. Título.

CDU 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 06 dias do mês de junho do ano de 2025 iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO NEROLIDOL E DE UM SURFACTANTE: ASSOCIAÇÃO COM RIGIDEZ DE MEMBRANA EM LEISHMANIA AMAZONENSIS E MACRÓFAGOS INFECTADOS.”, de autoria de **Nathalia Fogaça dos Santos Crosara**, do curso de Farmácia, da Faculdade de Farmácia da UFG, coorientada pela Ma. Ellyêssa do Nascimento Borges - IF/UFG. Os trabalhos foram instalados pelo Prof. Dr. Antônio Alonso - IF/UFG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Dra. Cássia Alessandra Marquezin - IF/UFG e Prof. Dr. Kleber Santiago Freitas e Silva - ICF/UFG. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de (*dez*), tendo sido o TCC considerado (*aprovado*).

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 06/06/2025, às 16:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cassia Alessandra Marquezin, Professora do Magistério Superior**, em 08/06/2025, às 12:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kleber Santiago Freitas e Silva, Usuário Externo**, em 09/06/2025, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5398929** e o código CRC **6936519D**.

AGRADECIMENTOS

Levantarei os meus olhos para os montes; de onde vem o meu socorro? O meu socorro vem do Senhor, que fez o céu e a terra. Salmos 121:1–2

Antes de qualquer palavra, meu coração transborda gratidão a Deus. Foi Ele quem me sustentou nas noites difíceis onde havia muitas lágrimas e ansiedade, quem me deu forças nos dias em que pensei em desistir e quem me guiou, com sabedoria e propósito, ao longo de cada dia durante esses cinco anos. Sem sua presença, este trabalho e a faculdade jamais teriam sentido. A Ele, toda honra, toda glória e todo o meu louvor, pra sempre, amém!

Dedico este trabalho à memória da minha querida avó Diva Fogaça e meu Tio Ronie, que mesmo não estando mais entre nós, continuam sendo uma inspiração constante em minha vida. Agradeço por todo amor, pelos ensinamentos e pelo exemplo de dignidade e coragem que deixaram. Tenho certeza de que estariam orgulhosos de mim por esta conquista, é com o coração cheio de saudade e gratidão que deixo aqui esta singela homenagem.

Ao meu pai Alexandre Crosara, ao meu padrasto José Fábio e ao meu irmão João Arthur, deixo meu carinho e reconhecimento eternos, pela ajuda de sempre. À minha mãe, Janne Fogaça, minha eterna gratidão por ter sido meu alicerce em todos os momentos desta jornada. Mesmo diante das suas próprias dificuldades, você nunca deixou de estar ao meu lado, oferecendo apoio, amor e força, além de cuidar do meu filho quando eu mais precisei. Obrigada por ser uma mulher guerreira, dedicada e com o coração tão abençoador. Seus conselhos, gestos de apoio e palavras de incentivo foram fundamentais para que eu seguisse em frente. Você foi e sempre será minha base, minha inspiração e meu exemplo.

E em especial, ao meu esposo, Edivaldo Bento, e ao meu filho, Miguel Bento pois são minha razão de viver e agradeço a Deus por ter me dado vocês de presente. Nos dias em que o cansaço falava mais alto e a vontade de desistir era maior, foi o amor de vocês que me sustentou. Obrigada por serem minha motivação

sempre, por cada abraço tranquilizador e por acreditarem em mim mesmo quando nem eu mesma acreditava.

Quero também agradecer à minha tia Vanilda, que esteve sempre disposta a acolher minhas angústias, me oferecendo sempre palavras de conforto e cuidado, que se dispôs a sair da sua casa várias vezes para me ajudar. Seu carinho e seus conselhos me deram força nos momentos mais tristes, a senhora foi e sempre será um verdadeiro presente de Deus na minha caminhada.

Às minhas amigas e companheiras de jornada, Maria Cláudia e Ellyêssa Borges, meu sincero reconhecimento. Maria, sua amizade trouxe leveza e alegria a esta caminhada, nos momentos de tensão e conquistas, você esteve comigo me apoiando e ajudando. Ellyêssa, você foi mais que co-orientadora, foi amiga generosa e cuidadosa. Sua atenção, seu cuidado e sua paciência (mesmo quando não me respondia, risos) fizeram toda a diferença. Levo vocês no coração, hoje e sempre. São amigas mais chegadas irmãs!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Alonso, sou imensamente grata pelo acolhimento, pelo respeito e pela paciência. Sua clareza, sua dedicação e sua disposição em esclarecer cada dúvida foram um verdadeiro presente de Deus na reta final deste curso. Agradeço por ter sido mais do que um orientador, um anjo enviado por Deus.

Por fim, à Universidade Federal de Goiás, em especial à Faculdade de Farmácia e ao Instituto de Física, registro meu sincero agradecimento. Cada aula, cada orientação e cada ensinamento dos professores contribuíram de forma essencial para a minha formação acadêmica e pessoal. Sou grata por ter crescido em um ambiente de excelência e por levar comigo os aprendizados que aqui conquistei.

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO NEROLIDOL E DE UM SURFACTANTE: ASSOCIAÇÃO COM RIGIDEZ DE MEMBRANA EM LEISHMANIA AMAZONENSIS E MACRÓFAGOS INFECTADOS.

Fogaça, N. S.C¹.; Alonso, A.²

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás

²Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás

RESUMO

A leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada que afeta milhões de pessoas, especialmente em regiões tropicais como o Brasil. Transmitida por flebotomíneos, os tratamentos atualmente disponíveis apresentam limitações importantes, como alta toxicidade, alto custo e aumento da resistência do parasita. Diante desse cenário, foram investigados os efeitos leishmanicidas do nerolidol, um sesquiterpeno natural, e do surfactante zwitteriônico HPS (N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato) contra *Leishmania amazonensis*. Por meio da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) de marcadores de spin, constatou-se que ambos os compostos alteraram a fluidez da membrana plasmática do parasita, promovendo um aumento inicial seguido de rigidez após 24 h de exposição. Os valores de IC₅₀ foram estimados em aproximadamente ~74 µM para o nerolidol e ~10 µM para o HPS. Em concentrações que variaram de uma a três vezes seus respectivos valores de IC₅₀, induziram significativa rigidez de membrana, atribuída à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), com consequente peroxidação lipídica e/ou oxidação protéica. Em macrófagos J774A.1 não infectados, não foi observado enrijecimento de membrana, possivelmente devido à ação protetora do óxido nítrico endógeno, capaz de neutralizar o estresse oxidativo. Por outro lado, em macrófagos previamente infectados com *Leishmania*, houve aumento da rigidez de membrana após 72 h de tratamento, sugerindo que a infecção sensibiliza essas células ao dano oxidativo. Para complementar a avaliação da seletividade e segurança dos compostos, também foi analisada sua citotoxicidade em macrófagos diferenciados da linhagem celular THP-1, modelo mais representativo do sistema imune humano. Nessa abordagem, observou-se que os valores médios de CC₅₀ foram aproximadamente nove vezes maiores que os observados em células J774A.1, indicando menor toxicidade em um modelo de maior relevância fisiológica e reforçando o perfil seletivo dos compostos para o parasita. Os dados obtidos indicam que a atividade antileishmania do nerolidol e do HPS está fortemente associada à sua ação direta na membrana plasmática do parasita. O aumento inicial da fluidez pode favorecer o vazamento iônico e a despolarização da membrana celular, causando hiperpolarização mitocondrial e aumento da produção de EROs, que desencadeia uma sequência de eventos, incluindo a rigidez de membrana, resultando em danos estruturais irreversíveis e morte do parasita.

Palavras-chave: Leishmania; neroldol; surfactante iônico; fluidez de membrana; ressonância paramagnética eletrônica.

Leishmanicidal Activity of Nerolidol and a Surfactant: Association with Membrane Rigidity in *Leishmania amazonensis* and Infected Macrophages.

Fogaça, N. S.C¹.; Alonso, A.²

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás

²Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás

Abstract

Leishmaniasis is a neglected parasitic disease that affects millions of people, especially in tropical regions such as Brazil. Transmitted by sand flies, currently available treatments have important limitations, such as high toxicity, high cost and increased parasite resistance. In view of this scenario, the leishmanicidal effects of nerolidol, a natural sesquiterpene, and the zwitterionic surfactant HPS (N-hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonium-1-propanesulfonate) against *Leishmania amazonensis* were investigated. Using the electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of spin labeling, it was found that both compounds altered the fluidity of the parasite's plasma membrane, promoting an initial increase followed by rigidity after 24 h of exposure. IC₅₀ values were estimated at approximately 74 µM for nerolidol and 10 µM for HPS. At concentrations ranging from one to three times their respective IC₅₀ values, they induced significant membrane stiffness, attributed to the formation of reactive oxygen species (ROS), with consequent lipid peroxidation and/or protein oxidation. In uninfected J774A.1 macrophages, no membrane stiffening was observed, possibly due to the protective action of endogenous nitric oxide, capable of neutralizing oxidative stress. On the other hand, in macrophages previously infected with *Leishmania*, there was an increase in membrane stiffness after 72 h of treatment, suggesting that the infection sensitizes these cells to oxidative damage. To complement the evaluation of the selectivity and safety of the compounds, their cytotoxicity in macrophages derived from the THP-1 cell line, a more representative model of the human immune system in a state of differentiation, was also analyzed. In this approach, it was observed that the mean CC₅₀ values were approximately nine times higher than those recorded in J774A.1 cells, indicating lower toxicity in a model of greater physiological relevance and reinforcing the selective profile of the compounds for the parasite. The data obtained indicate that the antileishmanial activity of nerolidol and HPS is strongly associated with their direct action on the parasite's plasma membrane. The initial increase in fluidity may favor ionic leakage and depolarization of the cell membrane, causing mitochondrial hyperpolarization and increased ROS production, which triggers a sequence of events, including membrane rigidification, resulting in irreversible structural damage and death of the parasite.

Keywords: Leishmania; nerolidol; ionic surfactant; membrane fluidity; electron paramagnetic resonance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Imagem do vetor da Leishmaniose conhecido popularmente como mosquito-palha, tatuquira e birigui. Esse pequeno inseto mede cerca de 2 a 3 milímetros e pertence ao grupo dos flebotomíneos, gênero *Lutzomyia* nas Américas. Esses insetos costumam voar curtas distâncias, de forma silenciosa, e são mais ativos no final da tarde e à noite, preferindo áreas úmidas e com pouca luz..... 16
- Figura 2- Imagem das duas morfologias da parasita *Leishmania*: (A) Amastigota: forma intracelular, arredondada e sem flagelo, adaptada ao ambiente ácido dos macrófagos. (B) Promastigota: forma alongada e flagelada, presente no vetor. Ambas apresentam membrana plasmática rica em lipídios, alvo de compostos como nerolidol e HPS. Esses agentes lipofílicos interagem com a membrana do parasita, promovendo desorganização estrutural, perda de integridade e comprometimento de funções vitais, resultando em morte celular. A forma promastigota tende a ser mais sensível devido à exposição direta ao meio externo..... 17
- Figura 3- Imagem do ciclo completo *Leishmania* ssp. Destacando as formas promastigota (no vetor) e amastigota (no hospedeiro). A infecção inicia com a inoculação de promastigotas na pele humana durante a alimentação sanguínea do flebotomíneo. Dentro dos macrófagos, os parasitas se transformam em amastigotas e se multiplicam. A infecção continua com a ingestão dessas formas pelo vetor, onde completam o ciclo no intestino. Compostos como nerolidol e HPS atuam sobre as membranas das formas promastigota e amastigota, promovendo desorganização estrutural, disfunção mitocondrial e morte do parasita, interferindo em etapas críticas do ciclo..... 19
- Figura 4- Manifestações clínicas da leishmaniose: (A) Leishmaniose cutânea (LC): lesão ulcerada localizada, forma mais comum da doença; (B) Leishmaniose disseminada (LD): múltiplas lesões cutâneas em diferentes partes do corpo; (C–F) Leishmaniose cutânea difusa (LCD): lesões nodulares, não ulceradas, de difícil tratamento e com ampla disseminação tegumentar; (G) Leishmaniose mucocutânea (LMC): lesões destrutivas que acometem mucosas nasal, oral e faringe, podendo provocar deformidades graves..... 23
- Figura 5- Evolução temporal do número de casos de leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas ao longo dos anos. Os dados apresentados permitem observar variações no padrão de ocorrência, identificar períodos de aumento ou redução de casos..... 24
- Figura 6- Imagem do painel de controle com dados sobre os novos casos de leishmaniose tegumentar e visceral no Brasil. A imagem reúne informações distribuídas por ano e localidade, permitindo visualizar o comportamento da doença em diferentes regiões do país. O painel destaca a ocorrência das duas formas clínicas, facilitando o monitoramento epidemiológico, a detecção de áreas com maior concentração de casos e o apoio à tomada de decisão em ações de vigilância e controle..... 25
- Figura 7- Manifestação clínica da leishmaniose visceral (LV), caracterizada por sinais

como cansaço extremo e aumento do fígado e do baço. Essas alterações refletem a ação sistêmica do parasita no organismo e a resposta imunológica desencadeada pela infecção.....	26
Figura 8- Representação das estruturas moleculares dos principais antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da leishmaniose: (A) antimoniato de meglumina e (B) estibogluconato de sódio.....	29
Figura 9- Representação das estruturas moleculares da anfotericina B (C) e da pentamidina (D), destacando suas características químicas relevantes para a atividade leishmanicida.....	31
Figura 10- Estruturas moleculares da miltefosina (E) e da paromomicina (F), evidenciando suas principais características químicas relacionadas ao uso no tratamento da leishmaniose.....	33
Figura 11- Representação da estrutura molecular do nerolidol, um composto terpênico de cadeia longa com propriedades lipofílicas. Sua conformação química permite a interação com membranas celulares, o que contribui para sua atividade biológica, incluindo efeitos antiparasitários observados em <i>Leishmania</i> spp.....	35
Figura 12- Ilustração das estruturas químicas dos quatro isômeros estereoisoméricos do nerolidol, abrangendo os enantiômeros de cada uma de suas formas geométricas (cis e trans).....	36
Figura 13- Imagem da estrutura molecular do HPS, composto sintético com potencial atividade leishmanicida. Sua configuração química sugere capacidade de interação com componentes da membrana celular do parasita, contribuindo para a desestabilização estrutural e ação citotóxica observada em estudos experimentais....	40
Figura 14- Imagem obtida no espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) do Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da UFG. O equipamento é utilizado para a detecção e análise de espécies paramagnéticas, permitindo a investigação de processos oxidativos, radicais livres e interações moleculares em amostras biológicas e químicas.....	42
Figura 15- Diagrama de bloco ilustrando os principais componentes e o funcionamento do espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). O esquema destaca elementos como a fonte de micro-ondas, cavidade ressonante, sistema de detecção e controle de campo magnético, essenciais para a identificação de espécies paramagnéticas em amostras químicas e biológicas.....	43
Figura 16- Avaliação da toxicidade celular em macrófagos derivados da linhagem THP-1 após exposição a diferentes tratamentos. A análise foi realizada para verificar os efeitos citotóxicos nos modelos celulares, contribuindo para a determinação da seletividade e segurança dos compostos testados.....	49
Figura 17- Etapas da análise por RPE realizada em promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e macrófagos, visando detectar e quantificar espécies paramagnéticas associadas ao estresse oxidativo. A técnica permite comparar o perfil de radicais livres gerados nas diferentes células, contribuindo para o entendimento dos efeitos induzidos pelo nerolidol e HPS.....	51

Figura 18- Etapas da análise por RPE de macrófagos infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> , com o objetivo de detectar alterações no perfil de radicais livres associadas ao estresse oxidativo induzido pela exposição ao nerolidol e HPS.....	52
Figura 19- Espectros de RPE do marcador 5-DSA nas amostras de promastigotas <i>L. amazonensis</i> tratadas com nerolidol (NER) e HPS, indicando alterações na mobilidade da membrana plasmática.....	56
Figura 20- Espectros de RPE do 5-DSA mostram reduções na fluidez de membrana de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos J774A.1 após tratamento com HPS ou nerolidol (NER). Os valores de $2A//$ diminuíram com a adição dos compostos em mais alta concentração.....	59
Figura 21- Espectros de RPE do 5-DSA mostraram aumentos na rigidez das membranas em macrófagos infectados por <i>Leishmania</i> após 72 h de tratamento com nerolidol e HPS, indicados pelo aumento no parâmetro $2A//$. Em parte dos experimentos observou-se aumento na rigidez de membrana mesmo na ausência de tratamento, como indicado pelo espectro de RPE do grupo controle oxidado.....	62
Figura 22- Ilustração esquemática que demonstra a ação do nerolidol e HPS causando aumento da fluidez da membrana em <i>L. amazonensis</i> , promovendo vazamento iônico, despolarização plasmática, hiperpolarização mitocondrial e acúmulo de EROs que oxidam a membrana em até 24 h.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela com os principais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose, incluindo informações sobre sua via de administração, dosagens, efeitos adversos (EAs), vantagens e desvantagens.....	27
Tabela 2- Avaliação da atividade antiproliferativa do nerolidol e HPS contra formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> , bem como da citotoxicidade em macrófagos da linhagem J774A.1 e derivados da THP-1 após 24 h de exposição – Brasil, 2019-2025.....	54

SUMÁRIO

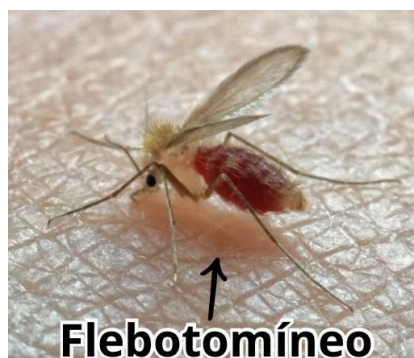
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Ciclo de transmissão da Leishmaniose.....	15
1.2 Epidemiologia e manifestações clínicas da Leishmaniose.....	19
1.3 Tratamento Farmacológico.....	25
1.4 Nerolidol.....	33
1.5 Surfactante HPS.....	37
1.6 Espectroscopia de RPE.....	41
1.7 Justificativa.....	44
2 OBJETIVO.....	45
2.1 Objetivo Geral.....	45
2.2 Objetivo Específico.....	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1 Substâncias químicas.....	46
3.2. Cultura de Parasitas e de macrófagos.....	46
3.3 Análise da toxicidade celular em macrófagos diferenciados da linhagem THP-1.....	47
3.4 Análise por RPE de promastigotas, macrófagos e macrófagos infectados por Leishmania.....	48
3.5 Análise Estatística.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
4.1 Efeitos antiproliferativos e citotóxicos do HPS e do nerolidol.....	52
4.2 Nerolidol e HPS promovem aumento da rigidez da membrana em parasitas do gênero Leishmania.....	54
4.3 O efeito inicial do nerolidol e HPS e suas mudanças na fluidez da membrana de Leishmania.....	56
4.4 Nerolidol e HPS não promoveram aumento na rigidez de membrana em macrófagos J774A.1 não infectados.....	57
4.5 O aumento da rigidez de membrana em Leishmania após tratamento com nerolidol e HPS pode estar associado a alterações induzidas por estresse oxidativo.....	58
4.6 Efeitos de nerolidol e HPS na rigidez de membrana de macrófagos infectados por Leishmania.....	60
4.7 Mecanismos de ação do nerolidol e HPS.....	63
5 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo de transmissão da Leishmaniose

O flebotomíneo, popularmente conhecido como mosquito-palha, tatuquira ou birigui, é um inseto hematófago que está associado a transmissão da leishmaniose, uma vez que a fêmea infectada atua como principal vetor da doença (MAROLI *et al.*, 2013). Esses insetos são pequenos, de corpos finos, cobertos por pelos finos, e variam em cor entre amarelo e marrom, como mostrado na Figura 1. Suas asas são longas e estreitas, e ficam eretas quando a fêmea está descansando. A cabeça é grande em relação ao corpo e contém olhos compostos proeminentes e peças bucais especializadas para sugar sangue, uma característica adaptativa exclusiva das fêmeas, que precisam de sangue para garantir o desenvolvimento de seus ovos (MARCONDES; LOZOVEI; EUNICE, 1998). A leishmaniose é provocada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania spp.* que apresenta um ciclo de vida digenético, envolvendo um hospedeiro mamífero e um inseto vetor (STEVERDING, 2017).

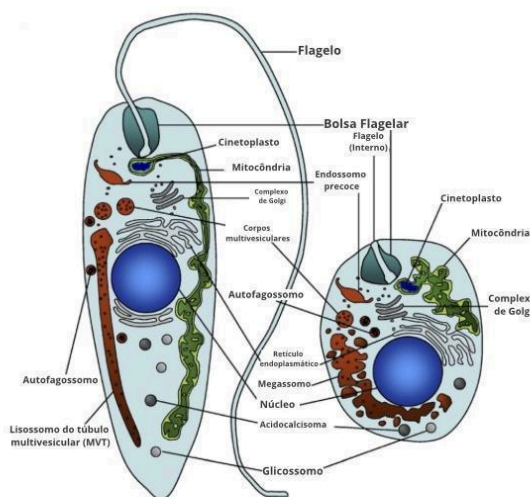
Figura 1- Imagem do vetor da Leishmaniose conhecido popularmente como mosquito-palha, tatuquira e birigui. Esse pequeno inseto mede cerca de 2 a 3 milímetros e pertence ao grupo dos flebotomíneos, gênero *Lutzomyia* nas Américas. Esses insetos costumam voar curtas distâncias, de forma silenciosa, e são mais ativos no final da tarde e à noite, preferindo áreas úmidas e com pouca luz.



Fonte: Adaptado de DOUGLAS (2024).

A *Leishmania* ssp. apresenta duas morfologias celulares distintas, sendo a morfologia promastigota encontrada no flebotomíneo e a morfologia amastigota no hospedeiro mamífero incluindo humanos, cães, roedores, tatus, gambás, raposas, entre outros (Fig.2) (SUNTER & GAIVOTA, 2017). A forma promastigota é alongada e caracterizada pela presença de um flagelo longo e externo, que se origina na região anterior das células. Esse flagelo desempenha um papel essencial na locomoção e fixação e, mais recentemente, foi reconhecido por suas funções sensoriais e secretora. Já nos amastigotas, o flagelo é encurtado, mal emergindo da bolsa flagelar tornando-se imóvel (LANDFEAR, 2022).

Figura 2- Imagem das duas morfologias da parasita *Leishmania*: (A) Amastigota: forma intracelular, arredondada e sem flagelo, adaptada ao ambiente ácido dos macrófagos. (B) Promastigota: forma alongada e flagelada, presente no vetor. Ambas apresentam membrana plasmática rica em lipídios, alvo de compostos como nerolidol e HPS. Esses agentes lipofílicos interagem com a membrana do parasita, promovendo desorganização estrutural, perda de integridade e comprometimento de funções vitais, resultando em morte celular. A forma promastigota tende a ser mais sensível devido à exposição direta ao meio externo.

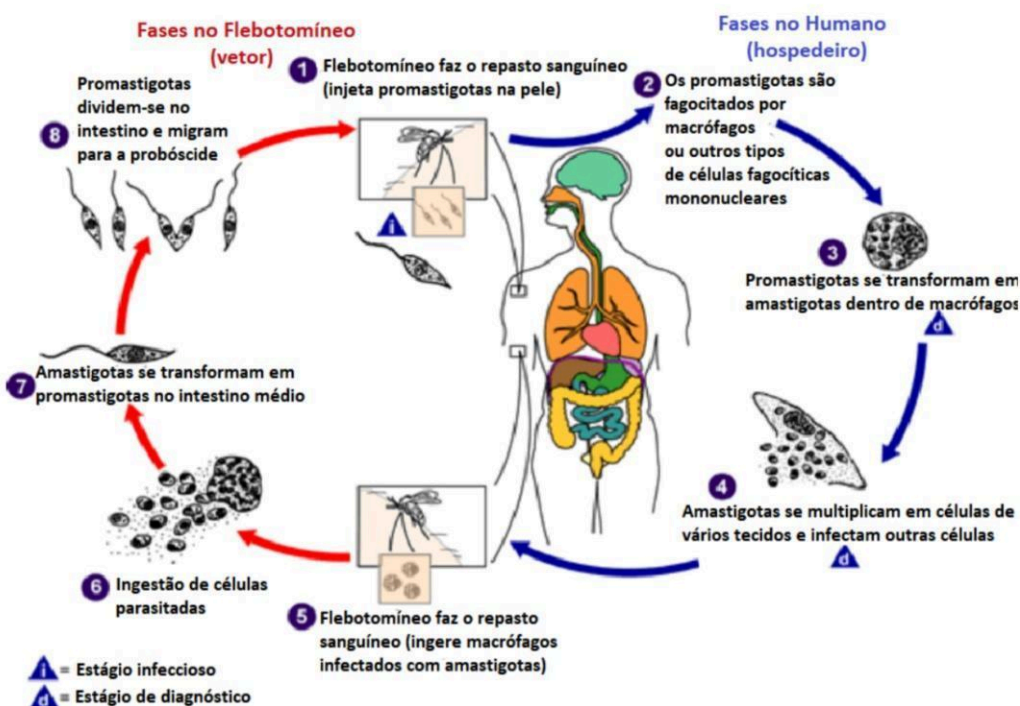


Fonte: Adaptado de LANDFEAR (2022).

O ciclo da leishmaniose começa quando a fêmea do mosquito transmissor se alimenta do sangue de um hospedeiro que já carrega o parasita, podendo ser uma pessoa ou um animal. Ao picar esse hospedeiro, o mosquito acaba ingerindo os

parasitas, que estão circulando no sangue na forma amastigota (Fig. 3). No trato digestivo do mosquito, esses parasitas passam por uma transformação, assumindo a forma promastigota. Em seguida, migram para as glândulas salivares do inseto, onde permanecem até a próxima picada, prontos para serem transmitidos a outro organismo (LAZAR & ABASS, 2020; CDC, 2020). Quando o mosquito volta a picar, agora um novo hospedeiro, ele introduz os promastigotas na pele. Esses parasitas logo entram em contato com o sistema imunológico do indivíduo e são englobados por células de defesa, como os macrófagos (CDC, 2020; EFSTATHIOU & SMIRLIS, 2021). Uma vez no interior dessas células, os promastigotas transformam-se novamente em amastigotas, uma forma adaptada para sobreviver dentro dos fagolisossomos, que são estruturas com ambiente ácido. É neste momento que os parasitas começam a se multiplicar, rompe as células infectadas e se espalham por diferentes partes do corpo, como o fígado, o baço e a medula óssea. Esse processo desencadeia uma resposta inflamatória e compromete o funcionamento do sistema imunológico, contribuindo para a progressão da infecção e o desenvolvimento da leishmaniose (CDC, 2020).

Figura 3- Imagem do ciclo completo *Leishmania* ssp. Destacando as formas promastigota (no vetor) e amastigota (no hospedeiro). A infecção inicia com a inoculação de promastigotas na pele humana durante a alimentação sanguínea do flebotomíneo. Dentro dos macrófagos, os parasitas se transformam em amastigotas e se multiplicam. A infecção continua com a ingestão dessas formas pelo vetor, onde completam o ciclo no intestino. Compostos como nerolidol e HPS atuam sobre as membranas das formas promastigota e amastigota, promovendo desorganização estrutural, disfunção mitocondrial e morte do parasita, interferindo em etapas críticas do ciclo.



Fonte: Adaptado CDC (2020)

Compreender os ciclos de transmissão é fundamental para a prevenção eficaz da leishmaniose, pois permite o desenvolvimento de estratégias mais precisas e adequadas às particularidades de cada região. A transmissão da doença é indireta, mediada por vetores, ou seja, não ocorre diretamente de pessoa para pessoa. Dependendo das características do parasita, das espécies de flebotomíneos, das condições ambientais do local de transmissão, bem como da exposição prévia e atual das pessoas ao parasita e seus comportamentos, a transmissão das espécies de *Leishmania* pode ser zoonótica

(animal-flebotomíneos-humano) ou antroponótica (humano-flebotomíneo-humano) (AWAB, 2023).

1.2 Epidemiologia e manifestações clínicas da Leishmaniose.

As contínuas transformações climáticas e urbanas estão entre os principais fatores que favorecem o surgimento e a disseminação de doenças, uma vez que intensificam a interação entre humanos e a vida selvagem. Esse processo contribui para a degradação ambiental e alterações nos ecossistemas, aumentando a exposição das populações a áreas de circulação dos agentes patogênicos (MARTINS *et al.*, 2021; MANN *et al.*, 2021). Outros fatores, como a mobilidade populacional, desnutrição e condições socioeconômicas desempenham um papel significativo na propagação de doenças infecciosas, especialmente quando muitas pessoas não são imunes e mudam para áreas com alta transmissão (WHO, 2023).

A leishmaniose é uma doença sensível ao clima, pois os patógenos, vetores e hospedeiros envolvidos em seu ciclo de transmissão são influenciados por fatores ambientais. Mudanças climáticas e alterações causadas pela atividade humana nos ecossistemas afetam diretamente a dinâmica da doença. Variações nos ambientes ecológicos, nos níveis de variação, na temperatura e na umidade podem causar flutuações na população de flebotomíneos. Essas mudanças impactam o ritmo de desenvolvimento e o metabolismo dos vetores, além do ciclo de vida da *Leishmania* dentro do vetor (AWAB, 2023).

Considerada uma doença tropical negligenciada, a leishmaniose impactou desproporcionalmente as populações mais vulneráveis, em mais de 90 países situados nos trópicos, subtropicais e no sul da Europa (CDC, 2020). A leishmaniose, por sua vez, não é uma condição única e isolada, mas faz parte de um contexto maior das doenças infecciosas negligenciadas (DINs), que englobam um conjunto de doenças de origem infecciosa (OPAS, 2024).

As doenças infecciosas negligenciadas são caracterizadas por duas questões fundamentais. Primeiramente, elas não têm recebido a atenção necessária, o que se

reflete na escassez de recursos financeiros, técnicos e humanos dedicados ao seu enfrentamento e controle. Em segundo lugar, essas doenças estão intimamente relacionadas à pobreza e à marginalização social, afetando principalmente populações que vivem em condições precárias e sem acesso adequado a cuidados médicos, saneamento básico ou educação em saúde. A negligência e a falta de investimento nas DINs agravam ainda mais a situação das comunidades vulneráveis, perpetuando um ciclo de desigualdade e sofrimento (OPAS, 2024).

Em 2024, foi emitido um Plano de Ação para fortalecer a vigilância e o controle das leishmanioses nas Américas (2023–2030), com o objetivo de reduzir a incidência da doença e mitigar seus impactos nas populações afetadas. As medidas sugeridas no plano foram formuladas a partir de um diagnóstico detalhado da situação epidemiológica e operacional na região, o que permitiu a definição de metas claras e indicadores específicos para monitorar os processos, dados epidemiológicos e operacionais relacionados à doença. Além disso, foram estabelecidas as linhas de base essenciais para acompanhar o progresso ao longo do tempo, garantindo a avaliação contínua e a implementação de ajustes necessários. O intuito é não apenas melhorar a capacidade de resposta às leishmanioses, mas também promover avanços tangíveis na redução da carga da doença, com foco em ações coordenadas entre os países da região e com a participação ativa das comunidades afetadas (OPAS, 2024).

Uma comparação dos dados de 2023 com os do ano anterior revelou uma redução geral de 8% nos casos notificados de leishmaniose, com diminuições registradas em todos os países da região, exceto na Argentina (15%), Costa Rica (36%), Equador (18%), Guiana (100%), México (11%) e Suriname (40%), onde houve aumento no número de casos em 2023 (OPAS, 2024). Essa variação na incidência da doença reflete a complexidade da leishmaniose e a necessidade de abordagens diferenciadas, adaptadas a cada contexto nacional. O plano de ação proposto, portanto, busca ser uma ferramenta essencial para enfrentar os desafios locais e regionais, promovendo avanços significativos na redução da carga da doença e no fortalecimento das respostas nacionais. A implementação eficaz e o

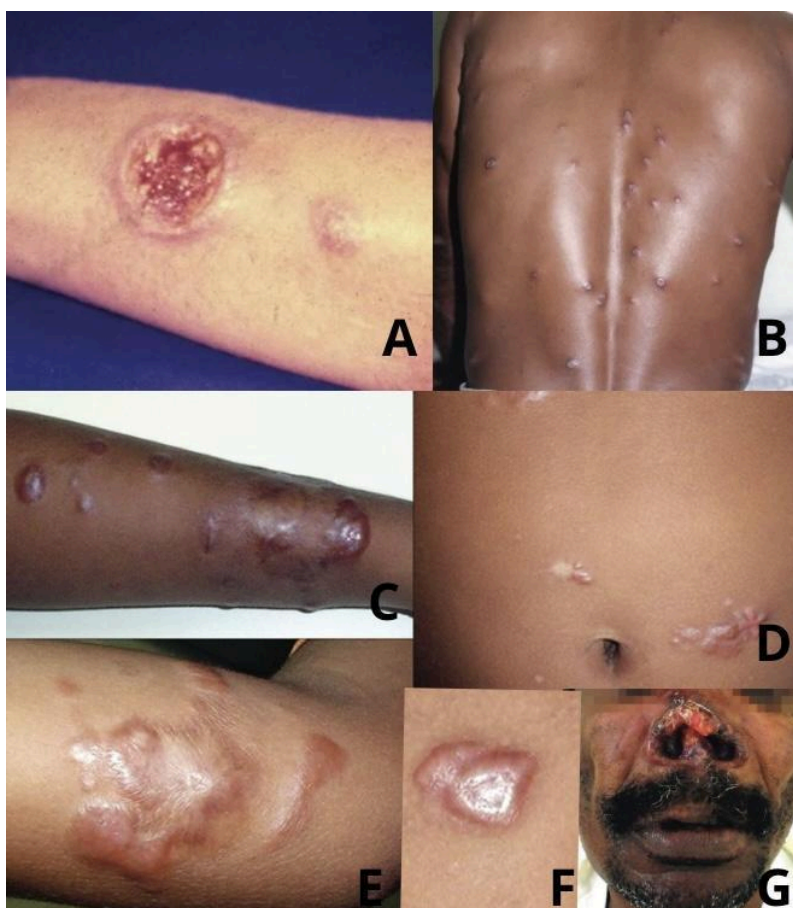
acompanhamento contínuo dos dados, com adaptações nas estratégias conforme necessário, são cruciais para atingir os objetivos estabelecidos para 2030. No entanto, apesar dos progressos no controle da doença, ainda existem países com altos números de casos, como Brasil sendo o primeiro, Colômbia, Peru e Nicarágua com os maiores índices de incidência da doença, representando, juntos, 78,5% dos casos registrados durante esse período continuando a representar desafios significativos no combate à leishmaniose (OPAS, 2024).

A leishmaniose apresenta diversas manifestações clínicas, que podem variar em gravidade e localização, sendo classificadas em três formas principais: cutânea, mucosa e visceral (OPAS, 2020). Cada uma dessas formas possui características distintas, podendo levar a complicações severas dependendo do estágio e da resposta imunológica do paciente. Fatores como o tempo de evolução da infecção e a eficácia do tratamento influenciam diretamente no prognóstico da doença.

A leishmaniose cutânea (LC) é uma manifestação comum da doença, caracterizada pelo surgimento de úlceras na pele, frequentemente associadas a lesões satélites ou linfangite nodular (Fig. 4A). Além das úlceras, as lesões podem se multiplicar, e em alguns casos, evoluir para formas mais graves, comprometendo tecidos mais profundos e resultando em deformidades permanentes (OPAS, 2022). Essa forma de leishmaniose é causada por mais de 15 espécies distintas de *Leishmania*. Na América Central e do Sul, as espécies mais prevalentes incluem *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania (Viannia) Naiffi*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* (DE VRIES & SCHALLIN, 2022). Juntamente com a forma cutânea clássica, existem outras formas clínicas mais complexas e difíceis de tratar, como a leishmaniose cutânea disseminada e a cutânea difusa. A forma disseminada (LD) é frequentemente associada à *Leishmania braziliensis* e caracteriza-se por múltiplas lesões cutâneas que se espalham por várias partes do corpo, sendo difícil de controlar e sujeita a recidivas (Fig. 4B). Já a forma cutânea difusa (LCD), é provocada principalmente por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania mexicana*, que apresentam lesões de difícil cicatrização, com um padrão crônico e também marcada por recaídas frequentes

(Fig. 4C-F) (OPAS, 2022). Essas formas da doença exigem tratamentos mais intensivos e prolongados, além de um acompanhamento rigoroso devido à possibilidade de complicações e à resistência a terapias convencionais.

Figura 4- Manifestações clínicas da leishmaniose: (A) Leishmaniose cutânea (LC): lesão ulcerada localizada, forma mais comum da doença; (B) Leishmaniose disseminada (LD): múltiplas lesões cutâneas em diferentes partes do corpo; (C–F) Leishmaniose cutânea difusa (LCD): lesões nodulares, não ulceradas, de difícil tratamento e com ampla disseminação tegumentar; (G) Leishmaniose mucocutânea (LMC): lesões destrutivas que acometem mucosas nasal, oral e faríngea, podendo provocar deformidades graves.



Fonte: Adaptado DE AZEREDO-COUTINHO & MENDONÇA, (2014).

A leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LM) é uma forma grave da doença, caracterizada por danos significativos nas mucosas do trato respiratório superior, afetando estruturas como as narinas, a cavidade oral, a faríngea e a laringe (Fig. 4G). Esses danos podem comprometer a função dessas áreas, dificultando a respiração,

a deglutição e a fala (MONACHESI, SILVA & FILIPE, 2023). O comprometimento das mucosas pode ocorrer simultaneamente com o envolvimento cutâneo ou, em alguns casos, desenvolver-se após a cicatrização das lesões cutâneas, com o surgimento dos sintomas podendo ocorrer até um ano após a resolução das lesões na pele (GRANADO *et al.*, 2021). A leishmaniose mucosa está principalmente associada à *Leishmania braziliensis*, embora também possa ser causada por outras espécies, como *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis*, sendo uma complicação grave e debilitante que exige tratamento médico imediato para prevenir sequelas permanentes e melhorar a qualidade de vida do paciente (GRANADO *et al.*, 2021).

Figura 5- Evolução temporal do número de casos de leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas ao longo dos anos. Os dados apresentados permitem observar variações no padrão de ocorrência, identificar períodos de aumento ou redução de casos.

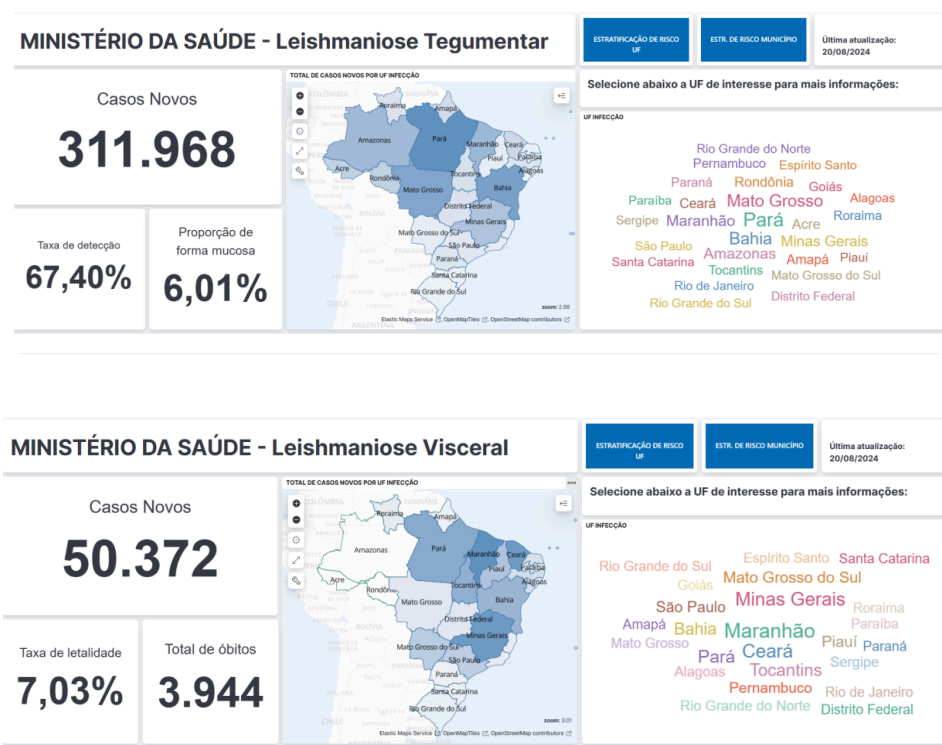
Leishmaniose cutânea											
	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Região das Américas	50 163	51 491	46 074	49 165	49 959	46 041	41 617	39 705	37 786	37 937	34 954
Argentina	90	138	334	241	306	303	241	182	337	117	135
Bolívia (Estado Plurinacional da)	2016	1683	2231	2222	2283	3127	2052	2059	2166	2197	2097
Brasil	18 226	20 418	19 395	12 690	17 526	16 432	15 484	16 432	15 023	12 878	12 910
Colômbia	9353	11 586	7541	10 966	7764	6362	5907	6161	6175	5685	4898
Costa Rica	1950	2150	1171	1148	2224	1247	601	528	563	492	668
El Salvador	873	1175	1479	1197	1632	1237	1104	1047	1251	875	1036
Equador	16	29	20	13	44	50	230	39	50	39	23
Guatemala	664	258	562	835	775	1044	1167	1121	836	1134	869
Guiana	4	64	132	396	21	27	19	12	3	5	10
Honduras	2074	1936	2040	2671	1854	1636	1985	1467	1119	1580	1194
México	970	418	479	447	842	576	1014	324	520	1281	1422
Nicarágua	3035	1649	1925	5423	4343	3722	3321	3443	1251	2423	1532
Panamá	1762	1581	930	1198	1164	1143	920	938	1286	1339	1294
Paraguai	162	124	122	135	92	84	52	54	53	59	56
Peru	6948	6231	5459	7271	6631	6321	5349	4178	5201	5756	5204
Suriname	382	390	241	255	132	118	130	122	144	47	66
Venezuela (República Bolivariana da)	1638	1661	2013	2057	2326	2612	2041	1598	1808	2030	1540

Fonte: Adaptado OPAS- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmanioses: informe epidemiológico da Região das Américas. N°13, dezembro de 2024. Washington, D.C.: OPS; 2024. Disponível em: [hps://iris.paho.org/handle/10665.2/51742](https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742). Acesso em: 13 mar. 2025

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), entre os anos de 2001 e 2023, foram reportados por 17 países da região cerca de 1.105.545 casos de LC e LM, o que corresponde a uma média anual de aproximadamente

52.645 novos casos (Tab 1.) (OPAS, 2024). Esses dados não apenas refletem a alta prevalência dessas doenças, mas também evidenciam a necessidade urgente de reforçar as estratégias de controle e prevenção na região. Em 2024, o Ministério da Saúde (MS) implantou painéis de monitoramento para acompanhar a situação epidemiológica das duas principais formas de leishmaniose no Brasil: a tegumentar (cutânea) e a visceral (Fig. 5)(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). Essas ferramentas foram desenvolvidas para fornecer dados atualizados, e melhorar a resposta às infecções e otimizar estratégias de prevenção e controle, contribuindo para um melhor entendimento e manejo das doenças no país.

Figura 6- Imagem do painel de controle com dados sobre os novos casos de leishmaniose tegumentar e visceral no Brasil. A imagem reúne informações distribuídas por ano e localidade, permitindo visualizar o comportamento da doença em diferentes regiões do país. O painel destaca a ocorrência das duas formas clínicas, facilitando o monitoramento epidemiológico, a detecção de áreas com maior concentração de casos e o apoio à tomada de decisão em ações de vigilância e controle.



Fonte: Adaptado BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/saude-lanca-paineis-para-monitorar-leishmanioses-no-brasil>>. Acesso em: 19 mar. 2025.

Também chamada de calazar, a leishmaniose visceral (LV) é a manifestação mais severa e letal da doença (Fig. 6). Que apresenta de acordo com a OPAS uma média anual de 3178 casos, sendo o Brasil o país com o maior número de registros. A LV se não tratada adequadamente, pode levar à morte em até 90% dos casos, destacando-se como uma das infecções parasitárias mais perigosas (OPAS, 2022). A doença afeta principalmente órgãos internos, como o fígado, o baço e a medula óssea, podendo resultar em falência múltipla de órgãos e sérias complicações (GRANADO *et al.*, 2021). As espécies geralmente associadas a LV são: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, com prevalência nas regiões da Ásia, África, Oriente Médio e América Latina (GRANADO *et al.*, 2021). A infecção representa um risco significativo para indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos, como aqueles que vivem com HIV/AIDS, o que torna essencial o diagnóstico precoce e o tratamento adequado para garantir a sobrevivência (MATHISON & BRADLEY, 2023).

Figura 7- Manifestação clínica da leishmaniose visceral (LV), caracterizada por sinais como cansaço extremo e aumento do fígado e do baço. Essas alterações refletem a ação sistêmica do parasita no organismo e a resposta imunológica desencadeada pela infecção.



Fonte: Adaptado SHMUELI & BEN-SHIMOL (2024).

1.3 Tratamento Farmacológico

O tratamento da leishmaniose é, em sua maioria, baseado em uma seleção restrita de medicamentos, como os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B (nas formas desoxicolato e lipossomal), a pentamidina, a miltefosina e a paromomicina

(Tabela. 1) (BESSA *et al.*, 2024). Para o tratamento é fundamental considerar diversos fatores, como a idade do paciente, o estágio da gestação se grávida, a presença de comorbidades e a análise detalhada da relação custo-benefício do tratamento (NERY *et al.*, 2024).

Tabela 1- Tabela com os principais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose, incluindo informações sobre sua via de administração, dosagens, efeitos adversos (EAs), vantagens e desvantagens.

Medicamento	Via de administração	Dose	EAs	Vantagens	Desvantagens
Antimonial pentavalente	IM, IV ou IL	20 mg/kg/dia por 28–30 dias	Cardiotoxicidade, pancreatite; nefrotoxicidade; hepatotoxicidade	Fácil disponibilidade (em áreas endêmicas); baixo custo	Duração prolongada do tratamento; dor durante a injeção, eventos adversos tóxicos; resistência aos medicamentos
Anfotericina B	4	0,75–1 mg/kg/dia por 15–20 dias, diariamente ou em dias alternados	Toxicidade renal; reações relacionadas à injeção; hipocalemia	A resistência primária não é comum;	Requer hospitalização para administração; nefrotoxicidade; calor; instabilidade
Anfotericina B lipossomal	4	Dose total de 10–30 mg/kg (dose única; 3–5 mg/kg/dose)	Calafrios e rigidez durante a injeção; nefrotoxicidade leve	Alta eficácia; baixa toxicidade	Alto custo; necessidade de infusão intravenosa lenta
Miltefosina	Oral	100–150 mg/dia por 28 dias	EAs gastrointestinais; toxicidade renal e hepática; teratogenicidade	Eficaz	Alto custo; possivelmente teratogênico; resistência a medicamentos; baixa adesão
Paromomicina	IM (VL) ou tópico (CL)	15 mg/dia por 21 dias ou 20 mg/kg por 17 dias	Toxicidade renal, auditiva e hepática	Eficaz; relativamente barato	Eficácia variada de acordo com a área geográfica; potencial de resistência
Pentamidina	EU SOU	3 mg/kg/dia IM alternadamente diariamente por 4 injeções	Hiperglicemia; hipotensão; taquicardia; alterações eletrocardiográficas	Curso de curta duração necessário	Eficácia variada dependendo da espécie de <i>Leishmania</i>

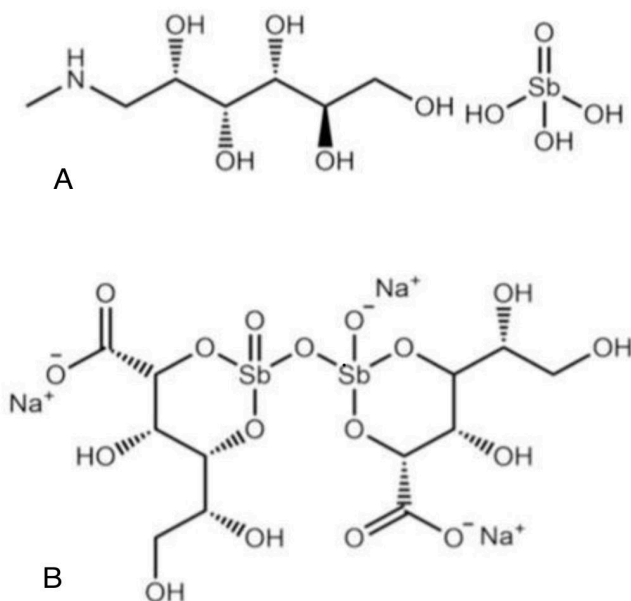
AD, efeito adverso; CL, leishmaniose cutânea; GI, gastrointestinal; IL, intralésional; IM, intramuscular; IV, intravenoso; VL, leishmaniose visceral.

Fonte: Adaptado PRADHAN *et al.*, (2022)

Uma vez que, esses medicamentos, pertencem à classe dos quimioterápicos, que são conhecidos por seus potenciais efeitos tóxicos e adversos, incluindo hipotensão, náuseas, vômitos e alucinações, podendo evoluir para complicações mais graves (NERY *et al.*, 2024). A escolha do tratamento deve ser personalizada, levando em consideração o perfil clínico de cada paciente e as possíveis interações medicamentosas, de forma a minimizar os riscos e maximizar os benefícios terapêuticos.

Os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Fig. 8A) e o estibogluconato de sódio (Fig. 8B), é a primeira opção terapêutica contra a leishmaniose (PRADHAN *et al.*, 2022). Embora seu mecanismo de ação não seja completamente elucidado, acredita-se que esses compostos atuam após serem convertidos em sua forma ativa, o antimônio trivalente (Sb^{3+}). Essa conversão parece ocorrer tanto nos macrófagos hospedeiros quanto no próprio parasita, onde o Sb^{3+} interfere em processos metabólicos essenciais (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021). Esse efeito ocorre pela inibição das enzimas da via glicolítica, diminuindo a produção de energia, além de afetar a fosforilação da adenosina difosfato (ADP) e a oxidação dos ácidos graxos, levando à apoptose do protozoário (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021). Outro efeito importante é o comprometimento dos sistemas antioxidantes da parasita, como a glutathiona e a tripanotiona redutase, resultando no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e no estresse oxidativo (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021).

Figura 8- Representação das estruturas moleculares dos principais antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da leishmaniose: (A) antimoniato de meglumina e (B) estibogluconato de sódio.



Fonte: Adaptado BESSA *et al.*, (2024)

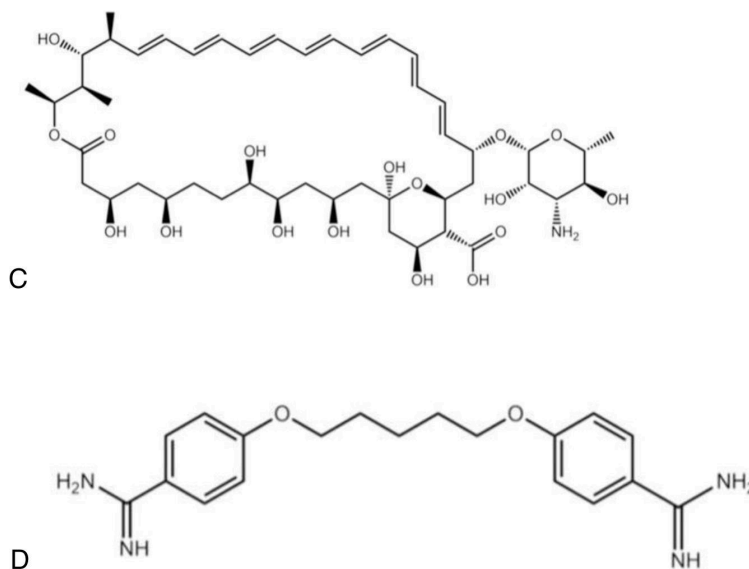
No entanto, a resistência aos antimoniais tem se tornado um desafio, sendo associada à redução da absorção do fármaco, aumento da sua passagem por transportadores de efluxo e aprimoramento dos mecanismos antioxidantes do parasita. Além de provocarem efeitos colaterais graves, como nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, pancreatite, insuficiência hepática, entre outros (PRADHAN *et al.*, 2022). Isso tem levado à busca por alternativas terapêuticas, como a anfotericina B lipossomal e a miltefosina (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021).

A anfotericina B (AmB) é um antifúngico e antibiótico de amplo espectro da classe dos polienos, amplamente utilizado no tratamento de infecções fúngicas, sistêmicas e protozoárias, incluindo a leishmaniose sendo utilizado com segunda linha no tratamento (PRADHAN *et al.*, 2022)(Fig. 9C). Sua estrutura anfifílica confere baixa solubilidade em água, exigindo formulações específicas para administração intravenosa (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021). O principal alvo da AmB são membranas celulares ricas em esteróis, sendo o ergosterol o principal componente

presente nas membranas plasmáticas dos protozoários do gênero *Leishmania* (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021; BESSA *et al.*, 2024; MATHISON & BRADLEY, 2023; WIJNANT *et al.*, 2018). O mecanismo de ação da AmB envolve uma interação direta com o ergosterol, promovendo a desorganização da membrana celular e a formação de poros aquosos (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021; WIJNANT *et al.*, 2018). Essa alteração na permeabilidade resulta no extravasamento de íons essenciais, desregulação osmótica e estresse celular, levando à morte do parasita por apoptose.

Apesar de sua eficácia terapêutica, a anfotericina B apresenta uma limitação significativa: sua interação inespecífica com o colesterol das membranas celulares humanas (BESSA *et al.*, 2024). Esse mecanismo é responsável por grande parte de seus efeitos adversos, que incluem febre, calafrios, hipocalcemia e, principalmente, nefrotoxicidade, um fator que restringe seu uso prolongado e exige monitoramento clínico rigoroso (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021; BESSA *et al.*, 2024; MANN *et al.*, 2024). Para minimizar esses efeitos colaterais, foram elaboradas formulações mais seguras, como a anfotericina B lipossomal. Essa tecnologia encapsula a AmB em lipossomas, promovendo uma liberação mais direcionada do medicamento e reduzindo sua toxicidade renal (MATHISON & BRADLEY, 2022; SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021). No entanto, seu alto custo continua sendo um obstáculo significativo, especialmente para populações de baixa renda, que são as mais afetadas pela leishmaniose.

Figura 9- Representação das estruturas moleculares da anfotericina B (C) e da pentamidina (D), destacando suas características químicas relevantes para a atividade leishmanicida.



Fonte: Adaptado BESSA *et al.*, (2024)

A pentamidina (Fig. 9D) é uma diamidina aromática com ação antiparasitária, amplamente utilizada no tratamento da leishmaniose, especialmente em situações de resistência aos antimoniais pentavalentes. O mecanismo de ação da pentamidina ainda não é totalmente compreendido, mas acredita-se que sua atividade esteja relacionada ao acúmulo do fármaco dentro do parasita, onde ele exerce efeitos tóxicos sobre estruturas celulares essenciais (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021; MISHRA, SAXENA & SINGH, 2007). Estudos indicam que o fármaco penetra na célula por meio de transportadores de arginina e poliaminas, facilitando sua entrada no protozoário. Uma vez dentro do organismo, a pentamidina parece se concentrar na mitocôndria, onde pode interferir no metabolismo energético do parasito (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021). Além disso, há evidências de que o fármaco se liga ao DNA do cinetoplasto, afetando a replicação e a estabilidade do material genético, o que compromete a sobrevivência do protozoário e leva à sua morte (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021).

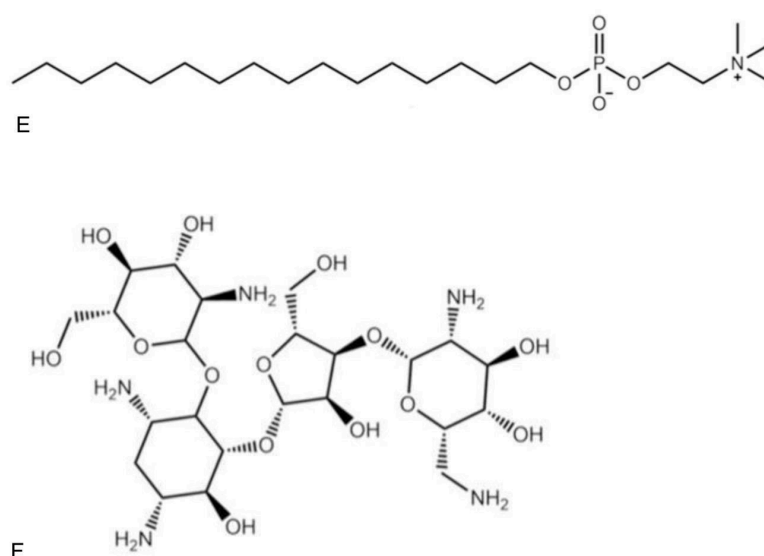
No entanto, apesar de sua eficácia no combate à leishmaniose, a pentamidina está associada a efeitos adversos significativos, que podem comprometer diversos sistemas do organismo. No sistema endócrino, destaca-se a hipoglicemia grave, que pode evoluir para diabetes mellitus insulino-dependente, devido à toxicidade pancreática (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021; MANN *et al.*, 2021). No sistema cardiovascular, o fármaco pode causar hipotensão, arritmias, miocardite e cardiotoxicidade, aumentando o risco de complicações cardíacas severas (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021). Além disso, a pentamidina pode desencadear efeitos gastrointestinais como náuseas, vômitos e diarreia, afetando a tolerabilidade do tratamento. Outras reações adversas incluem toxicidade renal, que pode levar à insuficiência renal, e em casos mais graves, choque, tornando essencial o monitoramento rigoroso dos pacientes durante o uso do medicamento (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021; MANN *et al.*, 2021).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um composto sintético inicialmente desenvolvido como agente antineoplásico para o tratamento do câncer de mama metastático (Fig. 10E). No entanto, devido às suas propriedades farmacológicas, seu uso foi ampliado para o tratamento de doenças parasitárias, tornando-se o único medicamento administrado por via oral aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (EUA), para o tratamento da leishmaniose (WARE *et al.*, 2020; SUNDAR *et al.*, 2023; SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021).

A ação da miltefosina sobre o parasita pode ocorrer por meio de múltiplos mecanismos. Entre eles, destaca-se a interferência na biossíntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI), um componente essencial da membrana do parasita (SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021; WARE *et al.*, 2020; BENAÏM & PANIZ-MONDOLFI, 2024). Além disso, a miltefosina pode provocar uma rápida alcalinização de organelas intracelulares, impactando a homeostase do cálcio e comprometendo funções celulares vitais (SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021; BENAÏM & PANIZ-MONDOLFI, 2024). Outro mecanismo relevante é a indução da expressão da óxido nítrico sintase 2 (iNOS2), levando à produção de óxido nítrico (NO), uma molécula citotóxica capaz de eliminar o parasita no interior dos

macrófagos (SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021; BENAÏM & PANIZ-MONDOLFI, 2024). Esses efeitos combinados contribuem para a morte do parasita.

Figura 10- Estruturas moleculares da miltefosina (E) e da paromomicina (F), evidenciando suas principais características químicas relacionadas ao uso no tratamento da leishmaniose.



Fonte: Adaptado BESSA *et al.*, (2024)

Outra opção terapêutica para a leishmaniose é a paromomicina (Fig. 10F), um antibiótico aminoglicosídeo amplamente estudado por sua atividade antibacteriana e leishmanicida (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021). Esse fármaco pode ser utilizado tanto topicamente quanto sistemicamente, sendo uma alternativa importante no manejo da doença, especialmente em regiões onde o acesso a tratamentos de alto custo é limitado. Sua principal vantagem é a eficácia em um curto período de aplicação, além do custo reduzido em comparação com outras opções terapêuticas (KHAN, SHARMA & KUMAR 2013). Apesar de sua efetividade, o uso da paromomicina está associado a diversos efeitos adversos, como toxicidade renal, hepática e ototoxicidade, além de sintomas gastrointestinais como náuseas, desconforto abdominal e diarreia (SANTIAGO; PITA & GUIMARÃES, 2021).

Embora o mecanismo de ação da paromomicina não esteja totalmente elucidado, estudos indicam que ela atua inibindo a síntese proteica do protozoário. O fármaco se liga à subunidade ribossômica 30S, resultando em uma leitura incorreta do mRNA e no acúmulo de complexos ribossômicos anômalos 30S-50S, levando à disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, à morte do parasita (BESSA *et al.*, 2024; SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021). Além disso, outras hipóteses sugerem que a paromomicina interfere na fluidez da membrana celular, afeta o metabolismo lipídico e provoca alterações conformacionais no sítio A do 16S RNA ribossômico, contribuindo para sua ação antiparasitária (SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021).

No entanto, as opções terapêuticas disponíveis apresentam diversas limitações, incluindo efeitos colaterais significativos, alto custo, eficácia variável e a necessidade de múltiplas aplicações. Esses fatores não apenas dificultam a adesão ao tratamento, tornando-o mais complexo e desgastante, mas também representam um ônus considerável para os pacientes. Diante desse cenário, há uma necessidade de desenvolver alternativas mais eficazes, acessíveis e menos invasivas, capazes de melhorar a adesão ao tratamento e reduzir a resistência medicamentosa (BESSA *et al.*, 2024).

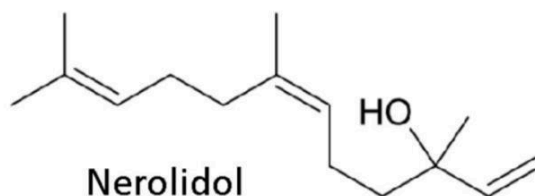
Dessa forma, a pesquisa de novas moléculas e métodos de administração, torna-se essencial para aprimorar as opções terapêuticas disponíveis. Além disso, o desenvolvimento de estratégias que reduzam os efeitos adversos e minimizem a resistência medicamentosa é crucial para otimizar os tratamentos e ampliar seu alcance. Investir em terapias inovadoras e mais acessíveis não apenas melhora a adesão dos pacientes, mas também fortalece o combate à leishmaniose, contribuindo para um controle mais eficaz da doença (ROATT *et al.*, 2020).

1.4 Nerolidol.

O nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol), também chamado de peruviol, é um álcool sesquiterpênico alifático, presentes nos óleos essenciais de diversas plantas, contribuindo significativamente para as propriedades

farmacológicas desses extratos (CHAN *et al.*, 2016). Sua estrutura química (Fig. 11) é caracterizada por uma cadeia linear de 15 carbonos, composta por grupos funcionais que lhe conferem propriedades bioativas (CHAN *et al.*, 2016). Devido à sua natureza lipofílica, o nerolidol apresenta alta permeabilidade celular, o que potencializa sua aplicação em diversas áreas, como farmacologia, cosméticos e agroindústria (CHAN *et al.*, 2016). Além de suas propriedades terapêuticas, ele vem sendo amplamente utilizado como agente aromatizante na indústria de alimentos, sendo considerado seguro para o consumo humano (ARRUDA *et al.*, 2005). Seu uso é aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, reforçando sua versatilidade tanto no campo medicinal quanto na indústria alimentícia (ALONSO *et al.*, 2019; ARRUDA *et al.*, 2005).

Figura 11- Representação da estrutura molecular do nerolidol, um composto terpênico de cadeia longa com propriedades lipofílicas. Sua conformação química permite a interação com membranas celulares, o que contribui para sua atividade biológica, incluindo efeitos antiparasitários observados em *Leishmania* spp.

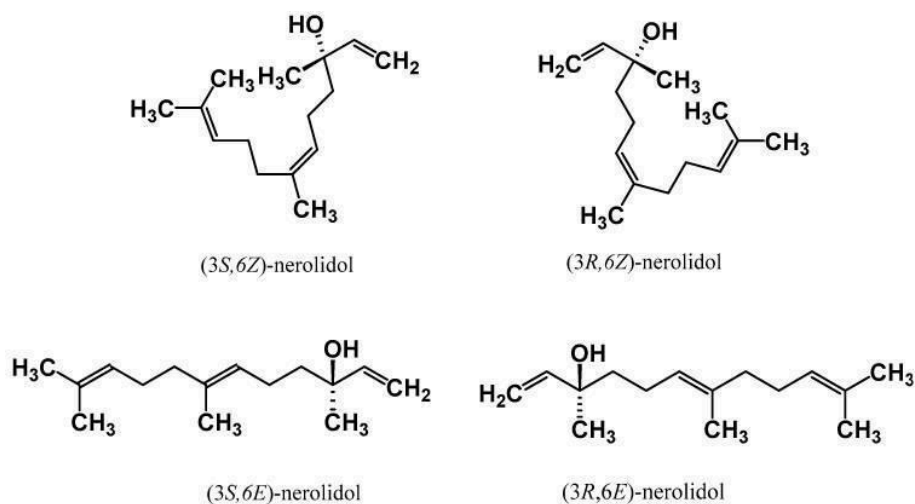


Fonte: Adaptado ALONSO *et al.*, (2019).

Este composto pode ser encontrado sob quatro formas isoméricas distintas, que resultam da combinação entre dois enantiômeros e dois isômeros geométricos. A presença de uma ligação dupla na posição C-6 é responsável pela isomeria geométrica (*cis* e *trans*), enquanto o centro estereogênico no carbono C-3 origina os enantiômeros (S e R) (CHAN *et al.*, 2016). As variações estruturais entre os isômeros do nerolidol influenciam diretamente suas propriedades físico-químicas, tais como polaridade, solubilidade, ponto de ebulição e estabilidade térmica. Tais características afetam não apenas seu comportamento em formulações, mas

também sua biodisponibilidade e interação com alvos biológicos (CHAN *et al.*, 2016). As representações estruturais dos isômeros *cis* e *trans* de nerolidol, encontram-se ilustradas na Figura 12.

Figura 12- Ilustração das estruturas químicas dos quatro isômeros estereoisoméricos do nerolidol, abrangendo os enantiômeros de cada uma de suas formas geométricas (*cis* e *trans*).



Fonte: Adaptado CHAN *et al.*, (2016).

Esse composto tem despertado interesse científico devido às suas propriedades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antiparasitária (FONSÊCA *et al.*, 2015; CHAN *et al.*, 2016). No contexto terapêutico, o nerolidol se destaca também por sua ação antineoplásica, demonstrando a capacidade de inibir o crescimento de células de carcinoma hepatocelular HepG2 e de potencializar a atividade citotóxica da doxorrubicina no tratamento do câncer de mama (ZHAO *et al.*, 2023). Adicionalmente, estudos indicam que ele pode interferir no ciclo celular, promover o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e induzir a apoptose em células HCT-116 do câncer de cólon, reforçando seu potencial como agente terapêutico ao induzir a morte celular programada e inibir a proliferação (ZHAO *et al.*, 2023).

Além desses efeitos, pesquisas apontam que o nerolidol atua como intensificador de penetração cutânea, facilitando a administração transdérmica de

medicamentos como cloridrato de nicardipina, hidrocortisona, carbamazepina, tamoxifeno e diclofenaco sódico (YAMANE, WILLIAMS & BARRY, 1995; CORNWELL & BARRY, 1994; NOKHODCHI *et al.*, 2007; EL-KATTAN *et al.*, 2001). Estudos indicam que o nerolidol apresenta potencial promissor no combate ao parasita do gênero *Leishmania*, atuando diretamente sobre uma via metabólica crucial para a biossíntese de isoprenóides. Essa via é responsável pela produção de moléculas fundamentais para a sobrevivência do parasita, como ergosterol, dolicol e ubiquinona (CHOJNACKI & DALLNER, 1988; GINGER *et al.*, 2001; RILLING *et al.*, 1990; FAUST; GOLDSTEIN; BROWN, 1979). Em promastigotas tratados com nerolidol, foi possível observar uma redução significativa na incorporação de precursores radioativos, como o ácido mevalônico e o ácido acético, sugerindo que o composto bloqueia etapas iniciais dessa rota (ARRUDA *et al.*, 2005). Curiosamente, a incorporação do farnesil pirofosfato, um intermediário mais adiante na cadeia, não foi afetada, o que reforça a hipótese de que o nerolidol atua nas fases iniciais da biossíntese (ARRUDA *et al.*, 2005). Ao comprometer processos vitais do parasita, o nerolidol surge como uma alternativa no desenvolvimento de novos tratamentos para doenças parasitárias.

Complementarmente, análises por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) com diferentes marcadores de spin revelaram que o nerolidol interfere diretamente na dinâmica da membrana plasmática aumentando sua fluidez e desorganização lipídica, desestabilizando a barreira celular dos parasitas e comprometendo sua viabilidade (ALONSO *et al.*, 2019a). Ao contrário da miltefosina, que age nas proteínas de membrana, o nerolidol atua sobre o componente lipídico da membrana, tendo um papel de espaçador entre os lipídios. Além disso, o nerolidol demonstrou ter 3x menor afinidade pela membrana de eritrócitos do que pela de *Leishmania*, ao passo que a miltefosina que exibe afinidade semelhante por ambos os tipos celulares (ALONSO *et al.*, 2019a). Dessa forma, esse composto mostra um potencial promissor no tratamento de diversas condições, incluindo infecções parasitárias como a leishmaniose, evidenciando seu papel importante na busca por novas estratégias terapêuticas.

1.5 Surfactante HPS.

Os surfactantes, também denominados tensoativos, são substâncias classificadas com base na natureza da carga elétrica presente em seu grupo funcional principal. Assim, dividem-se em quatro categorias principais: surfactantes aniônicos, que apresentam carga negativa; catiônicos, que possuem carga positiva; não iônicos, que não apresentam carga elétrica; e zwitteriônicos, que contêm simultaneamente cargas positivas e negativas em sua estrutura molecular (GONÇALVES; HOLMBERG; LINDMAN, 2023; AZEVEDO & GRAMATGES, 2016). Em virtude de suas características estruturais, os surfactantes possuem ampla aplicabilidade, destacando-se por sua capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre diferentes fases, sejam elas líquidas, sólidas ou gasosas. Essa propriedade está diretamente relacionada à sua estrutura anfifílica contendo simultaneamente regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, que lhes confere a capacidade de formar agregados supramoleculares organizados, como micelas, cujos tamanhos podem variar desde a escala nanométrica até a micrométrica (SHABAN, KANG & KIM, 2020).

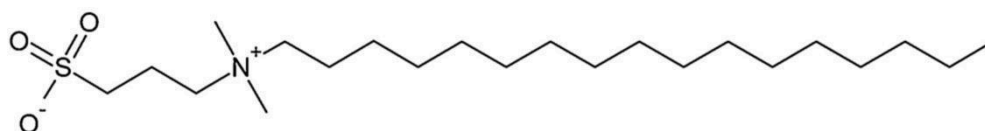
Os surfactantes zwitteriônicos possuem uma estrutura composta por uma longa cadeia apolar de carbono, conhecida como “cauda” hidrofóbica, e uma extremidade polar, ou “cabeça”, que concentra os grupos iônicos responsáveis pela interação com o meio aquoso (SHABAN, KANG & KIM, 2020). Essa combinação estrutural única faz com que as cargas opostas presentes na molécula se anulem mutuamente, conferindo uma neutralidade elétrica à molécula, que pode ser influenciada pelas condições do pH do meio. Em soluções alcalinas, caracterizadas por uma elevada concentração de íons hidroxila (OH^-), ocorre a neutralização parcial ou total do grupo catiônico presente na estrutura do surfactante zwitteriônico (SARKAR et al., 2021; ROSEN & KUNJAPPU, 2012). Esse processo reduz a influência da carga positiva, fazendo com que a carga negativa do grupo aniônico se torne predominante (SARKAR et al., 2021; ROSEN & KUNJAPPU, 2012). Como consequência, a molécula passa a exibir um comportamento semelhante ao de um

surfactante aniônico, interagindo com o meio de forma diferenciada, especialmente em relação à solubilidade e à formação de micelas. Por outro lado, em ambientes ácidos, onde há uma maior concentração de íons hidrogênio (H^+), a carga negativa associada ao grupo aniônico é compensada, o que evidencia a ação do grupo catiônico (SARKAR et al., 2021; ROSEN & KUNJAPPU, 2012). Nessa situação, o surfactante tende a se comportar como um composto catiônico, modificando suas interações com outros íons ou moléculas presentes na solução (SARKAR et al., 2021; ROSEN & KUNJAPPU, 2012).

Essa propriedade de adaptação ao pH do meio confere aos surfactantes zwitteriônicos uma versatilidade. Eles são amplamente utilizados em formulações cosméticas, farmacêuticas e em produtos de limpeza, em decorrência de sua capacidade de ajustar seu perfil de carga conforme o ambiente (MCLACHLAN & MARANGONI, 2006). Além disso, sua natureza anfotérica contribui para uma menor irritabilidade cutânea e uma melhor compatibilidade com outros ingredientes, o que os torna ideais para formulações suaves e eficazes (MCLACHLAN & MARANGONI, 2006). Essa capacidade de alternar entre comportamentos aniônico e catiônico, sem comprometer a estabilidade da estrutura molecular, é uma das razões pelas quais os surfactantes zwitteriônicos se destacam em aplicações que exigem flexibilidade funcional e desempenho em diferentes faixas de pH (SARKAR et al., 2021).

Um exemplo clássico dessa estrutura é o composto N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato (HPS) (Fig. 13). Esse surfactante possui uma cauda hidrofóbica formada por uma cadeia longa de 16 átomos de carbono (N-hexadecil) apolar, com um átomo de nitrogênio ligado. Esse nitrogênio forma um grupo amônio quaternário positivo, que está ligado a dois grupos metila (N,N-dimetil). A parte polar da molécula a “cabeça” possui três carbonos, sendo que o carbono na posição 3 está ligado ao grupo amônio ($-N^+(CH_3)_2$), conferindo o caráter catiônico, enquanto que o carbono 1 está ligado ao grupo sulfonato ($-SO_3^-$), responsável pela carga negativa.

Figura 13- Imagem da estrutura molecular do HPS, composto sintético com potencial atividade leishmanicida. Sua configuração química sugere capacidade de interação com componentes da membrana celular do parasita, contribuindo para a desestabilização estrutural e ação citotóxica observada em estudos experimentais.



Fonte: Adaptado ALONSO et al., 2019.

Estudos indicam uma associação entre o HPS e a hexadecilfosfocolina, conhecida como miltefosina, atualmente empregada no tratamento da leishmaniose. Apesar de serem substâncias distintas, ambas apresentam semelhanças estruturais, o que tem despertado interesse de nosso grupo de pesquisa no HPS como um potencial composto na terapêutica da leishmaniose, e também para melhor compreender os mecanismos de ação antiparasitária da miltefosina. Ambos são compostos zwitteriônicos carregando cargas positivas e negativas na mesma molécula, além de uma característica estrutural marcante que é uma longa cadeia alquílica composta por 16 átomos de carbono (ALONSO *et al.*, 2019b). Na estrutura da miltefosina, essa cadeia se conecta a um grupo fosfato (negativo) seguido de uma colina (positivo) (ALONSO *et al.*, 2019b). Já no HPS, a ligação é feita com um grupo amônio quaternário (positivo), que por sua vez está ligado a um grupo sulfonato (negativo). Ainda que as estruturas variem, ambas as moléculas mantêm uma organização muito próxima, as cargas estão separadas por apenas um átomo de carbono, o que contribui para um comportamento semelhante no ambiente celular (ALONSO *et al.*, 2019b). Essas semelhanças não se limitam apenas a teoria ela também refletem diretamente na forma como essas substâncias atuam, principalmente com a facilidade de se acoplarem nas membranas celulares, tanto das células hospedeiras quanto dos parasitas (ALONSO *et al.*, 2019).

Evidências obtidas por meio de ensaios em laboratório realizados por ALONSO *et al.*, (2019b), foi possível avaliar os efeitos da miltefosina e do HPS no tratamento da *Leishmania amazonensis*, além de suas possíveis toxicidades. Os

testes mostraram que os dois compostos tiveram um desempenho muito parecido, tanto na forma promastigota do parasita quanto na forma amastigota no interior de macrófagos da linhagem J774.A1. Os valores da concentração inibitória (IC_{50}) ficaram bastante próximos, sem diferenças significativas entre eles. Além disso, quando se analisou a toxicidade em macrófagos e o potencial hemolítico, observou-se que ambos também apresentaram comportamentos similares (ALONSO *et al.*, 2019b).

Outro ponto importante foi a análise feita por EPR, com o uso de dois tipos de marcadores, um que se liga aos lipídios e outro covalente que se liga às regiões sulfidrila das membranas celulares (ALONSO *et al.*, 2019b). Os resultados mostraram que tanto o HPS quanto a miltefosina interferem de forma semelhante na fluidez das membranas plasmáticas, tanto das células do parasita quanto dos macrófagos (ALONSO *et al.*, 2019b). Esses resultados ajudam a entender melhor como esses compostos agem, reforçando a ideia de que sua principal atuação acontece por meio da interação direta com as membranas celulares, o que pode desestabilizá-las e comprometer a sobrevivência do parasita.

Nesse contexto, e tendo como referência a miltefosina um dos principais fármacos atualmente utilizados no tratamento da leishmaniose e sua capacidade de interferir na dinâmica da membrana plasmática do parasita, o surfactante HPS, cuja estrutura é semelhante à da miltefosina, foi avaliado quanto à sua atividade leishmanicida, onde a espectroscopia de RPE foi usada para analisar a capacidade do composto de modificar as propriedades biofísicas da membrana (ALONSO *et al.*, 2019b). Essa abordagem visa elucidar o papel da estrutura molecular dos surfactantes HPS na atividade antiparasitária, contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a leishmaniose.

1.6 Espectroscopia de RPE

A RPE é uma técnica espectroscópica aplicada no estudo de espécies químicas que possuem elétrons desemparelhados, como radicais livres e íons metálicos paramagnéticos (ATHERTON, 1993). O equipamento de RPE do laboratório de biofísica está mostrado na Figura 14. O princípio da técnica está na interação da radiação de micro-ondas com o momento magnético desses elétrons, na presença de um campo magnético externo (WEIL & BOLTON, 2007; ALONSO *et al.*, 2019). Esse campo magnético causa o desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico, fenômeno conhecido como efeito Zeeman.

Figura 14- Imagem obtida no espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) do Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da UFG. O equipamento é utilizado para a detecção e análise de espécies paramagnéticas, permitindo a investigação de processos oxidativos, radicais livres e interações moleculares em amostras biológicas e químicas.

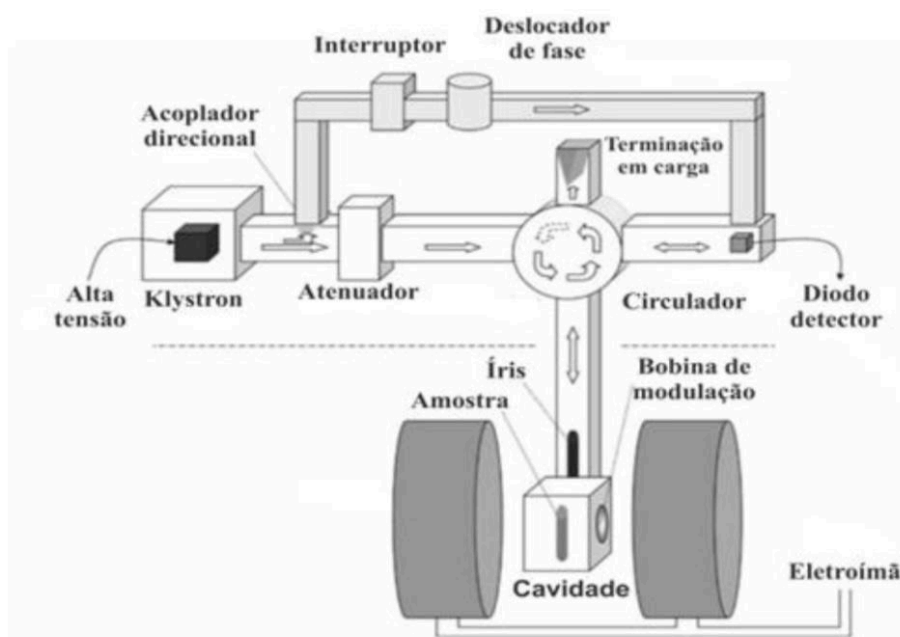


Fonte: Autoria própria.

Segundo a mecânica quântica, o spin do elétron pode assumir duas orientações em relação ao campo, a paralela e antiparalela (Nível de maior energia spin “up” $+1/2$ e o de menor energia como spin “down” $-1/2$) resultando em dois níveis de energia distintos (ATKINS & DE PAULA, 2011; BRUSTOLON & GIAMELLO, 2009). Quando a energia da radiação de micro-ondas coincide com a diferença entre esses níveis, ocorrem transições que levam à absorção da radiação, registrada na forma de espectro (WEIL & BOLTON, 2007). O espectro resultante fornece informações valiosas sobre o ambiente químico e magnético ao redor do

elétron desemparelhado, como interações hiperfinas, estrutura eletrônica e dinâmica molecular.

Figura 15- Diagrama de bloco ilustrando os principais componentes e o funcionamento do espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). O esquema destaca elementos como a fonte de micro-ondas, cavidade ressonante, sistema de detecção e controle de campo magnético, essenciais para a identificação de espécies paramagnéticas em amostras químicas e biológicas.



Fonte: HAGEN (2009).

De acordo com o diagrama de blocos representado na Figura 15, as micro-ondas são geradas por um klystron, alimentado por uma fonte de alta tensão. Essa é a fonte mais comumente utilizada, contudo, alternativas como os diodos Gunn também são empregadas. As micro-ondas produzidas são transmitidas até a cavidade que contém a amostra por meio de guias de onda onde são ajustadas em intensidade por um atenuador, permitindo controlar a potência do sinal. Em seguida, o sinal passa por um acoplador direcional, que garante que ele siga corretamente pelo sistema. Logo após, o sinal pode ser ligado ou desligado por um interruptor e ter sua fase ajustada por um deslocador de fase, o que é importante para melhorar a precisão da detecção. O componente denominado circulator direciona as micro-ondas geradas pela fonte até a cavidade, onde a amostra é estrategicamente

posicionada (BRUSTOLON & GIAMELLO, 2009; POOLE, 1967). Na cavidade, que funciona como o núcleo do sistema, caracteriza-se pelo fator de qualidade Q, um parâmetro fundamental que avalia a capacidade de armazenar a energia das micro-ondas (HAGEN, 2019). Em termos práticos, quanto maior o valor de Q, melhor a eficiência de armazenamento, resultando em menores perdas energéticas durante os ciclos de oscilação, contribuindo para a sensibilidade aprimorada do dispositivo.

Adicionalmente, a amostra encontra-se situada entre os polos de um eletroímã, o qual gera um campo magnético constante e ajustável. Para facilitar a detecção do sinal, uma bobina de modulação é integrada ao sistema, proporcionando uma variação periódica ao campo magnético. A entrada do sinal na cavidade é controlada por uma íris, que ajusta o acoplamento entre o campo de micro-ondas e a amostra. Esse acoplamento é regulado pelo sistema de forma a otimizar as condições de ressonância dentro da cavidade, garantindo máxima transferência de energia e, conseqüentemente, maior sensibilidade na detecção do sinal. Quando as micro-ondas interagem com os elétrons desemparelhados da amostra, ocorre uma absorção de energia em certas condições específicas de campo magnético, e essa interação altera o sinal. Esse sinal refletido é redirecionado pelo circulador até o diodo detector, que mede as mudanças causadas pela amostra. Por fim, qualquer sinal restante que não foi absorvido nem refletido é eliminado por uma terminação em carga, impedindo que ruídos ou reflexos interfiram nos resultados, que é convertido e transmitido em formato digital para um sistema computacional (MOREIRA *et al.*, 2014; ALONSO *et al.*, 2019).

A espectroscopia de RPE tem se tornado uma ferramenta essencial na detecção de espécies naturalmente paramagnéticas, aquelas que possuem elétrons desemparelhados em sua estrutura eletrônica, como os radicais livres intermediários formados ao longo de processos bioquímicos. No entanto, a maioria dos sistemas biológicos não possuem centros paramagnéticos, o que limita a obtenção direta de sinais por essa técnica. Para superar essa limitação, foi desenvolvido o método de marcação com spin, considerado um avanço significativo para a aplicação do método em sistemas biológicos complexos. Os marcadores de spin são moléculas

estáveis, amplamente utilizadas em experimentos de RPE, especialmente em sistemas que não possuem centros paramagnéticos naturais (SALMON *et al.*, 2007). Geralmente, pertencem à classe dos nitroxídios, caracterizados pela presença de um grupo funcional N–O, onde o oxigênio e o nitrogênio compartilham um elétron desemparelhado (PERUSSI, RUGGIERO & TABAK, 1985). Esse elétron desemparelhado interage com o núcleo do átomo de nitrogênio (com spin nuclear diferente de zero), resultando em um acoplamento hiperfino que gera sinais característicos no espectro de RPE. Essa propriedade permite o monitoramento de processos dinâmicos, estruturas moleculares e interações intermoleculares em diversos sistemas químicos e biológicos. Um dos marcadores de spin mais utilizados é o ácido 5-doxil-esteárico (5-DSA) marcado no quinto carbono da cadeia alifática, que quando incorporado à membrana celular, fornece dados sobre a dinâmica molecular dos lipídios e proteínas de membrana. A fluidez da membrana pode ser inferida a partir da análise do parâmetro de desdobramento hiperfino, o $2A_{\parallel}$, que diminui ou aumenta conforme a mobilidade da membrana. Em situações em que o marcador de spin ocupa regiões distintas da membrana, com diferentes graus de mobilidade, o espectro de RPE pode apresentar múltiplas componentes. Nesses casos, a simulação computacional dos espectros se torna necessária para uma análise precisa e quantitativa dos diferentes ambientes moleculares onde os marcadores estão inseridos (MOREIRA *et al.*, 2014; ALONSO *et al.*, 2019).

1.7 Justificativa

Diante da alta toxicidade dos tratamentos atuais para leishmaniose, somadas à carência de novas terapias para essa doença, este estudo propõe investigar os compostos nerolidol e HPS, com foco em seus mecanismos de ação específicos e potenciais alvos terapêuticos. Utilizando a espectroscopia de RPE, avaliando a atividade leishmanicida e os efeitos na rigidez da membrana plasmática da *L. amazonensis*. Considerando que compostos como esses podem causar alterações no potencial de membrana, além de induzir o estresse oxidativo. O estudo também analisará seu impacto em macrófagos infectados e não infectados, visando contribuir

para o entendimento dos mecanismos antiparasitários e assim também para desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Analisar a atividade leishmanicida do nerolidol e do HPS e sua correlação com o estresse oxidativo que supostamente pode levar à rigidez de membrana plasmática do parasita, a qual é avaliada usando a espectroscopia de RPE de marcador de spin.

2.2 Objetivo Específico

- Avaliar por espectroscopia de RPE do marcador de spin 5-DSA, os efeitos de rigidez de membrana plasmática em promastigotas de *Leishmania amazonensis* causados pela exposição ao nerolidol ou HPS no meio de cultura por 24 h;
- Comparar os efeitos de rigidez de membrana no parasita causados pelo nerolidol e HPS com as atividades antiproliferativas destes compostos em promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* avaliadas em trabalhos anteriores;
- Avaliar por RPE os efeitos de rigidez de membrana do nerolidol e HPS no macrófago J774.A1 não infectado e infectado por *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar os efeitos citotóxicos dos compostos nerolidol e HPS em macrófagos diferenciados de células THP-1 e comparar com os efeitos citotóxicos no macrófago J774.A1;
- Analisar os índices de seletividade (SI) de ataque ao parasita em relação ao macrófago;
- Investigar os mecanismos de ação do nerolidol e HPS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Substâncias químicas

- Nerolidol (98% de pureza, uma mistura de cis e trans nerolidol, PM = 222,37 g/mol, Número CAS 7212-44-4) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA);
- N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato (HPS, PM = 391,7 g/mol, Número CAS 2281-11-0) da Sigma-Aldrich;
- Marcador de spin ácido 5-doxil-esteárico (5-DSA, sal de amônio, número CAS 2315262-05-4), da Sigma-Aldrich;
- Meio de cultura RPMI-1640, penicilina-estreptomicina da Sigma-Aldrich;
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) da Sigma-Aldrich;
- Bicarbonato de sódio da Sigma-Aldrich;
- O soro fetal bovino inativado pelo calor (SFB) foi adquirido da Corning Life Sciences (NY, EUA);
- Forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) da Sigma Aldrich, EUA;
- Solução salina tamponada com fosfato (PBS);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) da Synth, BR.

3.2. Cultura de Parasitas e de macrófagos

Em Ambiente anaeróbio com temperatura de 26°C as cepas promastigotas da *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8 ou 75/Josefa), foram cultivadas em placa com 24 poços ou em garrafas, contendo meio RPMI 1640, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), além de 1 % de penicilina-estreptomicina.

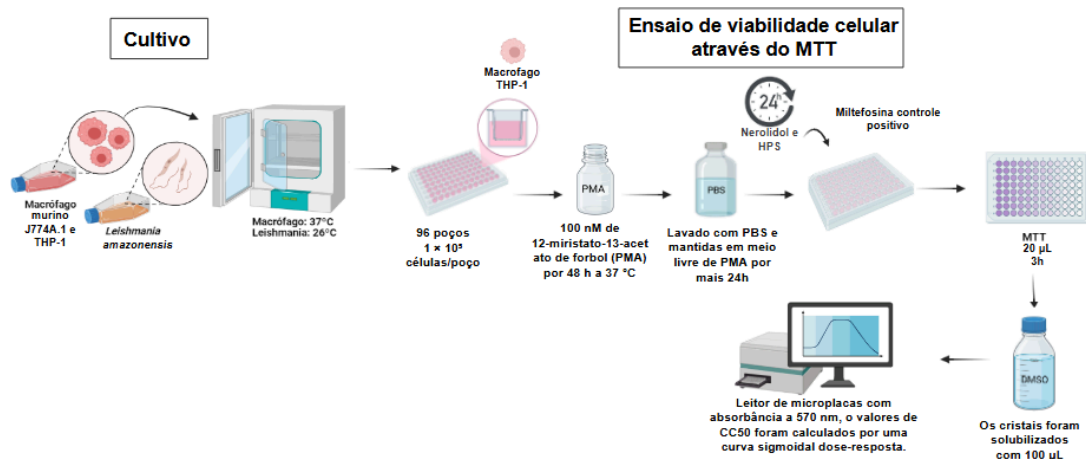
Por sua vez, a linhagem J774A.1 de macrófagos (ATCC® TIB-67) e monócitos THP-1 foram cultivados em garrafas com meio RPMI 1640, também suplementado com 10% de SFB, além de 1 % de penicilina-estreptomicina, sendo mantidos a 37°C, em pH 7,4 sob atmosfera com 5% de CO₂.

3.3 Análise da toxicidade celular em macrófagos diferenciados da linhagem THP-1

Por meio do ensaio MTT, também foi avaliada a toxicidade celular em macrófagos obtidos a partir da diferenciação de monócitos da linhagem THP-1 conforme ilustrado na Figura 16. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo e após 3 dias de cultivo celular foram semeadas em placas de 96 poços com concentração de 1×10^5 células/poço, 200 μL /poço e tratados com 100 nM de 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) por 48 h a 37 °C, e incubada com 5% de CO_2 , para induzir a diferenciação em células semelhantes a macrófagos humanos. Após esse período, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e mantidas em meio livre de PMA por mais 24 h, a fim de permitir a recuperação e estabilização do macrófago.

Para os ensaios, o nerolidol foi inicialmente solubilizado em etanol na concentração de 128 mM, enquanto o HPS foi preparado em PBS a 20 mM. Ambos os compostos foram então diluídos em meio RPMI-1640 completo para alcançar concentrações finais variando entre 48 e 3072 μM para o nerolidol e entre 12,5 e 800 μM para o HPS. Após a diferenciação dos macrófagos, os tratamentos foram aplicados e as células mantidas em incubação por mais 24 h, sob as mesmas condições. A miltefosina foi utilizada como controle positivo de toxicidade celular.

Figura 16- Avaliação da toxicidade celular em macrófagos derivados da linhagem THP-1 após exposição a diferentes tratamentos. A análise foi realizada para verificar os efeitos citotóxicos nos modelos celulares, contribuindo para a determinação da seletividade e segurança dos compostos testados.



Fonte: Própria autora (criado na plataforma BioRender.com).

Em seguida, adicionou-se 20 µL de MTT (5 mg/mL em PBS), a cada poço, e as placas foram incubadas por 3 h para permitir a formação dos cristais de formazan, produto da atividade mitocondrial celular. Após esse período, os cristais foram solubilizados com 100 µL de DMSO e a absorbância foi registrada a 570 nm utilizando um leitor de microplacas. A viabilidade celular foi calculada com base na comparação com células controle não tratadas, e os valores de CC_{50} foram obtidos por meio do ajuste dos dados a uma curva sigmoideal de resposta à concentração.

3.4 Análise por RPE de promastigotas, macrófagos e macrófagos infectados por *Leishmania*

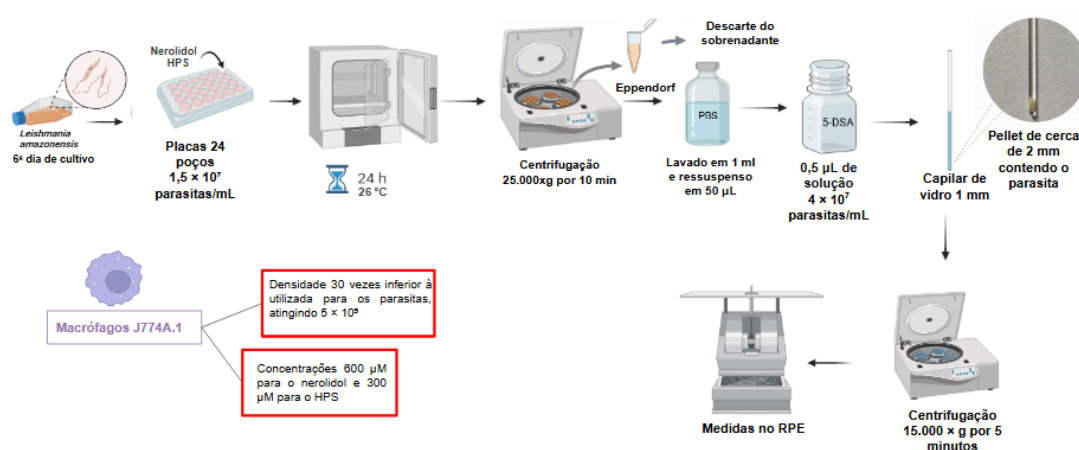
Os parasitas foram usados para os ensaios experimentais quando atingiram a fase estacionária de crescimento, correspondente ao 6º dia de cultivo in vitro conforme ilustrado na Figura 17. Os promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo, sendo distribuídas em placas de 24 poços com volume final de 2 mL por poço e densidade celular ajustada para $1,5 \times 10^7$ parasitas/mL. As culturas foram tratadas com diferentes concentrações dos

compostos nerolidol (64, 90, 128 e 192 μM) e HPS (10, 20, 40 e 80 μM), obtidas pela diluição de meio de cultura, por 5 minutos ou 24 h a 26 °C diretamente no meio de cultura antes da adição dos parasitas.

Passado um período de incubação de 24 h a 26 °C, amostras foram transferidas para tubos tipo eppendorf e, em seguida, submetidas à centrifugação a 25.000 \times g por 10 minutos, para sedimentar não somente os parasitas, mas também fragmentos de membrana. Em seguida os sobrenadantes foram então cuidadosamente descartados, e os parasitas foram lavados com 1 mL de tampão PBS. E posteriormente ressuspensão em 50 μL do mesmo tampão. Na etapa de marcação da membrana do parasita com a sonda paramagnética, foram adicionados 0,5 μL de solução do marcador 5-DSA (a 5 mg/mL em etanol) a cada amostra, contendo cerca de 4×10^7 parasitas/mL. Para a análise por espectroscopia de RPE, as suspensões marcadas foram transferidas para tubos capilares de vidro com 1 mm de diâmetro interno, previamente selados em uma das extremidades com chama. Os tubos capilares foram novamente centrifugados a 15.000 \times g por 5 minutos, concentrando os parasitas em um pequeno pellet de cerca de 2 mm, que então foram levados ao equipamento de RPE e posicionados no centro da cavidade de ressonância.

Os experimentos realizados com macrófagos J774A.1 seguiram uma metodologia parecida com a da *Leishmania*, porém foram realizados ajustes levando em conta as características específicas das células, como o tamanho. Quando as células atingiram cerca de 70% de confluência procedeu-se com o subcultivo celular, de modo que o meio de cultivo foi descartado e um meio novo foi adicionado para desaderir às células da garrafa, utilizando raspador de células scraper. As culturas foram preparadas com uma densidade 30 vezes inferior à utilizada para os parasitas, atingindo 5×10^5 células/mL. Nesses experimentos, foram utilizadas altas concentrações dos compostos de até 600 μM para o nerolidol e 300 μM para o HPS, com base nos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade.

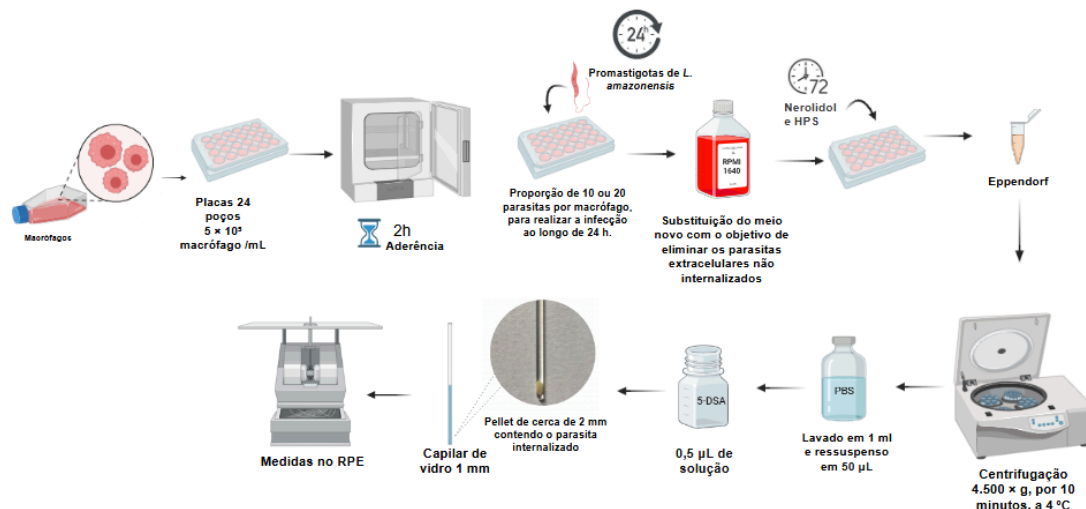
Figura 17- Etapas da análise por RPE realizada em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e macrófagos, visando detectar e quantificar espécies paramagnéticas associadas ao estresse oxidativo. A técnica permite comparar o perfil de radicais livres gerados nas diferentes células, contribuindo para o entendimento dos efeitos induzidos pelo nerolidol e HPS.



Fonte: Própria autora (criado na plataforma BioRender.com).

Para os ensaios de macrófagos infectados, 2 mL (5×10^5 macrófago /mL) da suspensão foram adicionados às placas de 24 poços e incubados por 2 h para promover a adesão celular conforme ilustrado na Figura 18. Em seguida, foram adicionadas as promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10 ou 20 parasitas por macrófago, para realizar a infecção ao longo de 24 h. Passado esse período, o meio foi substituído por RPMI 1640 novo com o objetivo de eliminar os parasitas extracelulares não internalizados. As culturas infectadas foram então expostas aos compostos nerolidol e HPS por um período adicional de 72 h. Passadas as 72 h de tratamento, as células juntamente com o meio de cultivo foram recolhidas e transferidas para tubos tipo eppendorf. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $4.500 \times g$, por 10 minutos, a $4^\circ C$. Após essa etapa, cada amostra foi lavada com 1 mL de tampão PBS e ressuspendida em 50 µL do mesmo tampão, e logo após adicionou-se 5-DSA e realizou a centrifugação dos tubos capilares, como já descrito anteriormente para os ensaios com promastigotas, para realização das medições no RPE.

Figura 18- Etapas da análise por RPE de macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis*, com o objetivo de detectar alterações no perfil de radicais livres associadas ao estresse oxidativo induzido pela exposição ao nerolidol e HPS.



Fonte: Própria autora (criado na plataforma BioRender.com).

Os espectros de RPE foram obtidos utilizando o espectrômetro Bruker EMXplus (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemanha), operando sob as seguintes condições: potência de micro-ondas de 20 mW, frequência de 9,45 GHz, modulação de campo magnético de 1,0 G, faixa de varredura de 100 G, tempo total de aquisição de 168 segundos e temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ C$.

3.5 Análise Estatística

As análises experimentais foram conduzidas de maneira independente em pelo menos três repetições, e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As comparações entre médias foram realizadas utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do teste de Tukey para a detecção de diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Efeitos antiproliferativos e citotóxicos do HPS e do nerolidol

Pesquisas conduzidas por Alonso *et al.* (2019a; 2019c) buscaram compreender os efeitos biológicos do nerolidol e do HPS frente à *Leishmania amazonensis*, sendo a atividade antiproliferativa um dos aspectos avaliados. Para isso, os pesquisadores utilizaram o ensaio colorimétrico MTT, um método amplamente empregado para avaliar a viabilidade celular, especialmente na forma promastigota do parasita. Já a avaliação da forma amastigota, que permanece no interior de macrófagos da linhagem J774.A1, foi empregada uma cepa de *Leishmania amazonensis* que expressa a proteína fluorescente verde (GFP – Green Fluorescent Protein). Essa modificação permitiu o rastreamento eficiente dos parasitos intracelulares, facilitando a análise quantitativa por citometria de fluxo. A utilização da GFP, além de aumentar a sensibilidade da detecção, possibilita o monitoramento dinâmico da infecção em tempo real, contribuindo para uma caracterização mais precisa da interação parasito-hospedeiro. Também foi avaliada a citotoxicidade dos compostos frente a macrófagos da linhagem J774A.1, utilizando a miltefosina como controle positivo. Os resultados obtidos anteriormente foram sintetizados na Tabela 2, que apresenta, além dos valores de citotoxicidade (CC_{50}), os respectivos índices de seletividade (SI), calculados pela razão entre CC_{50} e IC_{50} .

Neste estudo, ampliamos a investigação da citotoxicidade incluindo macrófagos derivados da linhagem THP-1, os quais, por serem células não proliferativas, oferecem um modelo mais próximo das condições fisiológicas encontradas *in vivo*. Os dados obtidos com esses macrófagos diferenciados foram incorporados à Tabela 1, permitindo uma comparação direta com os resultados previamente observados.

Tabela 2- Avaliação da atividade antiproliferativa do nerolidol e HPS contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, bem como da citotoxicidade em macrófagos da linhagem J774A.1 e derivados da THP-1 após 24 h de exposição – Brasil, 2019-2025.

Amostras	Macrófagos-CC ₅₀ ± SD (µM)			L. amazonensis - IC ₅₀ ± SD (µM)				
	J774A. 1	THP-1 dif.	Promastigotas	SI _{J774}	SI _{THP-1}	Amastigotas	SI _{J774}	SI _{THP-1}
Nerolidol	139 ± 14 (A) ^a	1238 ± 273 (A)*	74 ± 6 (A) ^a	1.9	16.7	100 ^a	1.4	12.4
HPS	55 ± 15 (B) ^b	75 ± 47 (B)	10.6 ± 2.3 (B) ^b	5.2	7.1	27	2.0	2.8
MTF	64 ± 12 (B) ^b	68 ± 20 (B)	10.3 ± 2.0 (B) ^b	6.2	6.6	24	2.7	2.8

CC₅₀: concentração citotóxica capaz de afetar 50% das células. IC₅₀: concentração necessária para inibir 50% dos parasitas. DP= desvio padrão. SI: índice de seletividade (CC₅₀/IC₅₀). SI J774: SI obtido para macrófagos da linhagem J774A.1. SI THP-1: SI referente a macrófagos diferenciados da linhagem THP-1. MTF= miltefosina (utilizada como controle positivo). ^{a,b}Dados provenientes das referências (Alonso *et al.*, 2019a; Alonso *et al.*,2019c), respectivamente.*Diferenças estatisticamente significativas: dentro de cada coluna, médias que compartilham a mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa (P < 0,05).

Como demonstrado na Tabela 2, o nerolidol apresentou baixo índice de seletividade com base na citotoxicidade observada em macrófagos da linhagem J774A.1, com valores de SI = 1,9 para promastigotas e SI = 1,4 para amastigotas, denotando eficácia limitada contra *Leishmania*. Esses resultados estão de acordo com dados previamente reportados por Arruda *et al.* (2005) que relataram um IC₅₀ de 85 µM e o CC₅₀ e de 126 µM, e um SI = 1,5 respectivamente, para a mesma cepa e linhagem celular. Além disso, um estudo conduzido por Mendanha *et al.* (2013) avaliou o potencial citotóxico do nerolidol por meio de um ensaio de captação de Vermelho Neutro (NRU), realizado durante 48 h em fibroblastos BALB/c 3T3-A31, determinando um CC₅₀ de 60 µM . É importante destacar que essas avaliações de toxicidade foram realizadas em linhagens celulares imortalizadas, conhecidas por sua alta taxa proliferativa, característica frequentemente associada a células tumorais. Corroborando com esses achados, estudos recentes demonstraram que o nerolidol possui propriedades antitumorais, com efeitos inibitórios tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MOHAMMADI *et al.*,2024; ZHAO *et al.*, 2024).

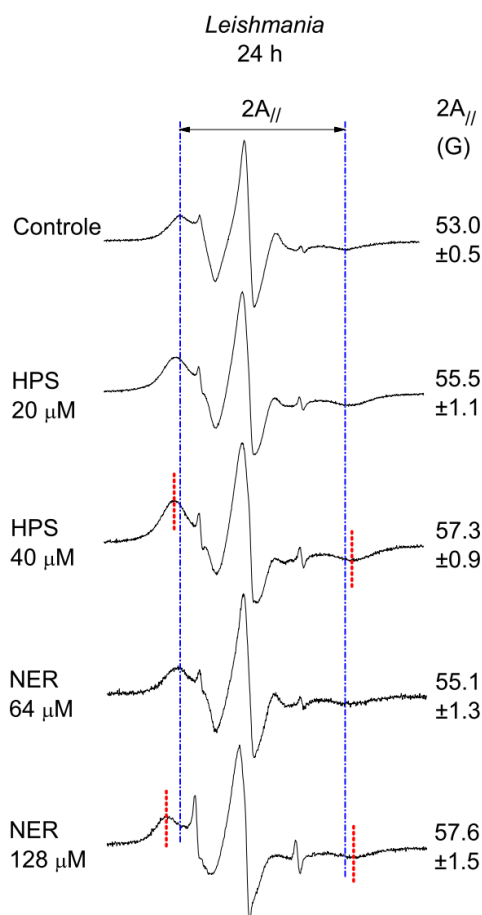
Embora evidências indiquem efeitos citotóxicos em certas linhagens, o nerolidol continua sendo considerado um composto com baixa toxicidade para células saudáveis e com reduzido potencial hemolítico (Alonso *et al.*, 2019a). Assim, realizou-se os ensaios de citotoxicidade utilizando macrófagos diferenciados dos monócitos THP-1, um modelo mais representativo das células hospedeiras humanas em estado não proliferativo. Nessa abordagem, observamos uma média de CC_{50} aproximadamente nove vezes superior à registrada nas células J774A.1, sugerindo uma toxicidade significativamente menor nestas condições. Esse achado reforça o potencial de segurança dos compostos, especialmente considerando aplicações tópicas ou mesmo sistêmicas, onde a seletividade é essencial para evitar danos às células hospedeiras. A menor toxicidade observada em macrófagos diferenciados da linhagem THP-1, que representam um modelo mais fisiologicamente relevante de células humanas, sugere que o nerolidol e o HPS poderiam ser explorados como candidatos terapêuticos com menor risco de efeitos adversos, principalmente em formulações tópicas para o tratamento de leishmaniose cutânea (MENDES *et al.*, 2022).

4.2 Nerolidol e HPS promovem aumento da rigidez da membrana em parasitas do gênero *Leishmania*

Os espectros de RPE da Figura 19 foram obtidos a partir da incorporação do marcador paramagnético 5-DSA na membrana plasmática de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, possibilitando a análise comparativa entre as amostras controle e aquelas expostas às várias concentrações de nerolidol e HPS. Considerando uma margem de erro experimental de aproximadamente 0,5 G para o parâmetro $2A_{//}$, a elevação de ~2 G no valor de $2A_{//}$, observada após o tratamento com 20 μ M de HPS, indica um enrijecimento expressivo da membrana plasmática, refletindo uma redução na mobilidade dos lipídios da bicamada e podendo impactar funções como o transporte de moléculas, a sinalização celular e a integridade estrutural da célula. De modo semelhante ao observado com o HPS, o tratamento com nerolidol na concentração de 64 μ M inferior ao seu IC_{50} como já citado anteriormente também resultou em um aumento de aproximadamente 2 G no valor

de $2A_{//}$, indicando também um enrijecimento da membrana plasmática. Esse efeito, mesmo em doses subinibitórias, reforça a capacidade do nerolidol de interferir na dinâmica lipídica da membrana, possivelmente comprometendo sua funcionalidade antes mesmo de atingir concentrações citotóxicas. À medida que se aumentaram as concentrações de ambos os compostos, os espectros de RPE revelaram um enrijecimento cada vez mais acentuado da membrana.

Figura 19- Espectros de RPE do marcador 5-DSA nas amostras de promastigotas *L. amazonensis* tratadas com nerolidol (NER) e HPS, indicando alterações na mobilidade da membrana plasmática.



Fonte: Figura de autoria do grupo de biofísica-UFG

4.3 O efeito inicial do nerolidol e HPS e suas mudanças na fluidez da membrana de *Leishmania*

Mesmo em curtos períodos de exposição, os efeitos causados pelo nerolidol e HPS já podem ser observados. Com apenas 5 minutos de incubação em meio de cultura, verificou-se um aumento na fluidez da membrana, conforme demonstrado por medidas de RPE realizadas em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e em macrófagos J774A.1 tratados com esses compostos, como ilustrado na Figura 20 (primeira e segunda coluna). Esse efeito inicial foi quantificado a partir do parâmetro $2A_{//}$ do marcador de spin 5-DSA, que indicou, em promastigotas, uma redução de 2 G com 40 μM de HPS e de 1,4 G com 90 μM de nerolidol. Já nos macrófagos, foram necessárias concentrações mais elevadas 100 μM de HPS e 200 μM de nerolidol para promover alterações comparáveis na fluidez da membrana.

No entanto, com o prolongamento do tempo de incubação, observou-se uma redução progressiva dos efeitos de fluidez em ambos os modelos celulares, possivelmente em função da proliferação celular, redistribuição ou metabolismo de compostos. A interação direta dos compostos com a bicamada lipídica parece ser responsável pela elevação inicial da fluidez observada nas membranas logo após a exposição. No entanto, a rigidez detectada após 24 h de tratamento nos parasitas não parece ser consequência direta dessa interação física, mas sim resultado de respostas celulares secundárias, particularmente o estresse oxidativo. Esse processo de enrijecimento está provavelmente relacionado à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que desencadeiam danos como a peroxidação de lipídios e a oxidação de proteínas da membrana. Moléculas oxidantes como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) têm reconhecida atividade antimicrobiana, agindo principalmente ao comprometer a estrutura e a funcionalidade das membranas celulares por meio de lesões oxidativas (LAM *et al.*, 2020).

4.4 Nerolidol e HPS não promoveram aumento na rigidez de membrana em macrófagos J774A.1 não infectados.

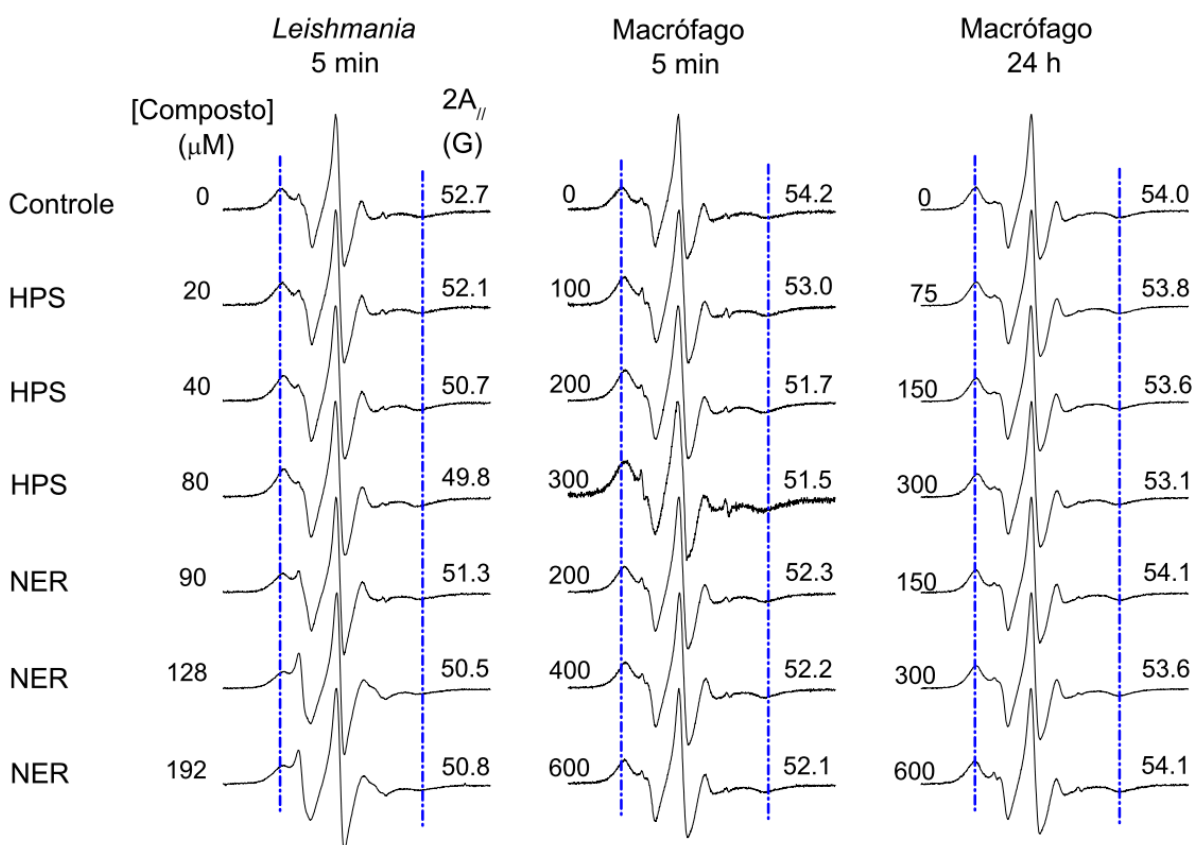
Na Figura 20 é pode-se observar os macrófagos J774A.1 que diferentemente das promastigotas não apresentaram aumento na rigidez da membrana, mesmo após 24 h de exposição a HPS ou nerolidol. Nem mesmo com concentrações superiores aos valores de CC_{50} previamente relatados (Alonso *et al.*, 2019a; Alonso *et al.*, 2019c) foram capazes de alterar o parâmetro $2A_{//}$ nesta linhagem, o que sugere a ausência de rigidez induzida pelos compostos nas células hospedeiras.

Estudos demonstram que os macrófagos desempenham um papel crucial na imunidade inata, destacando-se por sua capacidade de sintetizar óxido nítrico (NO) de forma eficiente (BOGDAN, 2015; FUJII & OSAKI, 2023). Em concentrações fisiológicas o NO atua como um agente antioxidante, ajudando a proteger as células contra danos oxidativos. Especificamente, o NO inibe a peroxidação lipídica ao interromper a cadeia de reações oxidativas, reagindo rapidamente com radicais peróxil lipídicos ($LOO\bullet$) e radicais alcóxil ($LO\bullet$), originando compostos estáveis e não radicais, como LOONO e LONO (RUBBO *et al.*, 1995; HOGG & KALYANARAMAN, 1999). Além disso, o NO pode reagir com o anion superóxido para produzir o peroxinitrito ($ONOO^-$) (RUBBO *et al.*, 1995; HOGG & KALYANARAMAN, 1999). Apesar de essa reação ajudar a diminuir a produção de EROs, é essencial destacar que o peroxinitrito formado nesse processo é um oxidante altamente reativo e com amplo potencial para danificar diversos componentes celulares (PRYOR & SQUADRITO, 1995).

Nos ensaios de citotoxicidade conduzidos com macrófagos da linhagem J774A.1, não foi realizada a ativação prévia das células. Em sua forma não estimulada, esses macrófagos produzem apenas baixos níveis de NO, sendo necessária a presença de agentes imunomoduladores para induzir uma resposta mais significativa (FUJII & OSAKI, 2023; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013). Quando expostos a citocinas inflamatórias, como o interferon-gama ($IFN-\gamma$), esses macrófagos são ativados e polarizados para o fenótipo M_1 , um estado funcional

associado ao aumento da produção de NO e a uma ação mais eficaz na eliminação de patógenos (FUJII & OSAKI, 2023; PÉREZ & RIUS-PÉREZ, 2022; HERB & SCHRAMM, 2021).

Figura 20- Espectros de RPE do 5-DSA mostram reduções na fluidez de membrana de *L. amazonensis* e macrófagos J774A.1 após tratamento com HPS ou nerolidol (NER). Os valores de $2A_{//}$ diminuíram com a adição dos compostos em mais alta concentração.



Fonte: Figura de autoria do grupo de biofísica-UFG.

4.5 O aumento da rigidez de membrana em *Leishmania* após tratamento com nerolidol e HPS pode estar associado a alterações induzidas por estresse oxidativo

Uma possível explicação para a rigidez significativa da membrana da *Leishmania*, após o tratamento com nerolidol e HPS, envolve a formação de ligações cruzadas entre proteínas da membrana, potencialmente desencadeadas por

processos de estresse oxidativo. Essa hipótese é sustentada por estudos anteriores que relataram alterações semelhantes em células expostas a agentes oxidantes. Por exemplo, espectros de RPE utilizando o marcador de spin 5-DSA revelaram níveis elevados de rigidez em eritrócitos tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e azida, um inibidor da catalase (MEDANHA *et al.*, 2012). Nessas condições, os valores do parâmetro 2A_{//} chegaram a alcançar 60 G em concentrações de 200 µM de H₂O₂, indicando uma significativa perda de fluidez da membrana (MEDANHA *et al.*, 2012). Evidências indicam que, sob estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, a hemoglobina pode interagir de forma anormal com proteínas do citoesqueleto em eritrócitos humanos, resultando em ligações cruzadas (SNYDER *et al.*, 1985). Alterações no parâmetro 2A_{//} de cerca de 2 G são geralmente associadas à peroxidação de lipídios em membranas celulares (ALONSO, QUEIROZ & MAGALHÃES, 1997; CHEN *et al.*, 2002). Contudo, os aumentos significativamente mais altos observados neste estudo em torno de 6 G apontam para a possível formação de ligações cruzadas em proteínas de membrana (cross-linking), uma modificação oxidativa significativa na arquitetura da membrana (MEDANHA *et al.*, 2012).

Em níveis controlados, as EROs exercem funções importantes na regulação de sinais intracelulares e na modulação da expressão gênica, sendo fundamentais para o funcionamento normal das células. No entanto, quando produzidas em excesso, essas moléculas rompem o equilíbrio redox, gerando um ambiente de estresse oxidativo. Esse desequilíbrio pode comprometer estruturas celulares essenciais, como lipídios, proteínas e DNA, e, em casos mais severos, desencadear processos de morte celular programada, como a apoptose (PERILLO *et al.*, 2020). Evidências indicam que os efeitos anticancerígenos do nerolidol estão relacionados à elevação dos níveis de EROs, que provoca danos ao DNA e ativa mecanismos de morte celular programada (MAHAMMADI *et al.*, 2024; ZHAO *et al.*, 2024)

O excesso de EROs desencadeia a peroxidação de lipídios nas membranas celulares, dando origem a subprodutos altamente reativos, como o malondialdeído e

o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). Este último destaca-se por ser um dos compostos mais bioativos e amplamente estudados, por possuir características anfifílicas, o 4-HNE tende a se acumular nas membranas biológicas, onde reage de forma covalente com fosfolipídios como a fosfatidiletanolamina (PE), originando adutos 4-HNE-PE (JOVANOVIĆ *et al.*, 2019). Além disso, o 4-HNE pode interagir com resíduos nucleofílicos em proteínas de membrana, ligando-se facilmente na cisteína, lisina e histidina, dessa forma, modificando tanto a organização estrutural quanto a funcionalidade de elementos essenciais da membrana, como canais iônicos, receptores e proteínas transportadoras. (POLI *et al.*, 2008).

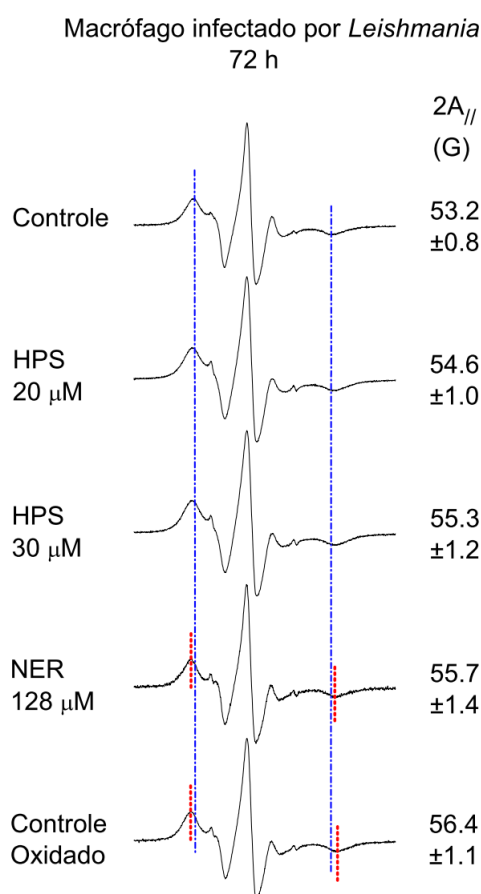
É interessante observar que promastigotas de *L. amazonensis* expostas diretamente ao 4-HNE exógeno apresentaram um aumento na rigidez da membrana, gerando espectros de RPE semelhantes aos obtidos neste estudo após o tratamento com nerolidol ou HPS (ALONSO *et al.*, 2022a). Esses resultados dão suporte à ideia de que o enrijecimento da membrana identificado neste trabalho é um efeito secundário do estresse oxidativo, provocado pelo acúmulo intracelular de EROs e pelas alterações bioquímicas subsequentes em lipídios e proteínas da membrana plasmática do parasita.

4.6 Efeitos de nerolidol e HPS na rigidez de membrana de macrófagos infectados por Leishmania

Buscando entender o impacto dos compostos sobre a integridade das membranas de parasitas internalizados, aplicou-se uma marcação de spin em culturas de macrófagos infectados por *Leishmania*. É esperado que nestas condições o marcador de spin 5-DSA predominantemente tenha acesso apenas às membranas externas dos macrófagos infectados com o parasita. Isso se deve, em grande parte, à redução do radical nítróxido presente no marcador de spin que ao adentrar o ambiente intracelular sofre redução, levando à perda do sinal de RPE. Essa redução pode ser promovida por componentes redutores presentes no citoplasma, como ácido ascórbico, íon ferroso (Fe^{2+}) e grupos tióis livres. Para contornar essa limitação e preservar a integridade do sinal, as medições por

espectroscopia de RPE foram realizadas 15 minutos após a marcação, assim não permitindo tempo suficiente para que o marcador penetre nas células e seja reduzido.

Figura 21- Espectros de RPE do 5-DSA mostraram aumentos na rigidez das membranas em macrófagos infectados por *Leishmania* após 72 h de tratamento com nerolidol e HPS, indicados pelo aumento no parâmetro $2A_{//}$. Em parte dos experimentos observou-se aumento na rigidez de membrana mesmo na ausência de tratamento, como indicado pelo espectro de RPE do grupo controle oxidado.



Fonte: Figura de autoria do grupo de biofísica-UFG.

Conforme apresentado na Figura 21, os espectros de RPE obtidos com o marcador de spin 5-DSA permitiram comparar a fluidez das membranas de macrófagos contendo amastigotas de *Leishmania* em diferentes condições experimentais, sem tratamento, ou após exposição a 20 e 30 µM de HPS e 128 µM de nerolidol. Nas amostras controle, a integridade da membrana se manteve

praticamente inalterada até 72 h após a infecção, apresentando um valor médio do parâmetro $2A_{//}$ de aproximadamente 53,2 G (espectro inicial). Em contraste, os tratamentos aplicados após a infecção, em concentrações próximas à IC_{50} para promastigotas e inferiores aos valores de CC_{50} previamente encontrados para os macrófagos (ALONSO *et al.*, 2019c; ALONSO *et al.*, 2019a), provocaram um aumento significativo na rigidez das membranas celulares, evidenciado por um acréscimo de cerca de 2 G no parâmetro $2A_{//}$.

É importante destacar que o enrijecimento da membrana também pode ser observado, ocasionalmente, em culturas infectadas que não foram submetidas a tratamento. Isso tende a ocorrer especialmente quando os macrófagos apresentam adesão deficiente ou comprometimento em sua integridade morfológica. Nessas condições, aumentos no parâmetro $2A_{//}$ podem surgir de forma espontânea em diferentes momentos após a infecção como 24, 48, 72 ou até 96 h conforme evidenciado no espectro de controle oxidado apresentado na Figura 20. Esses dados sugerem que, dependendo da intensidade da infecção, a morte dos macrófagos pode ocorrer independentemente de tratamento. Por outro lado, como foi demonstrado que nem o nerolidol nem o HPS promoveram alterações na fluidez da membrana de macrófagos não infectados (Figura 19), esse resultado reforça a ideia de que esses compostos exercem uma ação seletiva, afetando seletivamente as células infectadas pelo parasita *Leishmania*.

Considerando que os macrófagos utilizam EROs como parte de sua estratégia natural de defesa contra patógenos intracelulares (SUSKI *et al.*, 2019; HERB & SCHRAMM, 2021), é plausível supor que a presença do parasita induza uma produção localizada de EROs. Esse aumento pode iniciar uma cascata de peroxidação lipídica, culminando na geração de aldeídos altamente reativos, como o 4-HNE. Por sua natureza química, o 4-HNE é capaz de se difundir no ambiente intracelular e interagir diretamente com a membrana da célula hospedeira, formando adutos estáveis com proteínas, conhecidos como complexos 4-HNE-Michael (JOVANOVIĆ *et al.*, 2019; POLI *et al.*, 2008). Tais modificações são reconhecidas por afetar negativamente a fluidez da membrana. Portanto, o enrijecimento

observado nas membranas provavelmente reflete uma resposta oxidativa específica do macrófago infectado, que é acentuada pela presença do parasita.

4.7 Mecanismos de ação do nerolidol e HPS

É importante destacar que o aumento de EROs tem sido associado ao vazamento de íons através da membrana plasmática (BORGES et al., 2025). Estudos realizados com diferentes espécies de fungos indicam que o EROs é um dos principais mecanismos envolvidos na ação fungicida da anfotericina B (AmB) (MESA-ARANGO et al., 2014). Essa ação está intimamente relacionada à formação de poros na membrana plasmática, resultante da interação da AmB com o ergosterol, o que leva à criação de canais iônicos e consequente desequilíbrio eletrolítico celular. Esse vazamento de íons, por sua vez, tem sido associado ao aumento da produção de EROs, reforçando o papel do estresse oxidativo na indução da morte celular (MESA-ARANGO et al., 2014). Evidências indicam que a ação da AmB contra *Leishmania* envolve múltiplos efeitos celulares, incluindo alterações no potencial de membrana celular e mitocondrial, comprometendo a integridade da membrana plasmática, aumento da produção de EROs e indução de apoptose (KUMARI et al., 2022). De forma semelhante, a ivermectina também apresenta atividade antileishmânica, associada à elevação nos níveis de EROs e à modulação do potencial mitocondrial (REIS et al., 2021). Esse fármaco atua ativando canais de cloreto dependentes de glutamato presentes no parasita, promovendo um influxo de íons cloreto e levando à hiperpolarização da membrana plasmática (REIS et al., 2021). Análises por espectroscopia de RPE do 5-DSA mostraram que a ivermectina promove aumento na rigidez da membrana plasmática de *L. amazonensis* após 24 h de tratamento, gerando perfis espectrais semelhantes aos observados neste estudo com nerolidol e o HPS (ALONSO, DORTA & ALONSO, 2022b). Coletivamente, os resultados de RPE sugerem que as alterações iniciais na fluidez de membrana, induzidas por agentes leishmanicidas, estão ligadas à disfunção mitocondrial e ao acúmulo de EROs. Perturbações na membrana, ao promoverem vazamento de íons, provavelmente constituem um mecanismo primário subjacente à atividade leishmanicida desses compostos.

Substâncias de natureza hidrofóbica, como o nerolidol e o surfactante HPS, caracterizam-se por elevados coeficientes de partição em membranas biológicas (ALONSO *et al.*, 2019c; ALONSO *et al.*, 2019a), o que favorece sua incorporação à bicamada e alteração da dinâmica de membrana, efeito comprovado neste estudo. Essa modificação estrutural pode levar a distúrbios no equilíbrio iônico celular. Para explicar a passagem de pequenas moléculas e íons através das bicamadas lipídicas, dois mecanismos principais têm sido propostos: o primeiro associa essa permeação à afinidade do composto pela fase hidrofóbica da membrana e à sua difusão através da bicamada; e o segundo modelo propõe que a travessia iônica ocorre devido à formação de poros transitórios na estrutura lipídica (VOLKOV, PAULA & DEAMER, 1997; GURTOVENKO & VATTULAINEN, 2007). Ambas as abordagens preveem que a permeabilidade aos íons aumenta diante da maior fluidez da bicamada ou com elevação da temperatura.

Reconhecido como um eficaz intensificador de permeação cutânea, o nerolidol tem demonstrado a capacidade de aumentar significativamente a absorção transdérmica de diversos fármacos, como cloridrato de nicardipina, hidrocortisona, carbamazepina, tamoxifeno (EL-KATTAN *et al.*, 2001) e diclofenaco sódico (NOKHODCHI, *et al.*, 2007). Essa ação está relacionada à sua natureza hidrofóbica e à alta afinidade por membranas biológicas, características que o qualificam como uma pequena molécula lipofílica capaz de interagir diretamente com a bicamada lipídica. Ao se inserir entre as cadeias de lipídios, o nerolidol atua como um espaçador, rompendo o empacotamento ordenado dessas cadeias, o que resulta em maior desorganização molecular e aumento da fluidez da membrana (MENDANHA & ALONSO, 2015).

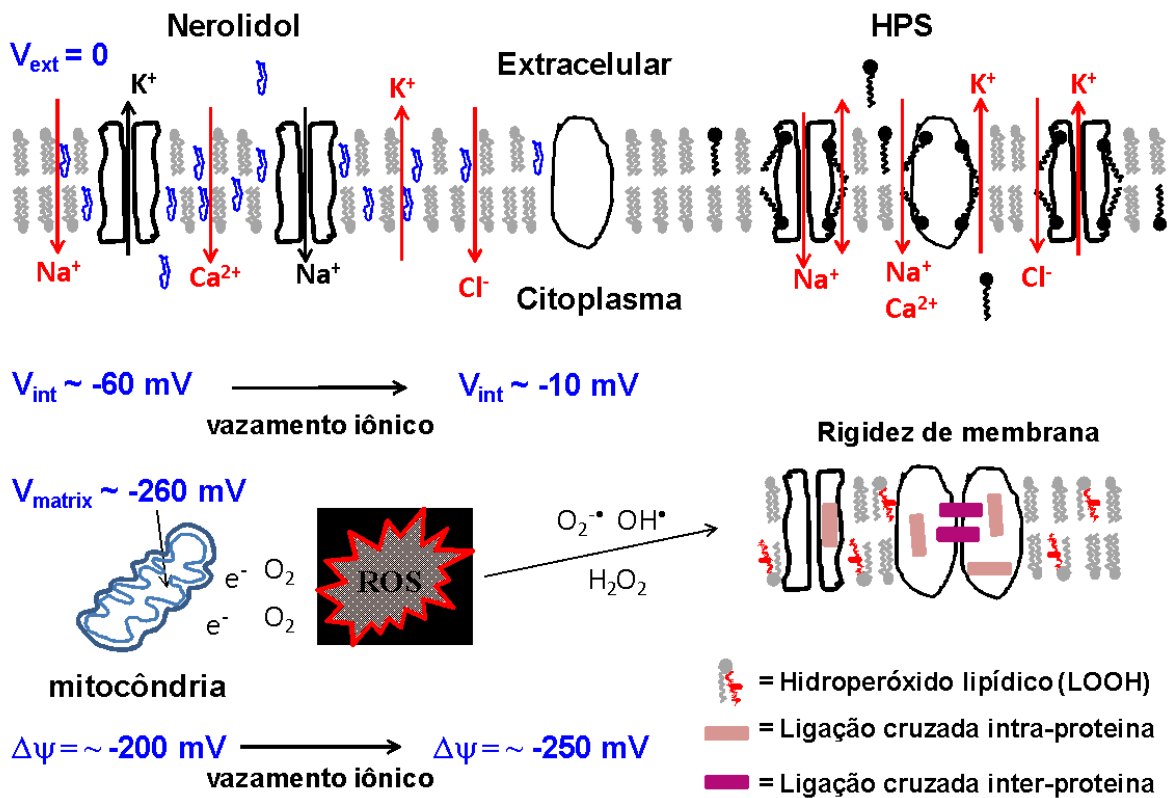
O nerolidol se destaca por agir sobre o componente lipídico da membrana do parasita, promovendo maior fluidez, sem provocar alterações relevantes na mobilidade das proteínas de membrana (ALONSO *et al.*, 2019a; CAMARGOS *et al.*, 2014). Em contraste, o surfactante HPS exibe um perfil de atuação semelhante ao da miltefosina, afetando principalmente os componentes proteicos da membrana e aumentando sua dinâmica molecular (ALONSO *et al.*, 2019c). O aumento na

mobilidade das proteínas de membrana pode comprometer a integridade da barreira celular, favorecendo o vazamento de íons tanto por meio de canais protéicos quanto nas interfaces entre proteínas e lipídios. Quando essas proteínas transmembrana tornam-se mais dinâmicas, é provável que interfiram no arranjo organizado dos lipídios ao seu redor. Esse distúrbio estrutural pode facilitar a formação temporária de poros ou gerar microdomínios com organização lipídica alterada. Como resultado, a energia necessária para que pequenas moléculas ou íons atravessem a bicamada é significativamente reduzida, favorecendo o aumento da permeabilidade da membrana.

Os efeitos de nerolidol e HPS sobre *Leishmania amazonensis* são representados de forma esquemática na Figura 22, com ênfase nas alterações do potencial elétrico e na integridade da membrana celular. Por convenção, o potencial elétrico no meio extracelular é considerado 0 mV, enquanto no interior da célula, ele costuma estar em torno de -60 mV. Como a membrana externa da mitocôndria é permeável a íons, o espaço intermembranas mantém esse mesmo potencial de -60 mV. O potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi_m$) é cerca de -200 mV, o que resulta em um potencial total na matriz em torno de -260 mV. Com a ação do nerolidol e HPS, que possivelmente induzem o vazamento de íons através da membrana plasmática do parasita, resulta na despolarização de membrana, fazendo o potencial elétrico citoplasmático aumentar, podendo chegar a aproximadamente -10 mV. Essa mudança abrupta gera um aumento no potencial de membrana mitocondrial, que inicialmente se hiperpolariza, e seu potencial de membrana pode aumentar de -200 para cerca de -250 mV. Embora a célula disponha de mecanismos regulatórios para evitar variações extremas, alterações muito intensas no potencial de membrana favorecem o escape de elétrons, especialmente nos complexos I e III da cadeia respiratória. Esses elétrons livres podem reagir com o oxigênio, formando ânions superóxidos, uma forma de EROs altamente tóxicas para a célula (SU *et al.*, 2023). A produção exacerbada de EROs desencadeia uma série de eventos celulares adversos, entre eles a peroxidação lipídica e consequente rigidez de membrana, comprometendo a funcionalidade estrutural e fisiológica do parasita.

Figura 22- Ilustração esquemática que demonstra a ação do nerolidol e HPS causando aumento da fluidez da membrana em *L. amazonensis*, promovendo vazamento iônico, despolarização plasmática, hiperpolarização mitocondrial e acúmulo de EROs que oxidam a membrana em até 24 h.

Fluidez de membrana aumentada → vazamento iônico → ROS → rigidez de membrana



Fonte: Figura de autoria do grupo de biofísica-UFG.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que tanto o nerolidol quanto o HPS demonstraram capacidade de fluidizar a membrana plasmática *Leishmania amazonensis*, atuando de maneira distinta, onde nerolidol interfere diretamente nos componentes lipídicos, enquanto que o HPS exerce seu efeito sobre as proteínas da membrana. Nos ensaios antiproliferativos realizados por um período de 24 h, ambos os compostos induziram um aumento significativo na rigidez da membrana plasmática do parasita, fenômeno associado à peroxidação lipídica e à oxidação proteica. Quando avaliados em macrófagos da linhagem J774.A1, a fluidificação da membrana foi observada logo após o tratamento, mas mesmo em concentrações elevadas, não foi observada a rigidez de membrana após 24 h de exposição. Já em macrófagos infectados por *Leishmania*, a rigidez da membrana foi detectada após 72 h de tratamento com nerolidol ou HPS para concentrações um pouco acima de seus valores de IC₅₀. Em alguns casos isolados a rigidez ocorreu mesmo na ausência de compostos. A avaliação da citotoxicidade em macrófagos derivados da linhagem THP-1, um modelo mais representativo do sistema imune humano, revelou valores médios de CC₅₀ cerca de nove vezes superiores aos registrados em células J774A.1, indicando menor toxicidade em um modelo de maior relevância fisiológica e reforçando o perfil seletivo dos compostos para o parasita. Esses achados reforçam a hipótese de que o nerolidol e o HPS agem preferencialmente sobre a membrana do parasita, provocando o vazamento de eletrólitos e a consequente despolarização das membranas plasmática e mitocondrial. A sequência de eventos desencadeada por essas alterações leva a danos estruturais irreversíveis, resultando na morte do parasita. Esses resultados sugerem que nerolidol e HPS apresentam potencial como candidatos terapêuticos seletivos no tratamento da leishmaniose cutânea, especialmente em formulações tópicas, e merecem investigação futura em modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALONSO, L. et al. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of nerolidol are associated with changes in plasma membrane dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1861, n. 6, p. 1049–1056, 16 mar. 2019a.

ALONSO, L. et al. Interactions of miltefosine with erythrocyte membrane proteins compared to those of ionic surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 23–30, 18 abr. 2019b.

ALONSO, L. et al. Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared to those of miltefosine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 183, p. 110421, 5 ago. 2019c.

ALONSO, et al. Atividade antileishmania do derivado de chalcona LQFM064 associada à redução da fluidez na membrana do parasita, avaliada por espectroscopia EPR. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 151, p. 105407, 2020.

ALONSO, A.; QUEIROZ, C. S.; MAGALHÃES, A. C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1323, n. 1, p. 75-84, 1997.

ALONSO, L.; DORTA, M. L.; ALONSO, A. Ivermectin and curcumin cause plasma membrane rigidity in *Leishmania amazonensis* due to oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1864, n. 9, p. 183977, 2022b.

ALONSO, L. et al. Plasma membrane rigidity effects of 4-hydroxy-2-nonenal in *Leishmania*, erythrocyte and macrophage. **Toxicology in Vitro**, v. 79, p. 105294, 2022a.

ALONSO, L. et al. Plasma membrane rigidity effects of 4-hydroxy-2-nonenal in *Leishmania*, erythrocyte and macrophage. **Toxicology in Vitro**, v. 79, p. 105294, 2022a.

ARRUDA, D. C. et al. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 49, n. 5, p. 1679–1687, 2005.

AWAB, G. R. *Leishmaniasis Epidemiology and Psychosocial Aspect*. **IntechOpen eBooks**, 2023.

ATHERTON, N. M. **Principles of electron spin resonance**. New York: Ellis Horwood, 1993.

ATKINS, Peter; DE PAULA, Julio. **Físico-química**. 9. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.

AZEVEDO, B. R. S. D.; GRAMATGES, A. P. Estabilidade de espumas líquidas de soluções de surfactantes: efeito de misturas e adição de nanopartículas. **Revista Brasileira de Iniciação Científica, Itapetininga**, v. 3, n. 7, pp. 58, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/saude-lanca-paineis-para-monitorar-leishmanioses-no-brasil>>. Acesso em: 19 mar. 2025.

BENAIM, G.; PANIZ-MONDOLFI, A. Unmasking the Mechanism behind Miltefosine: Revealing the Disruption of Intracellular Ca²⁺ Homeostasis as a Rational Therapeutic Target in Leishmaniasis and Chagas Disease. **Biomolecules**, v. 14, n. 4, p. 406, 2024.

BESSA, I. A. A. *et al.* Innovating Leishmaniasis Treatment: A Critical Chemist's Review of Inorganic Nanomaterials. **ACS Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 2485–2506, 2024.

BRUSTOLON, M.; GIAMELLO, E. **Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioners Toolkit**. John Wiley & Sons, 2009.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends in immunology**, v. 36, n. 3, p. 161-178, 2015.

BORGES, Ellyêssa Nascimento *et al.* Miltefosine and amphotericin B induce membrane rigidity in *Leishmania amazonensis* and *Leishmania*-infected macrophages. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, p. 110417, 2025.

CHEN, L. *et al.* Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. **Toxicological sciences**, v. 69, n. 1, p. 149-156, 2002.

CAMARGOS, H. S. *et al.* Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC₅₀ values. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104429, 2014.

CHAN, W. K. *et al.* Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 529, 2016.

CORNWELL, P. A.; BARRY, B. W. Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 261-269, 1994.

CHOJNACKI, Tadeusz; DALLNER, Gustav. The biological role of dolichol. **Biochemical Journal**, v. 251, n. 1, p. 1, 1988.

NOKHODCHI, A. et al. The effect of terpene concentrations on the skin penetration of diclofenac sodium, **Int. J. Pharm.** v. 335, e.1-2, 2007.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis: Biology, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso

em: 10 de Abril de 2025.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and risk factors, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>. Acesso em: 14 de Abril de 2025.

DE AZEREDO-COUTINHO, R. B.; MENDONÇA, S. C.F. 18. **Formas Clínicas das Leishmanioses Tegumentares nas Américas**. Editora Fiocruz. 2014.

DE VRIES, H. J. C.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 23, p. 1–18, 2022.

DOUGLAS,. **Leishmania Species : Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucosal Leishmaniasis - Clinical Tree**. Disponível em: <<https://clinicalpub.com/leishmania-species-visceral-kalaazar-cutaneous-and-mucosal-leishmaniasis/>>. Acesso em: 11 de abril de 2025.

EFSTATHIOU, A.; SMIRLIS, D. Leishmania Protein Kinases: Important Regulators of the Parasite Life Cycle and Molecular Targets for Treating Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 691, 2021.

EL-KATTAN, A. F. et al. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, n. 1-2, p. 229-240, 2001.

FONSÊCA, D. V. et al. Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 14–22, 2015.

FUJII, J.; OSAKI, T. Involvement of nitric oxide in protecting against radical species and autoregulation of M1-polarized macrophages through metabolic remodeling. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 814, 2023.

FAUST, J. R.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Synthesis of ubiquinone and cholesterol in human fibroblasts: regulation of a branched pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 192, n. 1, p. 86–99, 1979.

GRANADO, I. A. et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601–618, 2021.

GONÇALVES, R. A.; HOLMBERG, K.; LINDMAN, B. Cationic surfactants: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 375, p. 121335, 2023.

GINGER, Michael L. et al. The biosynthetic incorporation of the intact leucine skeleton into sterol by the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 15, p. 11674-11682, 2001.

GURTOVENKO, A. A.; VATTULAINEN, I. Ion leakage through transient water pores in protein-free lipid membranes driven by transmembrane ionic charge imbalance. **Biophysical journal**, v. 92, n. 6, p. 1878-1890, 2007.

HAGKHAN, W.; SHARMA, S. S.; KUMAR, N.. Bioanalytical method development, pharmacokinetics, and toxicity studies of paromomycin and paromomycin loaded in albumin microspheres. *Drug Testing and Analysis*, v. 5, n. 6, p. 453-460, 2013. EN, W. **Biomolecular EPR Spectroscopy**. CRC, Boca Raton, FL, 2009.

HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1411, n. 2-3, p. 378–384, 1999.

HERB, M.; SCHRAMM, M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity. **Antioxidants (Basel)**, v. 10, n. 2, p. 313, . 2021.

JOVANOVIĆ, O. et al. Covalent modification of phosphatidylethanolamine by 4-hydroxy-2-nonenal increases sodium permeability across phospholipid bilayer membranes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 143, p. 433-440, 2019.

KUMARI, S. et al. Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 235, p. 106661, 2022.

KHAN, W.; SHARMA, S. S.; KUMAR, N.. Bioanalytical method development, pharmacokinetics, and toxicity studies of paromomycin and paromomycin loaded in albumin microspheres. **Drug Testing and Analysis**, v. 5, n. 6, p. 453-460, 2013.

LANDFEAR, S. M. New Vistas in the Biology of the Flagellum—*Leishmania* Parasites. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 447, 2022.

LAZAR, L. Y.; ABASS, K. S. Morphology, life cycle, pathogenesis and virulence factors of genus Leishmania: a review. **Plant Archives**. v. 20 n. 2, p. 4057-4060, 2020.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nature Medicine** , v. 19, n. 7, p. 909-915, 2013.

LAM, P. L. et al. The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review. **Interações químico-biológicas** , v. 320, p. 109023, 2020.

MARCONDES, C. B.; LOZOVEI, A. L.; EUNICE. Variações regionais e interespecíficas na morfologia de insetos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Revista de saúde pública/Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, p. 519–525, 1998.

MENDANHA, S. A. et al. Electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components of erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 473-481, 2012.

MENDANHA, S. A. et al. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 1, p. 323-329, 2013.

MENDANHA, S. A.; ALONSO, A. Effects of terpenes on fluidity and lipid extraction in phospholipid membranes. **Biophysical chemistry**, v. 198, p. 45-54, 2015.

MENDES, A. et al. 1, 2, 4-trioxolane and 1, 2, 4, 5-tetraoxane endoperoxides against Old-World *Leishmania* parasites: In vitro activity and mode of action. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 4, p. 446, 2022.

MAHAMMADI, A. et al. A review of the anticancer effects of the sesquiterpene nerolidol in different malignant conditions, **J. Med. Plants** 23(89), 1-16, 2024.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MONACHESI, C. F.; SILVA, A. G.; FILIPE ANIBAL CARVALHO-COSTA F. A. C. Factors associated with mucosal involvement in tegumentary leishmaniasis: a nation-based study using surveillance data from Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 65, 2023.

MARTINS, I. M. L. *et al.* Visceral leishmaniasis: historical series of hospitalized patients and correlation with climate in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, 2021.

MANN, S. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2021.

MATHISON, B. A.; BRADLEY, B. T. Review of the Clinical Presentation, Pathology, Diagnosis, and Treatment of Leishmaniasis. **Laboratory Medicine**, 2022.

MARCONDES, C. B.; LOZOVEI, A. L.; EUNICE. Variações regionais e interespecíficas na morfologia de insetos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Revista de saúde pública/Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, p. 519–525, 1998.

MOREIRA, R. A. *et al.* Miltefosine increases lipid and protein dynamics in *Leishmania amazonensis* membranes at concentrations similar to those needed for cytotoxicity activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3021-3028, 2014.

MCLACHLAN, A. A.; MARANGONI, D. G. Interactions between zwitterionic and conventional anionic and cationic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 295, n. 1, p. 243–248, 2006.

MESA-ARANGO, Ana Cecilia *et al.* The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627-6638, 2014.

NOKHODCHI, A. *et al.* The effect of terpene concentrations on the skin penetration of diclofenac sodium, **Int. J. Pharm.** v. 335, e.1-2, 2007.

NERY, R. L. A. *et al.* *Leishmania* spp. genetic factors associated with cutaneous leishmaniasis antimony pentavalent drug resistance: a systematic review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 119, 2024.

OPAS. Organização Pan- Americana da Saúde. Leishmaniose. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose> Acesso em: 11 mar. 2025

OPAS. Organização Pan- Americana da Saúde. Leishmanioses: informe epidemiológico da Região das Américas. N°13, dezembro de 2024. Washington, D.C.: OPS; 2024. Disponível em: [hps://iris.paho.org/handle/10665.2/51742](https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742). Acesso em: 13 mar. 2025

OPAS. Organização Pan- Americana da Saúde. Diretrizes para o tratamento da leishmaniose na Região das Américas. Disponível em:

<https://www.paho.org/pt/documentos/diretrizes-para-tratamento-das-leishmanioses-na-regiao-das-americas-segunda-edicao>. Acesso em: 10 mar. 2025

OPAS. Organização Pan- Americana da Saúde. Plano de ação para fortalecer a vigilância e o controle das leishmanioses nas Américas, 2023–2030. Washington, D.C. 2024. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/61620>. Acesso em: 15 mar. 2025.

OPAS. Organização Pan- Americana da Saúde. Leishmaniose cutânea e mucosa. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-cutanea-e-mucosa>. Acesso em: 10 mar. 2025.

PRADHAN, S. et al. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516–521, 2022.

PERUSSI, J. R.; RUGGIERO, A. C.; TABAK, M. Metodo de marcadores de spin aplicado a bioquimica. **Química Nova**, v. 8, n. 4, p. 313-24, 1985.

POOLE, C. P. Electron spin resonance: a comprehensive treatise on experimental techniques. **No Title**, 1967.

PALIĆ, S; BEIJNEN, J. H.; DORLO, T. P. C. An update on the clinical pharmacology of miltefosine in the treatment of leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 1, p. 106459–106459, 2022.

PRYOR, W. A.; SQUADRITO, G. L. The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **American Journal of Physiology**, v. 268, n. 5 Pt 1, p. L699–L722, 1995.

PÉREZ, S.; RIUS-PÉREZ, S. Macrophage polarization and reprogramming in acute inflammation: a redox perspective. **Antioxidants (Basel)**, v. 11, n. 7, p. 1394, 2022.

PERILLO, B. et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental & molecular medicine**, v. 52, n. 2, p. 192-203, 2020.

POLI, G. et al. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. **Medicinal research reviews**, v. 28, n. 4, p. 569-631, 2008.

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. **Surfactants and interfacial phenomena**. John Wiley & Sons, 2012.

ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 8965-8977, 2020.

REIS, T. A. R. et al. Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against *Leishmania infantum* and is therapeutic against visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 221, p. 108059, 2021.

RUBBO, H. et al. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent oxidation of low-density lipoprotein: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 324, n. 1, p. 15–25, 1995.

RILLING, H. C. et al. Prenylated proteins: the structure of the isoprenoid group. **Science**, v. 247, n. 4940, p. 318-320, 1990.

SUNTER, J.; GAIVOTA, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. DA R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543–e29510716543, 2021.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. **Parasitology Research**, v. 120, p. 1541-1554, 2021.

SUPRIEN *et al.* Pentavalent Antimony Associated with G-CSF in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Pathogens**, v. 13, n. 4, p. 301–301, 2024.

SUNDAR, S. et al. Safety and Effectiveness of Miltefosine in Post–Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: An Observational Study. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, 1, 2023.

SALMON, C. E. *et al.* Simulação de espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) através do programa NLSL. **Química Nova**, v. 30, p. 1240-1248, 2007.

SHABAN, S. M.; KANG, J.; KIM, D.-H. Surfactants: Recent advances and their applications. **Composites Communications**, v. 22, n. 100537, p. 100537, 2020.

SARKAR, R. et al. Properties and applications of amphoteric surfactant: A concise review. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 24, n. 5, p. 709–730, 2021.

SHMUELI, M.; BEN-SHIMOL, S. Review of Leishmaniasis treatment: can we see the forest through the trees?. **Pharmacy**, v. 12, n. 1, p. 30, 2024.

SNYDER, L. M. et al. Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. **The Journal of clinical investigation**, v. 76, n. 5, p. 1971-1977, 1985.

SU, L. et al. Mitochondria ROS and mitophagy in acute kidney injury. **Autophagy**, v. 19, n. 2, p. 401-414, 2023.

SUSKI, Jan et al. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. **Mitochondrial bioenergetics: Methods and protocols**, p. 357-381, 2018.

VOLKOV, A. G.; PAULA, S.; DEAMER, D. W. Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**, v. 42, n. 2, p. 153-160, 1997.

WIJNANT, G. J. et al. Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 223-228, 2018.

WEIL, John A.; BOLTON, James R. **Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications**. John Wiley & Sons, 2007.

WARE, J. M. et al. Efficacy and Tolerability of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 7, p. e2457–e2562, 28 out. 2020. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 14 de abril de 2025.

YAMANE, M. A.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Terpene penetration enhancers in propylene glycol/water co-solvent systems: effectiveness and mechanism of action. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 47, n. 12A, p. 978-989, 1995.

ZHAO, X. et al. Nerolidol, a bioactive compound, suppresses the growth of HCT-116 colorectal cancer cells through cell cycle arrest and apoptosis induction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 196, n. 3, p. 1365-1375, 2024.