

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ELLYÊSSA DO NASCIMENTO BORGES

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE TRÊS DERIVADOS DE CHALCONA E SUA
ASSOCIAÇÃO COM A RIGIDEZ DA MEMBRANA AVALIADA PELA
ESPECTROSCOPIA DE RPE**

GOIÂNIA
2023



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): Ellyêssa do Nascimento Borges

Título do trabalho: "Atividade Leishmanicida de três derivados de chalcona e sua associação com a rigidez da membrana avaliada pela espectroscopia de RPE"

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 31/07/2023, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de](#)

010101010

[novembro de 2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Ellyêssa Do Nascimento Borges, Usuário Externo**, em 23/08/2023, às 17:40, 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 **3928429** e o código CRC **1B7D6C4F**.

Referência: Processo nº 23070.042622/2023-81

SEI nº 3928429

ELLYÊSSA DO NASCIMENTO BORGES

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE TRÊS DERIVADOS DE CHALCONA E SUA
ASSOCIAÇÃO COM A RIGIDEZ DA MEMBRANA AVALIADA PELA
ESPECTROSCOPIA DE RPE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Farmácia da Universidade Federal de
Goiás para a obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.
Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso

GOIÂNIA
2023

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

Borges, Ellyêssa Nascimento

Atividade Leishmanicida de três derivados de chalcona e sua associação com a rigidez da membrana avaliada pela espectroscopia de RPE [manuscrito] / Ellyêssa Nascimento Borges. - 2023.
L, 50 f.: il.

Orientador: Prof. Antonio Alonso.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia, 2023.

Bibliografia.

Inclui gráfico, tabelas.

1. Leishmania. 2. Chalcona. 3. Fluidez da membrana. 4. Ressonância Paramagnética Eletrônica. I. Alonso, Antonio, orient. II. Título.

CDU 576.32/36



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos **11** dias do mês de **Agosto** do ano de **2023** iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “**Atividade Leishmanicida de três derivados de chalcona e sua associação com a rigidez da membrana avaliada pela espectroscopia de RPE**”, de autoria de **Ellyêssa do Nascimento Borges** do curso de **Farmácia**, da **Faculdade de Farmácia** da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo **Prof. Dr. Antonio Alonso** (IF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Ricardo Menegatti** (FF/UFG) e **Kleber Santiago Freitas e Silva** (ICB/UFG). Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 10,0 (**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 11/08/2023, às 17:42, 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 **Ricardo Menegatti, Professor do Magistério Superior**, em 23/08/2023, às 17:51, 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 24/08/2023, às 15:24, 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 **3928389** e o código CRC **2197E8D7**.

AGRADECIMENTOS

“A Deus toda honra, toda glória, todo louvor, toda gratidão e toda adoração” (Luh M). É com o coração repleto de emoção que dedico este espaço para agradecer, em primeiro lugar, a Deus, fonte de toda sabedoria, inspiração e orientação que permearam esta trajetória acadêmica. Foram cinco anos repleto de desafios, descobertas, conquistas, aprendizados, noites sem dormir e pensamentos de desistência. Mas, encontrei força e confiança na Sua presença, sabendo que sempre estava ao meu lado.

Cada passo dado foi possível graças à Sua graça e benevolência, guiando-me e abrindo portas quando parecia não haver caminho. Agradeço por cada dificuldade que me fez crescer, por cada obstáculo que me ensinou a perseverar e por cada momento de superação que mostrou que sou capaz. Agradeço pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho durante esta jornada acadêmica e também aquelas que já faziam parte da minha vida. Cada uma delas desempenhou um papel crucial e hoje expresso meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus pais, Edilamar e Silas Borges, que são parte de mim e foram os pilares que sustentaram meus sonhos e aspirações, sempre acreditando no meu potencial mesmo quando eu duvidava de mim mesmo. Este momento não teria sido possível sem o amor, apoio e dedicação incansável que vocês sempre me proporcionaram. Suas lições de vida, valores e exemplo moldaram meu percurso e continuam a ser minha fonte de inspiração.

À minha irmã Eidy Lara, que me inspira e me motiva a ser uma excelente profissional, assim como ela. Suas palavras sábias, incentivo incansável e exemplo a seguir me guiaram nos momentos desafiadores e nas horas de triunfo. Seu marido e meu cunhado Paulinho Borges, que nunca mediu esforços para me ajudar, sempre atendendo aos meus pedidos e incentivando-me com palavras de ânimo e compartilhando alegrias em cada uma das minhas conquistas.

À toda minha família, avós, tios e tias, primos e primas, que sempre acreditaram em mim e celebraram junto comigo. Cada um de vocês, de maneiras únicas, contribuiu para o meu crescimento, aprendizado e sucesso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Alonso, que desde o início da minha formação esteve ao meu lado, guiando-me com sabedoria, compartilhando conhecimento valioso e incentivando-me a ir além dos meus limites. Sua orientação

foi um farol que iluminou o meu caminho, direcionando-me na pesquisa, na análise e na elaboração deste trabalho. Suas contribuições foram muito além da esfera acadêmica e o seu compromisso em me ajudar a crescer como acadêmico e como pessoa é algo que vou levar comigo para o futuro.

Aos meus professores, que foram verdadeiros mestres e mentores, ensinando-me com sabedoria e paciência no processo de aprendizado. Suas palavras de encorajamento e conhecimentos compartilhados foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico.

Às minhas amigas, Maria Cláudia Passos e Nathália Fogaça, que foram minhas companheiras nesses 5 anos de graduação. As nossas conversas encorajadoras, as risadas compartilhadas e os momentos de estudo colaborativo, mesmo virando a noite, tornaram esta jornada acadêmica muito mais memorável e recompensadora. O apoio, a amizade e as memórias que compartilhamos ao longo destes anos foram um presente inestimável que enriqueceu minha experiência universitária.

À Jaqueline Desordi, que se tornou minha amiga e vizinha, e compartilhou sua sabedoria e ofereceu uma mão amiga quando mais precisei. A sua presença foi um verdadeiro presente e uma constante fonte de motivação. Sua amizade e proximidade fizeram toda a diferença para alcançar os meus objetivos acadêmicos.

Ao meu namorado, Elias Soares, que entrou na minha vida no final da graduação, mas foi uma fonte constante de incentivo e apoio. A sua presença tornou os dias de pesquisa e escrita mais agradáveis e inspiradores. Que possamos continuar a apoiar e motivar um ao outro em todos os desafios que a vida nos apresentar.

Ao Laboratório de Biofísica do Instituto de Física, que me fez apaixonar pela ciência e foi um grande aliado na aquisição de experiências. As instalações de ponta, os recursos de pesquisa e as oportunidades de desenvolvimento proporcionadas foram fundamentais para a minha realização acadêmica.

À minha instituição, Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade de ter um ensino de qualidade e pelo compromisso em fomentar o aprendizado, a pesquisa e a inovação.

À Faculdade de Farmácia, por contribuir significativamente para a minha formação acadêmica, por me preparar para os desafios futuros e por me tornar uma profissional capacitada.

"Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".

Josué 1:9

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Leishmaniose: Transmissão, Epidemiologia e Manifestações	13
1.2	Tratamento Farmacológico	17
1.3	Chalconas	21
1.4	Espectroscopia de RPE	24
1.5	Justificativa	27
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Geral	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Aspectos gerais da síntese	28
3.2	Cultivo de parasitas e macrófagos	29
3.3	Atividade antiproliferativa com promastigotas	29
3.4	Atividade antiproliferativa com amastigotas	30
3.5	Avaliação da citotoxicidade	30
3.6	Medições de RPE	31
3.6.1	Preparo e marcação das amostras	31
3.6.2	Condições instrumentais	32
3.7	Análise estatística	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Atividade antiproliferativa e citotóxica	33
4.2	Efeito de rigidez de membrana no parasita	34
4.3	Atividade antiproliferativa e efeitos de rigidez de membrana dos compostos foram dependentes da concentração celular	35
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	44
7	PERSPECTIVAS	45
8	REFERÊNCIAS	45

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE TRÊS DERIVADOS DE CHALCONA E SUA ASSOCIAÇÃO COM A RIGIDEZ DA MEMBRANA AVALIADA PELA ESPECTROSCOPIA DE RPE

Borges, E. N.¹; Alonso, A.²

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás

²Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada que afeta as populações mais pobres do mundo. Atualmente, as opções terapêuticas possuem alta toxicidade, com regimes terapêuticos prolongados. Ainda, o surgimento de resistência destaca a necessidade de buscar novos agentes terapêuticos. As chalconas são precursoras da biossíntese de flavonoides com potencial clínico para o tratamento da leishmaniose. Novos compostos do tipo chalcona, LQFM332 (**4**), LQFM333 (**5**) e LQFM341 (**6**), foram sintetizados e sua atividade contra *Leishmania (L.) amazonensis* foi avaliada através da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e de ensaios de viabilidade celular. O composto **4** foi sintetizado a partir da hibridação molecular de vanilina (**9**) e hidroxitolueno butilado (BHT), formando uma estrutura de chalcona. O BHT foi substituído por outra apocinina para gerar o composto **5**, enquanto para o composto **6** a ligação dupla do aceitador de Michael do composto **4** foi reduzida. Para os ensaios de viabilidade celular, os valores de IC₅₀ para os compostos **4**, **5** e **6** contra o parasita *Leishmania* foram 7, 20 e 16 µM para a forma promastigota e 19, 11 e 1 µM para a forma amastigota dentro de macrófagos infectados, respectivamente. A espectroscopia de RPE de um marcador de spin lipídico incorporado na membrana plasmática do parasita demonstrou que o tratamento com esses compostos em meio de cultura causa rigidez da membrana de maneira dependente da concentração, devido a processos oxidativos. A partir dos valores de IC₅₀ com diferentes concentrações celulares, pode-se estimar o coeficiente de partição membrana-água (K_{MW}) dos compostos, bem como suas concentrações na membrana (c_{m50}) e no meio aquoso (c_{w50}) que reduzem a atividade antiproliferativa em 50%. Os valores desses parâmetros biofísicos foram semelhantes aos relatados para o fármaco antileishmania miltefosina (**13**). Os valores de K_{MW} indicaram que os compostos possuem alta afinidade pela membrana do parasita, sendo o composto contendo o grupo BHT o de maior afinidade. O composto **5**, contendo duas subunidades de 4-hidroxi-3-metoxifenil, apresentou os maiores valores de c_{w50} e c_{m50} . O composto **6** mostrou que a redução da dupla ligação diminui a afinidade pela membrana e o valor de c_{w50} , mas manteve o c_{m50} , demonstrando a mesma atividade do composto **4** para ensaios com maior concentração de células. Como as atividades citotóxicas foram moduladas por efeitos na membrana celular, os resultados sugerem que a ação primária dos compostos é na membrana do parasita.

Palavras-chave: *Leishmania*; chalcona; fluidez da membrana; ressonância paramagnética eletrônica.

ANTILEISHMANIAL ACTIVITIES OF THREE CHALCONE DERIVATIVES AND THEIR ASSOCIATION WITH PLASMA MEMBRANE RIGIDITY AS ASSESSED BY EPR SPECTROSCOPY

Borges, E. N.¹; Alonso, A.²

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás

²Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease that affects the world's poorest populations. Currently, therapeutic options have high toxicity, with prolonged therapeutic regimens. Still, the emergence of resistance highlights the need to seek new therapeutic agents. Chalcones are precursors of flavonoid biosynthesis with clinical potential for the treatment of leishmaniasis. Novel chalcone-like compounds, LQFM332 (**4**), LQFM333 (**5**), and LQFM341 (**6**), were synthesized and their activity against *Leishmania (L.) amazonensis* was evaluated using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy and assays of cell viability. Compound **4** was synthesized from the molecular hybridization of vanillin (**9**) and butylated hydroxytoluene (BHT), forming a chalcone scaffold. BHT was replaced by another apocynin to give compound **5**, while for compound **6** the Michael acceptor double bond from compound **4** was reduced. For cell viability assays, the IC₅₀ values for compounds **4**, **5**, and **6** against the *Leishmania* parasite were 7, 20, and 16 μM for the promastigote form, and 19, 11, and 1 μM for the amastigote form inside infected macrophages, respectively. EPR spectroscopy of a lipid spin label incorporated into the parasite plasma membrane demonstrated that treatment with these compounds in culture medium causes membrane rigidity in a concentration-dependent manner, owing to oxidative processes. From the IC₅₀ values with different cell concentrations, the membrane-water partition coefficient (K_{M/W}) of the compounds could be estimated, as well as their concentrations in the membrane (C_{m50}) and in the aqueous culture medium (C_{w50}) that reduce antiproliferative activity by 50%. Values for these biophysical parameters were similar to those reported for the antileishmanial drug, miltefosine. K_{M/W} values indicated that the compounds have high affinity for the parasite membrane, with the compound containing the BHT group having the highest affinity. Compound **5**, which contained a two 4-hydroxy-3-methoxyphenyl scaffold, showed the highest values of C_{w50} and C_{m50}. Compound **6** showed that the reduction of the double bond decreased the membrane affinity and the C_{w50} value, but maintained the C_{m50}, demonstrating the same activity as compound **4** for assays with higher concentration of cells. As cytotoxic activities were modulated by effects on the cell membrane, our results suggest that the primary action of the compounds is on the parasite membrane.

Keywords: *Leishmania*; chalcone; membrane fluidity; electron paramagnetic resonance.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose: Transmissão, Epidemiologia e Manifestações

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas de mais de vinte espécies do gênero *Leishmania* (MANN et al., 2021). A transmissão desses parasitas ocorre através da picada de uma fêmea infectada da subfamília do flebotomíneo, um minúsculo inseto vetor de 2 a 3 mm de comprimento (WHO, 2018). A fêmea do flebotomíneo, cuja atividade é mais intensa durante as horas noturnas, do crepúsculo ao amanhecer, transmite o parasita da leishmaniose para humanos ou outros reservatórios animais (MANN et al., 2021).

O ciclo de vida da *Leishmania spp.* é composto por duas fases distintas: amastigota e promastigota (Fig. 1). A forma promastigota possui um flagelo que lhe confere mobilidade no intestino do flebotomíneo (CDC, 2020). Quando o inseto se alimenta do sangue de um hospedeiro mamífero, ele injeta a forma promastigota na pele, que é fagocitada por células mononucleares do hospedeiro, principalmente pelos macrófagos. Nessas células, os promastigotas se transformam no estágio tecidual do parasita, isto é, na forma amastigota (CDC, 2020).

Figura 1. Formas evolutivas do parasita *Leishmania*. (A) Forma amastigota, que se desenvolve no vacúolo digestivo dos macrófagos. (B) Forma promastigota, predominante no intestino de insetos contaminados e que possui flagelo.

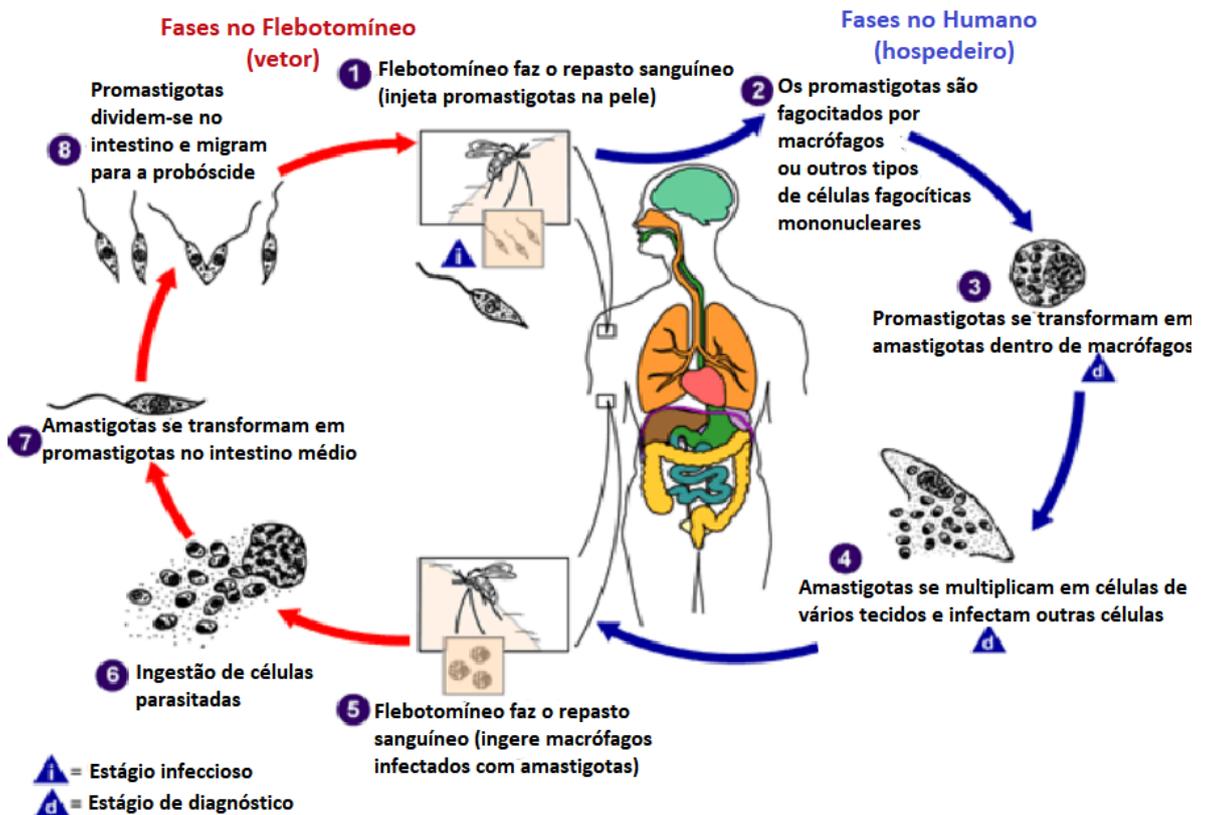


Fonte: Adaptado de Fernandes (2016).

Dentro do hospedeiro, os amastigotas se multiplicam por divisão simples e se desenvolvem no sistema retículo-endotelial ou sistema mononuclear fagocitário, infectando outras células fagocíticas mononucleares e causando formas assintomáticas ou sintomáticas da doença com base em fatores subjacentes do hospedeiro e da espécie parasitária (PAHO, 2019; CDC, 2020). Os amastigotas podem se disseminar por via hematogênica e linfática, evoluindo em formas mais graves da leishmaniose, como a cutânea e visceral (PAHO, 2019).

Ao se alimentarem do sangue de um hospedeiro infectado, as fêmeas dos flebotomíneos são infectadas pela ingestão de macrófagos parasitados por amastigotas, que após serem ingeridas, são liberadas no intestino médio, onde sofrem divisão celular e se transformam em promastigotas, que migram para a probóscide do inseto e infecta outro hospedeiro ao fazer repasto sanguíneo, iniciando novamente o ciclo biológico da *Leishmania spp.*, conforme ilustrado na Figura 2 (CDC, 2020).

Figura 2. Representação do ciclo biológico dos protozoários do gênero *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de CDC (2020).

A transmissão do parasita é predominantemente causada por infecção sintomática, uma vez que casos assintomáticos não são considerados fonte de infecção para os flebotomíneos (MONDAL et al., 2019). Em algumas regiões, os humanos são responsáveis por manter o ciclo de vida do parasita (transmissão antroponótica). No entanto, alguns animais, como cães, roedores, marsupiais e macacos, podem ser hospedeiros suscetíveis, mantendo o ciclo e não apresentando sinais ou sintomas de doença (PAHO, 2019; FAYE et al., 2010). Além disso, a leishmaniose pode ser transmitida de forma menos comum por meio de transplante de órgãos, transfusão de sangue, uso de fármacos intravenosos ou de forma congênita (MANN et al., 2021).

A leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada (DTN), uma vez que afeta os indivíduos mais pobres de mais de 90 países nas porções dos trópicos e subtropicais (MANN et al., 2021; HOTEZ et al., 2020). Dentre as DTNs, a leishmaniose está associada à significativa incidência, morbidade e mortalidade, tornando-se a DTN mais mortal, segundo estimativas globais recentes (HERNÁNDEZ et al., 2020; HERRICKS et al., 2017). Existem 3 formas principais de leishmanioses (visceral, mucocutânea e cutânea), que apresentam características clínicas e epidemiológicas diferentes (MANN et al., 2021; SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021).

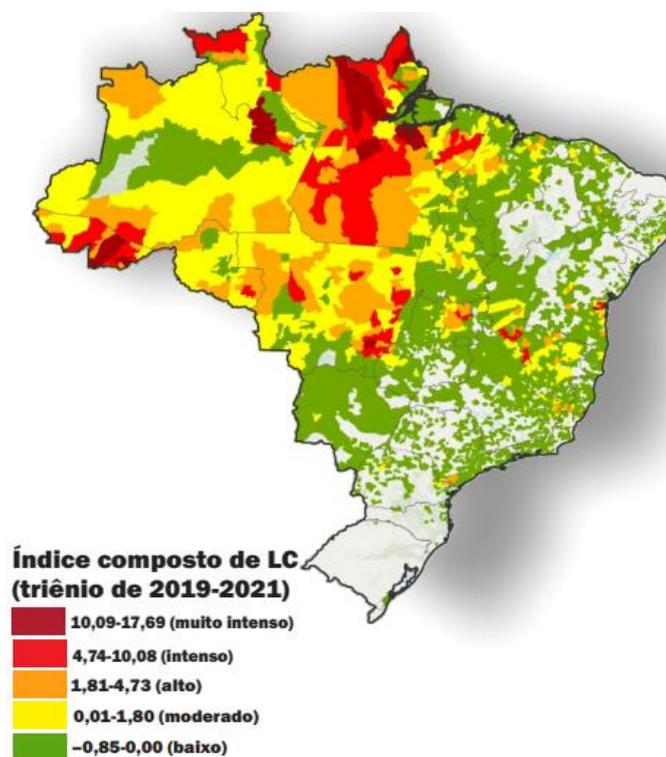
A leishmaniose visceral (LV), conhecida também como calazar, é a mais grave pois se não for tratada é fatal em mais de 95% dos casos (WHO, 2018). É caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso, anemia e baço e fígado aumentados (Fig. 4C). As espécies que são tipicamente associadas a essa doença visceral são *Leishmania (L.) donovani* e *L. infantum*. A maioria dos casos ocorre no Brasil, Índia, Nepal, Sudão, China, Etiópia, Quênia e Somália, com estimativa anual de 50.000 a 90.000 novos casos (SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021; MANN et al., 2021; WHO, 2018).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é a forma mais incapacitante, pois leva à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta (Fig. 4D), sendo frequentemente causada pelo subgênero *L. Viannia*. Estima-se que mais de 90% dos casos ocorrem no Estado Plurinacional da Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (MANN et al., 2021; WHO, 2018).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum e causa lesões de pele, principalmente úlceras (Fig. 4A), em partes expostas do corpo, geralmente no local da picada do flebotomíneo. Dentre as mais de 20 espécies que causam esta doença, as mais comuns são *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. Guyanensis* (CHAKRAVARTY & SUNDAR, 2019; CHRISTENSEN et al., 2019). As estimativas atuais de incidência variam de 700.000 a 1,2 milhão de casos por ano, com aproximadamente 95% dos casos ocorrendo nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central (CDC, 2020; WHO, 2018).

Na região das Américas, 1.105.545 casos de LC e LMC foram notificados no período de 2001 a 2021, ocorrendo principalmente na região andina e no Brasil, com 896.790 casos registrados. Somente no ano de 2021, foram notificados no Brasil mais de 15.000 novos casos da LC e LMC, sendo 95% destes relatados para a LC. Desse modo, considera-se o risco de transmissão para LC muito intenso, uma vez que a cada 100.000 habitantes tem-se 13,5 casos. O risco de transmissão muito intenso é observado principalmente nos municípios dos estados Acre, Amazonas, Pará e Amapá, como mostra a Figura 3.

Figura 3. Mapa da distribuição de casos da LC no Brasil no triênio de 2019-2021.

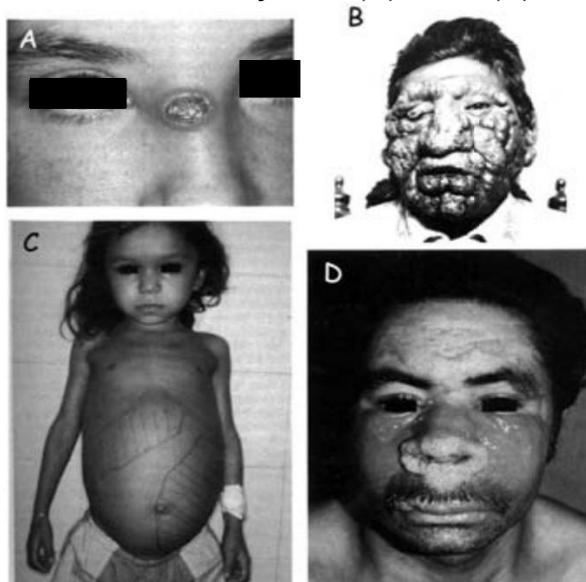


Fonte: Adaptado de OPAS (2022).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a LC, também conhecida como leishmaniose tegumentar, é uma das seis mais importantes doenças infecciosas, devido seu alto coeficiente de detecção e a capacidade de produzir deformidades. Apesar de ser menos grave que a visceral, as lesões em pacientes não tratados tendem a piorar devido a infecções secundárias e as ulcerações, podendo levar ainda ao envolvimento da mucosa. Outra complicação é o sofrimento psicossocial devido ao estigma e isolamento social causados pela doença (KASSI et al., 2008; REITHINGER et al., 2007; BAILEY et al., 2017).

No Brasil, a *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são as espécies de maior relevância epidemiológica, ressaltando que a *L. amazonensis* causa tipicamente a doença cutânea localizada, podendo ocorrer casos raros de leishmaniose cutânea difusa (LCD), que se caracteriza por nódulos disseminados na pele dos afetados (Fig. 4B) (CHRISTENSEN et al., 2019; SILVEIRA, LAINSON & CORBETT, 2005).

Figura 4. Manifestações clínicas da doença: LC (A), LCD (B), LV (C) e LMC (D).



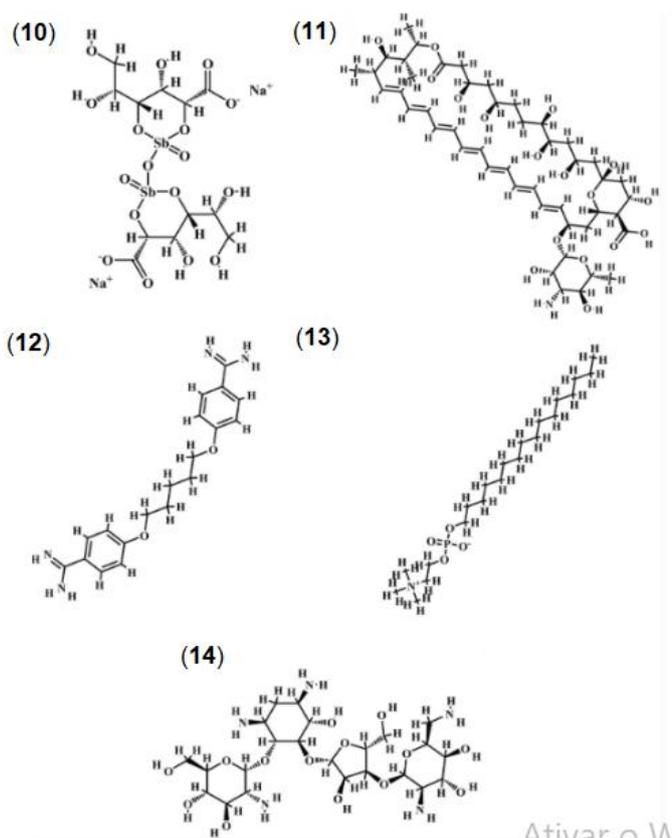
Fonte: Adaptado de LÓPEZ (2010).

1.2 Tratamento Farmacológico

Atualmente, as opções terapêuticas contra a leishmaniose baseiam-se principalmente no uso de cinco fármacos: antimoniais pentavalentes, anfotericina B (11) desoxicolato e sua formulação lipossomal, pentamidina (12), miltefosina (13) e

paromomicina (**14**) (Fig. 5) (MANN et al., 2021; SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021; PRADHAN et al., 2022).

Figura 5. Estrutura dos fármacos antileishmania: estibogluconato de sódio (**10**), anfotericina B (**11**), isetionato de pentamidina (**12**), miltefosina (**13**) e paromomicina (**14**).



Ativar o W

Fonte: Adaptado de SASIDHARAN & SAUDAGAR (2021).

Os antimoniais pentavalentes, que incluem o estibogluconato de sódio (**10**) e o antimoniato de meglumina, são considerados como tratamento de primeira linha para leishmaniose e estão disponíveis no mercado há mais de 60 anos (PRADHAN et al., 2022). São administrados pela via parenteral (intramuscular e intravenosa), uma vez que são irritantes para o sistema gastrointestinal e pouco absorvidos. O mecanismo de ação ainda não é bem estabelecido, devido ao estado amorfo que os compostos antimoniais possuem (FRÉZARD, DEMICHELI & RIBEIRO 2009). Alguns estudos sugerem que estes fármacos atuam na inibição da glicólise e na oxidação dos ácidos graxos, interferindo na bioenergética das formas amastigotas da *Leishmania*. Outros mecanismos foram propostos indicando que estes fármacos

podem atuar exercendo sua ação em várias vias do metabolismo do parasita (YAN et al., 2003). Em contrapartida, diversos efeitos adversos estão associados, como irritação local, mialgia, dores de cabeça, fadiga, náuseas, vômitos, anorexia, arritmias, citopenias, cirrose e pancreatite. Além disso, em algumas regiões já foram relatados casos de resistência (PRADHAN et al., 2022; MANN et al., 2021).

Quando não há resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou quando não é possível utilizá-lo, outras opções terapêuticas devem ser consideradas. A anfotericina B (**11**) e sua formulação lipídica, anfotericina B (**11**) lipossomal, são as escolhas para a terapia de segunda linha (PRADHAN et al., 2022). Seu mecanismo de ação baseia-se na interação com o ergosterol presente na membrana celular, resultando na formação de poros que alteram a permeabilidade e o equilíbrio iônico da célula. Essas alterações levam à despolarização da membrana e um aumento na permeabilidade da membrana a prótons e cátions monovalentes. As interações intermoleculares de ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila, carboxila e amino estabilizam o canal em sua forma aberta, comprometendo a atividade normal da célula e permitindo o vazamento do conteúdo citoplasmático, levando, conseqüentemente, à morte celular (TIUMAN et al., 2011; WIJNANT et al., 2018).

O tratamento com a anfotericina B (**11**) causa nefrotoxicidade, além de reações relacionadas à infusão (febre, calafrios, náusea, vômito, hipotensão), hipocalcemia e miocardite. Como uma forma de minimizar esses efeitos, foi desenvolvido uma formulação lipossomal de anfotericina B (**11**), que apresentou nefrotoxicidade leve e calafrio durante a injeção, porém seu custo elevado, torna-se uma limitação (PRADHAN et al., 2022; MANN et al., 2021; SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021).

A pentamidina (**12**) foi outra opção terapêutica utilizada amplamente devido à resistência antimonial. É uma diamidina aromática que foi descoberta como tratamento antileishmania através da busca por compostos hipoglicemiantes que compromettesse o metabolismo energético de parasitas (ROATT et al., 2020; SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021; NEVES et al., 2011). Acredita-se que o seu mecanismo de ação, embora não completamente esclarecido, esteja relacionado ao seu acúmulo no parasita e à sua ligação ao DNA do cinetoplasto. A entrada do fármaco foi observada por meio de transportadores de arginina e poliamina, com

acumulação potencial nas mitocôndrias. Como resultado, ocorre a inibição da topoisomerase II mitocondrial (MISHRA, SAXENA & SINGH, 2007).

Todavia, os inúmeros e graves efeitos adversos, como náuseas, vômitos, disgeusia, cefaléia, hipoglicemia, diabetes mellitus dependente de insulina, pancreatite, hipotensão, ritmo cardíaco anormal, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, citopenias, anormalidades eletrolíticas, rabdomiólise, associados a pentamidina (12) limitam seu uso (SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2015; MANN et al., 2021).

A paromomicina (14), usada no tratamento tópico e sistêmico da leishmaniose, é um antibiótico aminoglicosídeo que apresenta atividade leishmanicida, com a vantagem de ser eficaz em um curto intervalo de aplicação e ser de baixo custo (KHAN, SHARMA & KUMAR 2013). Assim como em outros casos, o mecanismo de ação permanece indefinido, embora exista o entendimento de que o fármaco promove a inibição da síntese de proteínas nas leishmanias ao associar as subunidades ribossômicas e causar a dissociação induzida por baixas concentrações de íons Mg^{2+} (MAAROUF et al., 1995).

Outras hipóteses de mecanismos incluem modificação na fluidez da membrana, influência sobre o metabolismo lipídico e alteração conformacional local no sítio A do 16S RNA ribossômico (SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021). Apesar de sua eficácia, o tratamento causa diversos efeitos colaterais que incluem aumento das enzimas transaminases hepáticas, toxicidade renal, auditiva e hepática, náuseas, desconforto abdominal e diarreia. Ademais, estudos laboratoriais revelaram a ocorrência de resistência à paromomicina (5) em uma cepa de laboratório de *L. donovani* (PRADHAN et al., 2022).

Desenvolvida inicialmente como agente antineoplásico para o tratamento do câncer de mama metastático, a miltefosina (13), um fármaco oral, demonstrou atividade antileishmania em 1980 (SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021; SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2015). Atualmente, a miltefosina (13), denominada também de hexadecilfosfolina, continua sendo usada contra a leishmaniose, no entanto, tem eficácia variada dependendo da espécie. Sua ação no parasita pode ser explicada por diversos mecanismos: alteração da síntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI); alcalinização rápida de organelas e interrupção da homeostase de cálcio; indução de óxido nítrico sintetase 2 (iNOS₂), resultando em óxido nítrico (NO), que é capaz de matar o parasita dentro dos macrófagos (SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021). A

miltefosina (**13**) está associada a diversos efeitos colaterais, como distúrbios gastrointestinais, hepatotoxicidade e toxicidade renal, além de apresentar efeitos teratogênicos. Além disso, diversas cepas também desenvolveram resistência à miltefosina (**13**) (MANN et al., 2021; JUNIOR, 2012).

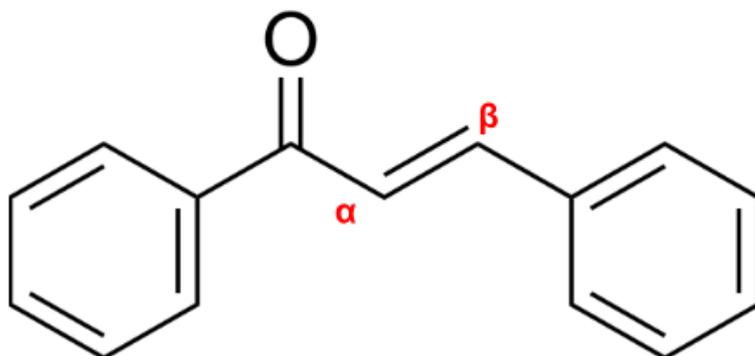
Diante da alta toxicidade e dos inúmeros efeitos colaterais do pequeno arsenal terapêutico disponível, aliados à demanda por regimes terapêuticos prolongados, os custos elevados e o surgimento de cepas resistentes, o tratamento da leishmaniose torna-se extremamente desafiados. Além disso, a necessidade de adaptar a terapia individualmente para cada paciente, considerando o tipo de leishmaniose e a subespécie do parasita envolvida, contribui para dificultar ainda mais o processo de tratamento (MANN et al., 2021).

Sendo assim, é de extrema importância o desenvolvimento de fármacos que ofereçam uma maior eficácia, com baixa toxicidade e menos efeitos adversos, ao mesmo tempo em que sejam mais acessíveis em termos de custos. O baixo investimento para desenvolver novos candidatos a protótipos de fármacos emerge como um fator crítico que motiva pesquisadores e agências mundiais de saúde a buscar novas abordagens terapêuticas e estratégias para combater e controlar essa relevante doença negligenciada (ROATT et al., 2020).

1.3 Chalconas

As chalconas, compostos químicos pertencentes à classe dos flavonoides, têm atraído crescente interesse na pesquisa farmacológica devido à sua diversidade estrutural e potencial aplicação terapêutica (RUDRAPAL et al., 2021). Originárias da biossíntese de flavonoides em plantas superiores, esses compostos apresentam uma estrutura básica consistindo de dois anéis aromáticos ligados por uma α,β -insaturação conjugada (Fig. 6), conferindo-lhes propriedades estruturais únicas, além de uma variedade de grupos funcionais que conferem propriedades farmacológicas diversas (ROZMER & PERJÉSI, 2016; MICHALKOVAL et al., 2021; CUSTODIO et al., 2020).

Figura 6. Estrutura básica de uma chalcona.



Fonte: Adaptado do MedchemExpress.com

Diversos estudos têm explorado as propriedades antitumorais, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antiproliferativas desses compostos. Foi demonstrado resultados promissores das chalconas com atividades antimetabólica, antileishmania e anticancerígena em modelos animais, destacando-se por suas propriedades antiproliferativas, as quais estão relacionadas à sua capacidade de induzir apoptose por meio da via apoptótica mitocondrial. Em geral, a disfunção mitocondrial está associada ao desequilíbrio do potencial transmembranar mitocondrial e ao aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (MICHALKOVAL et al., 2021; CHENG et al., 2020; SINHA et al., 2020; GARCIA et al., 2021; LIN et al., 2020; DAS, 2016).

A ação citotóxica das chalconas aos patógenos tem sido associada a múltiplos mecanismos de ação, incluindo a inibição da angiogênese, bloqueio da polimerização da tubulina, supressão da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB), interrupção do ciclo celular e indução de apoptose. Esses compostos também têm sido implicados na alteração da fluidez da membrana celular, bem como em mudanças conformacionais locais no sítio A do rRNA 16S (ORLIKOVA et al., 2010; KARTHIKEYAN et al., 2015).

Recentemente, pesquisas têm se concentrado em compreender os mecanismos de ação das chalconas em nível molecular e celular, bem como na síntese de novos derivados visando otimizar suas atividades farmacológicas e reduzir efeitos colaterais indesejados. A exploração da estrutura-atividade tem permitido o desenvolvimento de chalconas com perfis de atividade específicos, direcionados a

alvos terapêuticos específicos. Os derivados de chalcona e suas combinações híbridas têm revelado uma gama diversificada de atividades biológicas, influenciadas por sua estrutura e grupos funcionais, os quais podem interagir com elementos-chave e moléculas sinalizadoras relevantes na progressão do câncer (ZHUANG et al., 2017; WALYELDEEN et al., 2022).

Um exemplo recente desse contexto é o derivado de chalcona (E)-3-(3,5-di-terbutil-4-hidroxifenil)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona, denominado LQFM064 (**3**) (Fig. 6A), que demonstrou atividade *in vitro* contra células de adenocarcinoma de mama humano MCF7, além de evidenciar atividade antiproliferativa contra a forma promastigota de *L. amazonensis* (CABRAL et al., 2017; ALONSO et al., 2020). No caso das células MCF7, a ação citotóxica do LQFM064 (**3**) foi vinculada à redução do potencial de membrana mitocondrial e à intensificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS); adicionalmente, observou-se o aumento da expressão de caspases -7, -8 e -9, bem como a externalização de fosfatidilserina (CABRAL et al., 2017). Por sua vez, em *L. amazonensis*, os efeitos antiproliferativos do LQFM064 (**3**) assemelharam-se aos da miltefosina (**13**), no entanto, o LQFM064 (**3**) apresentou menor potencial hemolítico e citotoxicidade reduzida contra os macrófagos J774.A1 (ALONSO et al., 2020).

A utilização da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) de marcadores de spin revelou que o LQFM064 (**3**) ocasiona uma considerável rigidez na membrana plasmática do parasita, em concentrações semelhantes aos valores de IC₅₀. Esse fenômeno de rigidez da membrana decorre de um estresse oxidativo intenso, provavelmente envolvendo a reticulação das proteínas da membrana e a peroxidação lipídica (ALONSO et al., 2020). A elevada rigidez de membrana, identificada pela espectroscopia de RPE, tem sido associada à produção aumentada de ROS e à diminuição do potencial de membrana mitocondrial, conforme evidenciado em diversos estudos.

Por exemplo, derivados de β -carbolina, derivados de isoxazol, ivermectina e curcumina têm mostrado atividade contra *L. amazonensis*, enquanto o sesquiterpeno (-)-elatol tem mostrado atividade contra *Trypanosoma cruzi* na forma tripomastigota, e todos esses compostos causam aumento na produção de ROS, despolarização do potencial da membrana mitocondrial, produção aumentada de ânion superóxido mitocondrial e rigidez da membrana plasmática. Além disso, altos níveis de rigidez

de membrana em promastigotas e eritrócitos de *L. amazonensis* podem ser induzidos pelo tratamento com o agente oxidante peróxido de hidrogênio (ALONSO et al., 2020; ALONSO et al., 2021b; ALONSO, DORTA & ALONSO, 2022; DESOTI et al., 2012; MENDANHA et al., 2021).

Baseado no perfil antileishmania de LQFM064 (3), novos compostos foram projetados e avaliados quanto à atividade leishmanicida e capacidade de alterar a dinâmica da membrana plasmática. Os compostos semelhantes a chalcona LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6) foram sintetizados através da estratégia de regioisômeros e suas atividades no parasita foram avaliados por meio da espectroscopia de RPE, tanto em termos de efeitos letais quanto da capacidade de alterar a dinâmica da membrana plasmática, para compreender o papel de cada estrutura na atividade leishmanicida dessas chalconas sintéticas (WERMUTH, 1998).

1.4 Espectroscopia de RPE

A técnica da espectroscopia de RPE baseia-se na interação da radiação de micro-ondas com o momento magnético do elétron desemparelhado (contido geralmente em radicais livres) na presença de um campo magnético. O campo magnético serve para orientar o momento magnético do elétron (como a agulha de uma bússola). De acordo com a mecânica quântica duas orientações, paralela e antiparalela, são permitidas, formando dois níveis de energia, chamados de níveis de energia Zeeman. A micro-onda provoca as transições entre esses níveis que vai resultar na absorção de energia (ALONSO et al., 2019).

No equipamento de RPE, conforme mostrado na Figura 7, e de acordo com o seu diagrama de blocos (Fig. 8), as micro-ondas, geradas por desaceleração de elétron (carga acelerada/desacelerada emite radiação), seguem através de uma guia de onda até a cavidade de ressonância, onde formam ondas estacionárias. A cavidade tem uma geometria retangular com dimensões apropriadas para que o campo magnético da onda seja máximo no centro da cavidade (interferência construtiva), onde fica localizada a amostra, e o campo elétrico seja mínimo (interferência destrutiva), pois ele é indesejável (MOREIRA et al., 2014; ALONSO et al., 2019).

A entrada da micro-onda na cavidade de ressonância é controlada por um dispositivo chamado íris, o qual pode ser ajustado pelo equipamento para ter ressonância máxima na cavidade, ou seja, máximo fator de qualidade Q. Durante a medição de RPE, quando a amostra absorve a energia de micro-ondas, ocorre diminuição da quantidade de onda que é refletida para fora da cavidade e que vai para o diodo detector, onde a presença da radiação de micro-onda causa aumento proporcional na corrente que circula pelo diodo. O atenuador serve para controlar a potência de microondas que incide na cavidade e o circulador força a direção da onda incidente para a cavidade e a refletida para o detector. Finalmente, o circulador encaminha as micro-ondas que sobram, após a passagem pelo detector, para um absorvedor onde elas são eliminadas (MOREIRA et al., 2014; ALONSO et al., 2019).

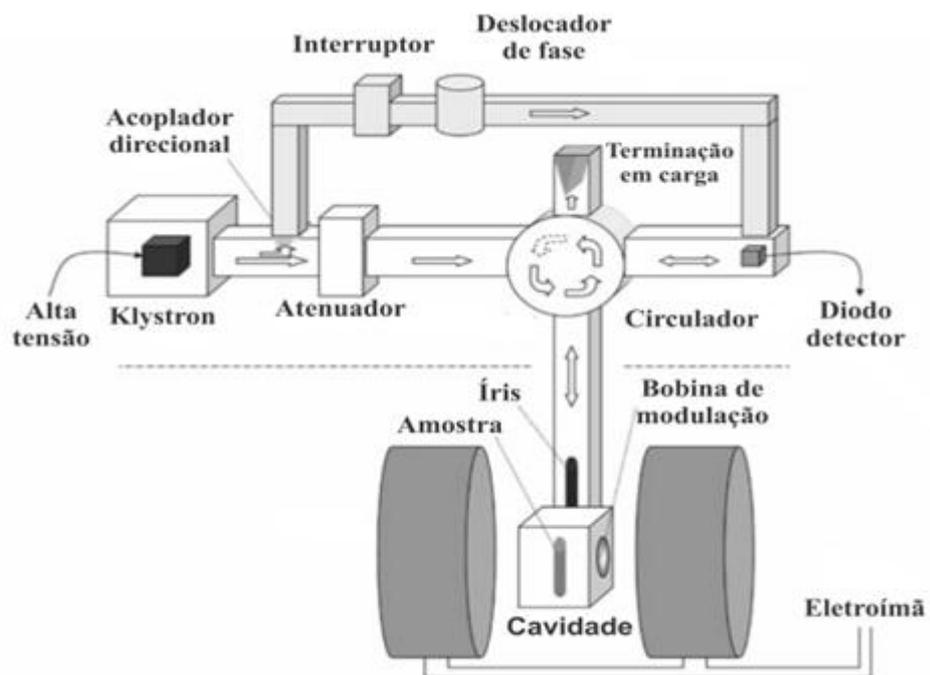
Espécies paramagnéticas como os radicais livres possuem um sinal de RPE, mas a maioria dos sistemas biológicos não gera sinal e assim tem sido desenvolvido o método de marcadores de spin como um grande avanço para aplicações biológicas da espectroscopia de RPE. O marcador de spin é uma molécula que contém o radical nitróxido associado, o qual é um radical livre com estabilidade suficiente para realizar a medição de RPE. No radical nitróxido o elétron desemparelhado interage com o spin nuclear do nitrogênio vizinho produzindo um espectro de RPE muito adequado para gerar informações sobre a dinâmica molecular e a polaridade do meio. Um dos marcadores de spin mais interessantes é o ácido esteárico marcado no quinto carbono da cadeia graxa; quando inserido na membrana celular é extremamente sensível à dinâmica molecular dos lipídios e proteínas de membrana. A dinâmica da membrana pode ser avaliada por parâmetros definidos no espectro, principalmente o desdobramento hiperfino externo, chamado de $2A_{//}$, que sofre redução quando a fluidez de membrana aumenta. Em casos em que o marcador de spin apresenta duas componentes de RPE, ou seja, o marcador se distribui em locais diferentes da membrana tendo em cada local uma mobilidade diferente, a simulação de espectro se faz necessária para uma análise mais completa (MOREIRA et al., 2014; ALONSO et al., 2019).

Figura 7. Foto tirada do equipamento espectrômetro de RPE do laboratório de biofísica (Instituto de Física – UFG).



Fonte: Autoria própria.

Figura 8. Diagrama de bloco do espectrômetro de RPE.



Fonte: HAGEN (2009).

1.5 Justificativa

Diante do exposto, este trabalho se propôs a investigar os novos compostos derivados de chalcona LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6) para compreender seus mecanismos de ação específicos e identificar potenciais alvos terapêuticos. Sendo possível investigá-los através da espectroscopia de RPE, avaliando a atividade leishmanicida, bem como a rigidez da membrana plasmática da *L. amazonensis*, com o objetivo de desenvolver abordagens terapêuticas mais eficazes e com menor toxicidade, devido um cenário onde a necessidade de terapias eficazes contra doenças negligenciadas, como a leishmaniose, é inegável.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a atividade leishmanicida de três derivados de chalcona, LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6) e como se associam com a rigidez da membrana plasmática, utilizando a espectroscopia de RPE.

2.2 Objetivos Específicos

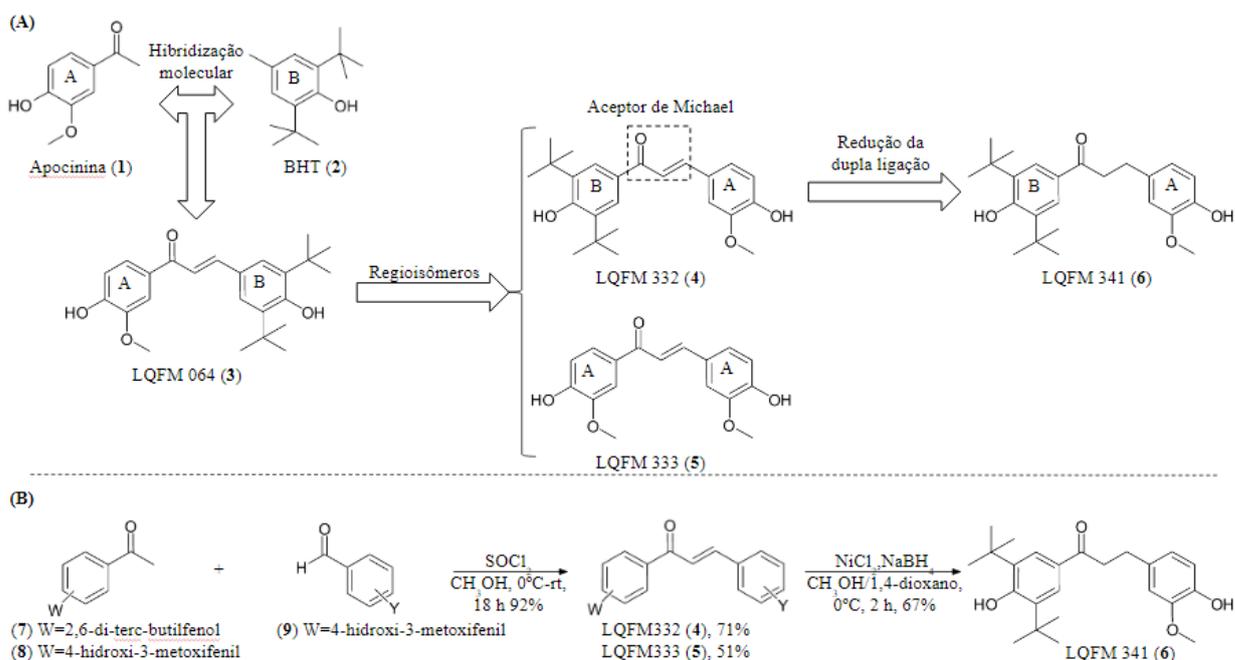
- Avaliar os efeitos antiproliferativos dos compostos LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6) em promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar por espectroscopia de RPE de marcador de spin os efeitos do LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6) na membrana plasmática de promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar os efeitos citotóxicos dos compostos LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6) em macrófago J774.A1;
- Verificar se há alguma seletividade de ataque à membrana do parasita em relação ao macrófago;
- Investigar os mecanismos de ação dos compostos derivados de chalcona.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos gerais da síntese

Os três derivados de chalcona foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM), liderado pelo Prof. Dr. Ricardo Menegatti, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Com base no perfil leishmanicida da chalcona LQFM064 (3), sua estrutura, que contém uma subunidade de apocinina (1) e hidroxitolueno butilado (BHT) (2), foi utilizada para o desenvolvimento dos novos compostos nomeadamente LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6), por meio da estratégia de regioisômeros (Fig. 9A). Para a obtenção do LQFM332 (4), a estrutura A foi substituída pela B, enquanto para obter o LQFM333 (5), a estrutura A foi mantida em ambos os lados. Com o intuito de investigar se o aceptor de Michael em LQFM332 (4) atua como um farmacóforo, sua dupla ligação foi reduzida para dar origem a LQFM341 (6).

Figura 9. (A) Projeto de LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6) a partir de LQFM064 (3). **(B)** Rota sintética de (4-6).



Fonte: Adaptado de WERMUTH et al. (1998).

3.2 Cultivo de parasitas e macrófagos

Cepas de referência de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), na forma promastigota, foram cultivadas a 26°C em placas de 24 poços ou em garrafas contendo meio de inseto Grace suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (Corning Life Sciences, Corning, NY, EUA), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) sob condições anaeróbicas.

Macrófagos murinos J774A.1 (ATCC® TIB-67) foram cultivados em meio RPMI-1640, com pH 7,6, suplementado com 2 mM de L-glutamina e 10% de SFB, incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

3.3 Atividade antiproliferativa com promastigotas

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram utilizadas para os ensaios experimentais quando atingiram a fase estacionária (6º dia de crescimento em cultura). Os parasitas foram preparados em várias concentrações celulares finais (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 células/mL) em suspensões de 100 µL e tratados com concentrações crescentes das chalconas em placas de 96 poços contendo meio Grace suplementado com 10% de SFB. Após incubação a 26°C por 72 horas para a concentração de 1×10^6 células/mL ou 24 horas para as demais concentrações celulares, a viabilidade celular foi avaliada medindo-se a redução do brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich) hidrossolúvel a cristais de formazan pelas enzimas redutases mitocondriais, sendo que os parasitas que estão ativos processam essa transformação que é detectado de forma colorimétrica. No qual, após esse período de tratamento, 20 µL de MTT a 5 mg/mL foram adicionados em cada amostra e após um período de 4 horas, foi adicionado 100 µL de dodecil sulfato de sódio (10%) em cada poço para dissolver os cristais de formazan, que é uma substância púrpura insolúvel. A porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento) foi determinada pela absorbância de formazan a 540 nm, e os valores da concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitas (IC₅₀) dos compostos foram determinados ajustando uma curva sigmóide aos dados de concentração versus resposta.

3.4 Atividade antiproliferativa com amastigotas

Para avaliar a atividade antiproliferativa dos compostos contra amastigotas intracelulares, 5×10^6 promastigotas/mL na fase estacionária de crescimento, foram adicionadas a 5×10^5 macrófagos/mL (10:1, relação parasita:macrófago) em placas brancas de 96 poços. As placas foram incubadas a 34°C e 5% de CO₂ por 24 horas para internalização do parasita e diferenciação das promastigotas em amastigotas. Após esse período, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura novo para remover os parasitas não internalizados. Os macrófagos infectados foram tratados com concentrações crescentes dos compostos (0,01–100 µM) e incubados por 48 horas nas mesmas condições. A miltefosina (**13**), foi utilizada como substância padrão (controle positivo). Após o período de incubação, o kit Pierce Firefly Luc One-Step Glow Assay (ThermoFisher, Rockford, EUA) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante para quantificar os parasitas luminescentes no interior do macrófago. A luminescência foi quantificada em um luminômetro SpectraMax L (Molecular Devices, San José, CA, EUA) com $\lambda_{\text{emissão}}$ de 570 nm e tempo de integração de 1 segundo. A porcentagem de inibição foi calculada com base na luminescência do controle (sem tratamento), os valores foram plotados e as concentrações de IC₅₀ foram calculadas por regressão não linear ou sigmoide.

3.5 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada utilizando macrófagos J774A.1 na concentração de 5×10^5 células/mL. Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços contendo meio RPMI suplementado com 10% de SFB e foram mantidos a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, as chalconas foram adicionadas aos poços em concentrações crescentes (1-500 µM) e as placas foram incubadas por 48 horas nas mesmas condições. Após o tratamento, as células foram lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) com pH 7,2 e incubadas na presença de MTT (2 mg/mL) por 4 horas. O sobrenadante foi removido, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância foi realizada a 570 nm através de um espectrofotômetro de placas Power Wave XS (BioTek, Winooski, VT, EUA). A

porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle (sem tratamento). Os valores da concentração citotóxica para matar 50% das células (CC_{50}) foram determinados por análise de regressão não linear.

3.6 Medições de RPE

3.6.1 Preparo e marcação das amostras

Semelhante ao ensaio antiproliferativo, promastigotas de *L. amazonensis* foram primeiramente diluídos em meio Grace suplementado com 10% de SFB em placas de cultura de 24 poços para concentrações celulares finais de 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 e 1×10^9 parasitas/mL e tratados com diferentes concentrações dos compostos derivados de chalcona. Após incubação a 26°C por 24 horas, as amostras foram centrifugadas a 25.000×g por 10 min para retirada do meio de cultura. O sobrenadante foi descartado e os parasitas foram ressuspensos em 50 µL de PBS. Cada amostra contendo 1×10^8 parasitas/mL foi marcada com o 5-doxil estearato (5-DSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para realizar a incorporação do marcador de spin 5-DSA nas membranas do parasita, uma alíquota de 0,25 µL de uma solução etanólica de 5-DSA (2 mg/mL) foi adicionada a cada amostra de 50 µL. Para as medições de RPE, cada amostra foi transferida para um tubo capilar de 1 mm de diâmetro interno, o qual foi selado com chama de um lado, como mostrado na Figura 10. O capilar foi centrifugado a 25000×g por 5 min para concentrar os parasitas e em seguida, colocado no centro da cavidade de ressonância para realizar as medidas de RPE.

Figura 10. Foto tirada de um capilar de vidro de 1 mm de diâmetro interno contendo uma suspensão de 1×10^8 parasitas/mL.



Fonte: Autoria própria.

3.6.2 Condições instrumentais

Os espectros de RPE foram registrados usando um espectrômetro de RPE (Fig. 7) da Bruker EMX-Plus (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemanha), operando com as seguintes configurações instrumentais: potência de microondas, 2 mW; frequência de microondas, 9,45 GHz; frequência de modulação, 100 kHz; amplitude de modulação, 1,0 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s; e temperatura da amostra, $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.7 Análise estatística

Cada experimento foi realizado pelo menos três vezes de modo independente e os resultados foram expressos como valor de média \pm desvio padrão (DP). As médias foram comparadas por meio de uma análise de variância unidirecional (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para identificar diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias dos diferentes tratamentos.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antiproliferativa e citotóxica

A atividade antiproliferativa dos compostos foi avaliada tanto nas formas promastigotas quanto amastigotas do parasita *L. amazonensis*. Para analisar a citotoxicidade dos compostos, o ensaio foi feito em macrófagos imortalizados. A Tabela 1 apresenta os valores obtidos de IC₅₀ das amostras após o tratamento de 1×10⁶ parasitas/mL por 72 horas. Além disso, são fornecidos os valores de CC₅₀ em macrófagos J774A.1 tratados por 48 horas e os índices de seletividade (IS), que foram calculados.

Tabela 1. Atividade antiproliferativa contra o parasita *L. amazonensis* e citotóxica em macrófagos J774A.1.

Amostras	J774A.1	<i>L. amazonensis</i>			
		Promastigotas		Amastigotas	
	CC ₅₀ ± DP (µM)	IC ₅₀ ± DP (µM)	IS	IC ₅₀ ± DP (µM)	IS
LQFM332 (4)	26,0 ± 2,6 (A)*	6,9 ± 0,3 (A)	3,8	19,5 ± 1,4 (A)	1,3
LQFM333 (5)	133,2 ± 9,4 (B)	20,5 ± 0,6 (B)	6,5	10,6 ± 1,1 (B)	12,69
LQFM341 (6)	49,1 ± 2,2 (C)	16,5 ± 0,6 (C)	3,0	1,0 ± 0,1 (C)	49,15
Miltefosina (13)	54,2 ± 5,2 (C)	22,7 ± 1,2 (B)	2,4	1,8 ± 0,1 (D)	30,17

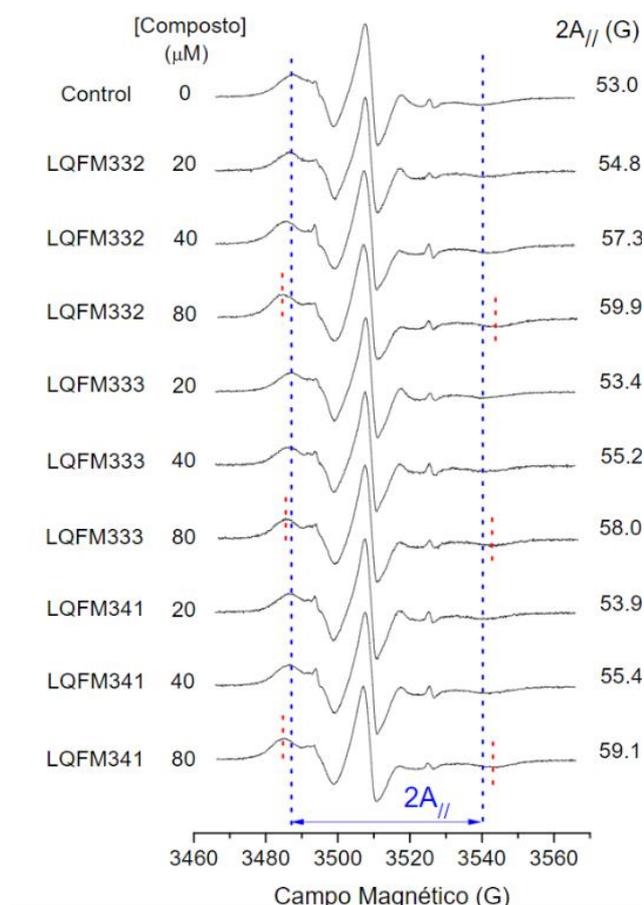
CC₅₀ = concentração citotóxica para matar 50% das células. IC₅₀ = concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitas. DP = desvio padrão. IS = índice de seletividade (CC₅₀/IC₅₀). *Significância estatística: em cada coluna, os dados indicados com a mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes em P < 0,05.

O composto LQFM332 (4) demonstrou maior atividade contra promastigotas, com o IC₅₀ de apenas 6,9 µM. A atividade em amastigotas presentes em macrófagos e tratados por 24 horas foi maior para o composto LQFM341 (6) que exibiu uma atividade ainda maior do que todos os outros compostos (IC₅₀ = 1,0 µM) inclusive superando o da miltefosina (13) (IC₅₀ = 1,8 µM), o controle positivo utilizado. Este também foi o composto que apresentou maior índice de seletividade (~49), indicando que sua ação é maior sobre as células parasitárias do que as células hospedeiras, representadas pelos macrófagos murinos J774A.1. Já o composto que apresentou maior citotoxicidade foi LQFM332 (4) com CC₅₀ de 26,0 µM.

4.2 Efeito de rigidez de membrana no parasita

A espectroscopia de RPE foi utilizada para avaliar os efeitos na membrana de promastigotas da *L. amazonensis* causados pelos derivados de chalcona, sintetizados através de três mudanças na estrutura molecular do composto LQFM064 (3). Na Figura 11, são apresentados os espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA inserido na membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 5×10^7 parasitas/mL para amostras não tratadas (controle) e amostras tratadas com concentrações crescentes de LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6).

Figura 11. Espectros de RPE representativos do 5-DSA na membrana de *L. amazonensis* após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações dos compostos LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6).



Fonte: Adaptado de BORGES et al. (2023).

Na Figura 11 foi indicado para cada espectro o valor do parâmetro $2A_{//}$ (divisão hiperfina externa). Este parâmetro que é medido diretamente no espectro conforme indicado na Figura 11, é dado pela separação em unidades de campo magnético entre o primeiro pico de ressonância e o último pico invertido do espectro. As linhas verticais permitem uma melhor visualização das mudanças neste parâmetro. Um erro experimental estimado do $2A_{//}$ é de 0,5 G. A varredura de campo magnético total em cada espectro (eixo X) é de 100 G e a intensidade dos espectros (eixo Y) foi normalizada, sendo dada em unidades arbitrárias.

Observa-se que, à medida que as concentrações dos compostos aumentam, há um considerável aumento no parâmetro $2A_{//}$, o que indica que a membrana pode alcançar níveis muito elevados de rigidez. Para o composto LQFM332 (**4**) que causou as maiores alterações, já foi observado um enrijecimento considerável na membrana na concentração de 20 μM , aumentando o $2A_{//}$ em aproximadamente 1,8 G. Para a maior concentração utilizada dos compostos (80 μM) foram observados aumentos no $2A_{//}$ de até ~ 7 G. Em concentrações celulares mais altas, como 5×10^8 parasitas/mL, os efeitos de rigidez da membrana só foram observados para concentrações dos derivados de chalcona tão altas quanto 400 μM (espectro não mostrado). Isto sugere que, com o aumento da concentração celular usada no ensaio, é necessário uma concentração maior dos compostos para observação desses efeitos.

4.3 Atividade antiproliferativa e efeitos de rigidez de membrana dos compostos foram dependentes da concentração celular

No estudo de Alonso e colaboradores (2020), foi demonstrado que os valores de IC_{50} da chalcona LQFM064 (**3**) contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* são dependentes da concentração de células utilizadas no ensaio. No presente estudo, foi observado comportamento semelhante para os três derivados de chalcona (Fig. 9A). Este tipo de comportamento é comumente observado quando o composto a ser testado é hidrofóbico, possuindo uma alta afinidade por membrana celular. A equação que descreve a dependência dos valores de IC_{50} em relação à concentração celular já foi reportada, sendo dada pela seguinte fórmula (FERNANDES et al., 2017; ALONSO et al., 2019):

$$IC_{50} = \left[\frac{(V_{mc} \cdot c_c)^{-1} + K_{M/W}}{(V_{mc} \cdot c_c)^{-1} + 1} \right] c_{w50}. \quad (1)$$

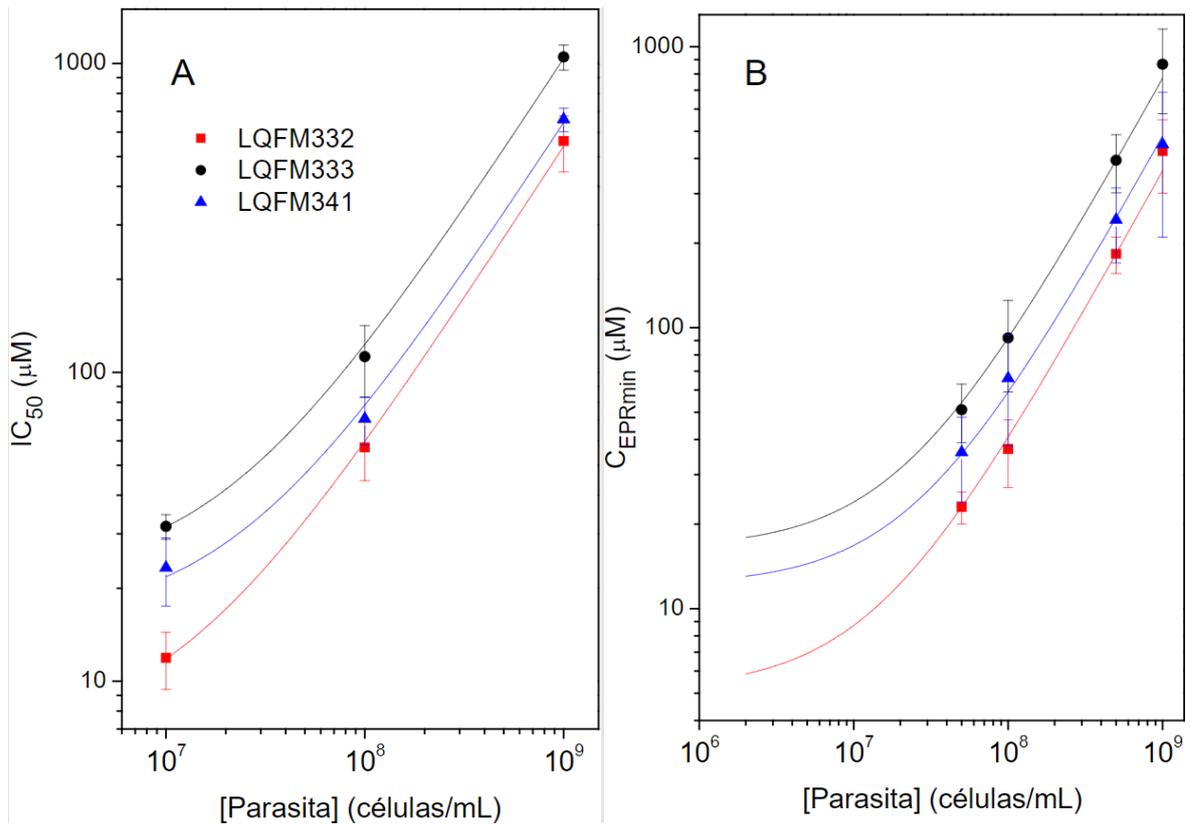
V_{mc} é o volume da membrana celular, que já foi estimado para a forma promastigota de *L. amazonensis* ($8,17 \times 10^{-13}$ mL) (FERNANDES et al., 2017) e c_c é o número de células por mL. Os parâmetros biofísicos $K_{M/W}$ (coeficiente de partição membrana-água) e c_{w50} (concentração molecular na fase aquosa) são covariantes na eq. (1), e podem ser determinados pelo ajuste da eq. 1 nos pontos experimentais de IC_{50} versus concentração celular (Fig. 12A). Uma vez que $K_{M/W} = c_{w50}/c_{m50}$, o valor de c_{m50} (concentração molecular na membrana) também pode ser determinado.

Esta dependência do IC_{50} com a concentração celular ocorre porque o composto teste não tem uma distribuição homogênea na suspensão celular, ou seja, parte dos compostos ficam no meio aquoso, enquanto outra parte se associa à membrana celular. Assim, para uma suspensão muito diluída (concentração celular baixa), onde a quantidade de membrana na suspensão é muito pequena, de modo que praticamente todos os compostos estão no meio aquoso, o valor de IC_{50} observado tende para o valor de c_{w50} . Isto pode ser visualizado na eq. 1, considerando um pequeno valor de c_c , $(V_{mc} \cdot c_c)^{-1} \gg K_{M/W}$ e assim, o IC_{50} é quase equivalente ao c_{w50} . Por outro lado, à medida que a concentração de células aumenta na suspensão, a quantidade do composto que entra na membrana aumenta, levando a um valor de IC_{50} muito maior do que o c_{w50} .

Os dados da espectroscopia de RPE de marcadores de spin também podem ser usados para determinar os parâmetros biofísicos. Os experimentos de RPE foram realizados de modo semelhante ao ensaio de atividade antiproliferativa, exceto que para a marcação de spin, o meio de cultura foi substituído por PBS após 24 horas de tratamento. Para cada concentração celular foi determinada a concentração mínima do composto para causar um aumento no parâmetro $2A_{//}$ em um valor acima do erro experimental estimado (0,5 G), pois esta concentração foi considerada a mínima necessária para causar rigidez de membrana no parasita. Em geral, a concentração mínima para rigidez de membrana (C_{EPRmin}) foi considerada quando notou-se um aumento de $2A_{//}$ de 0,5 a 1,0 G. Para a concentração do composto $2x C_{EPRmin}$, o aumento em $2A_{//}$ foi de ~2 G e para $4x C_{EPRmin}$ o aumento foi de ~4 G. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados para determinar as

concentrações do composto C_{EPRmin} para cada concentração de parasita (Fig. 12B). As curvas de melhor ajuste foram obtidas usando a eq. (1), substituindo as concentrações de IC_{50} pelas de C_{EPRmin} .

Figura 12. (A) Valores de IC_{50} e **(B)** C_{EPRmin} dos compostos LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341(6). As curvas de melhor ajuste mostradas são baseadas na eq. 1.



Fonte: Adaptado de BORGES et al. (2023)

Os valores dos parâmetros biofísicos, K_{MW} , C_{m50} e c_{w50} , obtidos a partir das curvas de ajuste mostradas na Figura 12 são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros biofísicos calculados com base na interações dos compostos estudados com a membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis*.

Composto	$K_{M/W}$ (10^4) ^a	log $K_{M/W}$	c_{w50} (μ M)	c_{m50} (M)
Dados^b de IC₅₀				
LQFM332 (4)	10,1 ± 1,5 (A) ^c	5,00	6,4 ± 1,3 (A)	0,65 ± 0,16 (A)
LQFM333 (5)	5,8 ± 0,9 (B)	4,76	20,4 ± 3,2 (B)	1,18 ± 0,25 (B)
LQFM341 (6)	4,9 ± 0,7 (B)	4,69	15,5 ± 1,7 (C)	0,76 ± 0,14 (A)
Dados^b de RPE				
LQFM332 (4)	9,7 ± 1,3 (A)	4,99	5,3 ± 1,1 (A)	0,51 ± 0,17 (A)
LQFM333 (5)	5,7 ± 0,7 (B)	4,76	17,4 ± 2,5 (B)	0,99 ± 0,19 (B)
LQFM341 (6)	4,7 ± 0,8 (B)	4,67	12,1 ± 2,1 (C)	0,57 ± 0,14 (A)
LQFM064 (3) ^d	10,2 ± 0,9 (A)	5,01	6,8 ± 1,6 (A)	0,69 ± 0,19 (A)
Miltefosina (13) ^d	6,8 ± 0,3	4,83	10,8 ± 3,0	0,73 ± 0,21

^a $K_{M/W}$, coeficiente de partição membrana-água; c_{w50} e c_{m50} , concentrações moleculares na fase aquosa e na membrana, respectivamente, que reduzem a população celular pela metade.

^bParâmetros de melhor ajuste obtidos pela eq. 1 e dados experimentais de IC₅₀ e de RPE mostrados na Figura 12.

^cSignificância estatística: em cada coluna, os dados indicados com a mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes em $P < 0,05$.

^dDados de trabalhos anteriores para LQFM064 (3) (ALONSO et al., 2020) e miltefosina (13) (FERNANDES et al., 2017) são apresentados para comparação.

Os valores altos calculados do parâmetro $K_{M/W}$ indicaram que os três compostos têm alta afinidade pela membrana do parasita. Para o LQFM332 (4), o valor de $K_{M/W}$ indicou que a concentração do composto na membrana foi 101.000 vezes maior que a concentração no meio aquoso. A concentração molecular na fase aquosa que inibiu o crescimento do parasito em 50% (c_{w50}) foi de apenas 6,4 μ M (Tabela 2); no entanto, a concentração necessária na membrana do parasita para causar uma inibição (C_{m50}) equivalente foi de 0,65 M, a qual é considerada muito alta. Os valores de $K_{M/W}$ indicaram que LQFM332 (4) teve uma afinidade significativamente maior para a membrana do que os compostos LQFM333 (5) e LQFM341 (6), sem diferença significativa entre os dois últimos compostos ($P > 0,05$). Este resultado sugere que com a troca da 4-hidroxi-3-metoxifenil pelo BHT, formando o LQFM332 (4), a afinidade do composto pela membrana aumentou, e que a supressão da ligação dupla no aceitador de Michael diminuiu a afinidade.

Para ensaios com baixas concentrações de células, os valores de IC₅₀ tenderam para c_{w50} . Nesta condição experimental, a capacidade antiproliferativa dos

compostos foi a seguinte: LQFM332 (4) > LQFM341 (6) > LQFM333 (5). No entanto, em relação à concentração na membrana do parasita necessária para inibir o crescimento, o LQFM332 (4) não foi significativamente diferente do LQFM341 (6), enquanto o LQFM333 (5) foi necessário em uma concentração maior do que os outros dois compostos ($P < 0,05$). Como o c_{m50} é independente da concentração de célula no ensaio, este resultado sugere que a presença do BHT aumenta a atividade do composto, enquanto a ligação dupla no acceptor de Michael não causa alteração (apenas aumentou a afinidade do composto para a membrana).

Outro resultado é que os parâmetros biofísicos do composto LQFM332 (4) foram semelhantes aos do LQFM064 (3), sugerindo que mudar a posição do BHT em relação ao acceptor de Michael do composto não altera a atividade antiproliferativa (Tabela 2). Curiosamente, os parâmetros biofísicos para a miltefosina (13), relatados em um estudo anterior (FERNANDES et al., 2017) foram semelhantes aos encontrados aqui para os três compostos derivados de chalcona. A miltefosina (13) também apresentou um c_{m50} de 0,73 M para exercer sua atividade antiproliferativa contra a *L. amazonensis*.

5 DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, o derivado de chalcona LQFM064 (3) demonstrou ter atividade contra a linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MCF7. Essa atividade foi associada à despolarização da membrana mitocondrial, produção excessiva de (ROS), liberação de citocromo c, aumento da expressão de caspases - 7, -8 e -9 e externalização de fosfatidilserina (indicativo de apoptose) (CABRAL et al., 2017). Ademais, foi comprovado que o LQFM064 (3) possui uma potente atividade antiproliferativa contra promastigotas de *L. Amazonensis*, com um IC_{50} de 6,8 μ M para ensaios com baixas concentrações celulares e uma capacidade comparável à da miltefosina (13) para matar amastigotas de *L. amazonensis* dentro de macrófagos J774.A1, além de causar rigidez de membrana no parasita, que foi associado a um intenso estresse oxidativo (ALONSO et al., 2020). Essas descobertas destacam o potencial terapêutico do composto LQFM064 (3) tanto no combate ao câncer de mama quanto na ação contra o parasita *L. amazonensis*.

No presente estudo, os compostos sintéticos do tipo chalcona também causaram

um efeito de rigidez de membrana na forma promastigota do parasita. Ao avaliar a atividade desses compostos na forma amastigota do parasita, dentro dos macrófagos, observou-se uma menor atividade para o LQFM332 (4), enquanto o LQFM341 (6) teve o melhor desempenho, exibindo um valor de IC_{50} significativamente inferior ao da miltefosina (13) ($P < 0,05$; Tabela 1). Esse resultado indica que a redução da dupla ligação no receptor de Michael favorece o acesso deste composto ao parasita internalizado na célula hospedeira, sugerindo-o como a melhor opção promissora para o tratamento da infecção.

A atividade hemolítica e a citotoxicidade em macrófagos J774.A1 do composto LQFM064 (3) foram previamente avaliadas em comparação com a miltefosina (13) (ALONSO et al., 2020). Em PBS, a miltefosina (13) causou 100% de hemólise na concentração de 0,13 mM, enquanto o LQFM064 (3) causou apenas 17,9% de hemólise na concentração de 1 mM. No sangue total, a miltefosina (13) causou 50% de hemólise na concentração de 2,5 mM, enquanto o LQFM064 (3) resultou em apenas 1% de hemólise na concentração de 5 mM. Quanto aos macrófagos, os valores de CC_{50} para a miltefosina (13) e LQFM064 (3) foram 64 e 179 μ M, respectivamente, destacando que a citotoxicidade do LQFM064 (3) em relação aos eritrócitos e macrófagos foi significativamente menor do que a observada no parasita (ALONSO et al., 2020).

Neste trabalho a LQFM332 (4), mostrou resultados semelhantes aos da LQFM064 (3). Porém ao substituir o grupo BHT pelo 4-hidroxi-3-metoxifenil, transformando em LQFM333 (5), a atividade leishmanicida reduziu, permitindo a dedução que o grupo BHT aumenta a atividade leishmanicida. Assim, a possibilidade de usar dois grupos BHT em um mesmo composto, sugere um aumento ainda maior na atividade, no entanto, seria necessário examinar se esse composto não teria maior atividade citotóxica. Pois, conforme mostrado na Tabela 1, o composto LQFM333 (5) contendo 4-hidroxi-3-metoxifenil apresentou consideravelmente menos citotoxicidade que os compostos contendo o grupo BHT.

Os parâmetros biofísicos calculados neste trabalho, c_{w50} e c_{m50} , diferentemente do IC_{50} , são independentes da concentração celular, permitindo uma análise mais adequada. Compostos hidrofóbicos que possuem maior afinidade pela membrana são favorecidos em experimentos com baixa concentração celular, porque conseguem facilmente se incorporar à membrana. No entanto, essa vantagem diminui em experimentos com grande quantidade de células, já que a incorporação

na membrana se torna mais simples, uma vez que há muita membrana disponível no meio. Ao comparar os compostos LQFM332 (**4**) e LQFM341 (**6**), pode-se observar que o c_{w50} do LQFM332 (**4**) foi menor por causa da sua maior afinidade pela membrana, porém, os seus valores de c_{m50} não foram significativamente diferentes ($P > 0,05$). Assim, esta interpretação está de acordo com o resultado experimentalmente observado na Figura 12, onde estes dois derivados de chalcona apresentaram eficácia equivalente para as altas concentrações celulares, que são fisiologicamente mais relevantes.

No estudo de Alonso e colaboradores (2021a) comparou-se os parâmetros biofísicos dos fármacos anfotericina B (**11**) e miltefosina (**13**), e foi observado que, embora o c_{m50} da anfotericina B (**11**) fosse apenas 20 mM, ou seja, 36,5 vezes menor que o da miltefosina (**13**), o c_{w50} foi 360 vezes menor. Isso pode ser explicado pelo valor $K_{M/W}$ muito maior da anfotericina B (**11**), o que indica uma vantagem desse fármaco em ensaios de baixa concentração celular devido à sua maior interação com a membrana. Sugere-se ainda que, devido o baixo valor de c_{m50} da anfotericina B (**11**), a sua ação é muito mais eficiente do que a miltefosina (**13**) e dos compostos investigados neste estudo; todavia, a anfotericina B (**11**) também ataca as células que contêm colesterol, apresentando alta toxicidade para as células normais do corpo (ALONSO et al., 2021a). Portanto, a escolha de um fármaco para o tratamento da leishmaniose deve considerar não apenas sua eficácia contra o parasita, mas também seu potencial de toxicidade para as células hospedeiras.

Para examinar a aplicação desses parâmetros biofísicos no cenário fisiológico, é fundamental levar em consideração que os tecidos possuem altas concentrações celulares e que os compostos hidrofóbicos se distribuem por todas as membranas celulares de acordo com sua afinidade específica. Na corrente sanguínea, espera-se que as atividades leishmanicidas de compostos hidrofóbicos sejam significativamente reduzidas, pois geralmente esses compostos se ligam à albumina presente no plasma sanguíneo, e o coeficiente de partição plasma-membrana diminui drasticamente. Um exemplo disso é a anfotericina B (**11**) e a miltefosina (**13**), que se ligam à albumina (STONE et al., 2016). Esta informação é consistente com os resultados reportados, mostrando que os potenciais hemolíticos da anfotericina B (**11**) e da miltefosina (**13**) são muito mais baixos no sangue total (contém albumina) do que no PBS (ALONSO et al., 2021a). Por outro lado, o fluido intersticial dos tecidos possui baixíssima concentração de albumina, tornando-se mais semelhante

ao meio de cultura de *Leishmania*. Dessa forma, seria de se esperar que, quando a concentração do composto atingir sua concentração de C_{w50} no líquido intersticial, a concentração na membrana do parasita *Leishmania* deveria ser a de seu C_{m50} , medido neste trabalho, independentemente do número e tipos de células presentes naquele tecido. Essas considerações enfatizam a importância de compreender os parâmetros biofísicos em diferentes contextos fisiológicos, pois pode ter implicações significativas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e com menor toxicidade.

A rigidez de membrana produzida pelo composto LQFM064 (3) foi associada a um estresse oxidativo celular em um trabalho anterior (ALONSO et al., 2020). Foi demonstrado neste trabalho que o tratamento das promastigotas de *L. amazonensis* com peróxido de hidrogênio a 500 μ M por 24 horas em meio de cultura contendo azida de sódio, um inibidor da catalase, causa rigidez de membrana, e os espectros de RPE foram muito similares aos observados para os derivados de chalcona. Além disso, outros estudos também demonstraram que a incubação de eritrócitos com peróxido de hidrogênio por 3 horas em um tampão de fosfato contendo azida de sódio levou à formação de ligações cruzadas envolvendo a hemoglobina com proteínas do esqueleto do eritrócito. Esse fenômeno tem sido associado a uma mudança progressiva na morfologia do eritrócito e redução de sua deformabilidade celular, bem como o aumento da rigidez de membrana (MENDANHA et al., 2012; SYNDER et al., 1985).

O estresse oxidativo celular geralmente tem sua origem no aumento de produção do ânion superóxido mitocondrial, que resulta na formação de outras ROS e produtos de lipoperoxidação, provenientes da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) ω -6, tais como ácidos linoléico, γ -linolênico e araquidônico. Dentre os diversos produtos formados pela peroxidação lipídica, destaca-se o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), um alquenol lipídico altamente bioativo e amplamente estudado. O 4-HNE tem a capacidade de modificar covalentemente a fosfatidiletanolamina (PE), formando diferentes adutos 4-HNE-PE, os quais são responsáveis por aumentar a permeabilidade dos íons sódio na membrana (JOVANOVIC et al., 2019). Por ser anfifílico, o 4-HNE tende a se concentrar em biomembranas, onde pode reagir não apenas com PE, mas também com proteínas de membrana, como transportadores, canais iônicos e receptores (POLI et al., 2008). Alterações conformacionais de proteínas mediadas por 4-HNE são

geralmente atribuídas à sua capacidade de modificar moléculas por ligação covalente a resíduos de proteína cisteína (Cys), lisina (Lys) e histidina (His) (POLI et al., 2008; JOVANOVIC et al., 2015). Recentemente, foi demonstrado que o 4-HNE puro tem a capacidade de causar rigidez de membrana plasmática em promastigotas de *L. amazonensis*, produzindo aumentos no parâmetro de RPE 2A// semelhantes aos encontrados neste para os compostos tipo chalcona (ALONSO et al., 2022b).

Resultados anteriores obtidos para o fármaco antiparasitário ivermectina (ALONSO, DORTA & ALONSO, 2022) corroboram a compreensão de que a ação primária dos compostos similares a chalcona estudados neste trabalho ocorre na membrana plasmática do parasita. É amplamente conhecido que a ivermectina ativa os canais de cloreto controlados por glutamato no parasita, resultando em um influxo de íons cloreto e, conseqüentemente, hiperpolarização da membrana plasmática (KANE et al., 2000; PRIEL & SILBERBERG, 2004). Essa hiperpolarização, por sua vez, pode levar a uma alteração no potencial de membrana mitocondrial, desencadeando uma série de eventos, incluindo a produção de ânion superóxido a partir do vazamento de elétrons na membrana mitocondrial. A subsequente peroxidação lipídica causada pelo ânion superóxido resulta na formação de aldeídos reativos, como o 4-HNE, que induzem rigidez na membrana.

O valor de c_{m50} encontrado para a ivermectina foi de 0,98 M, o que sugere que é necessária uma grande quantidade de moléculas de ivermectina para afetar os canais de cloro na membrana do parasita (ALONSO, DORTA & ALONSO, 2022). Com base nesses resultados, acredita-se que os compostos tipo chalcona investigados neste estudo possam causar alterações conformacionais nos canais iônicos do parasita, modificando o seu potencial de repouso e, conseqüentemente, o potencial de membrana mitocondrial. Essas descobertas indicam que os compostos tipo chalcona podem compartilhar mecanismos semelhantes ao da ivermectina na modulação dos canais iônicos, que pode resultar na rigidez de membrana do parasita. Sendo necessário para confirmar esse mecanismo um estudo das interações dos compostos com proteínas ou utilizando modelo de cultura de células.

6 CONCLUSÃO

A análise por espectroscopia de RPE de marcadores de spin revelou que o tratamento das promastigotas de *L. amazonensis* em cultura com os novos compostos LQFM332 (4), LQFM333 (5) e LQFM341 (6), causou rigidez na membrana plasmática de maneira dependente da concentração dos compostos. Os espectros de RPE observados foram atípicos, e as alterações foram consistentes com a ocorrência de peroxidação lipídica e/ou oxidação de proteínas de membrana. Já os resultados dos ensaios antiproliferativos revelaram que o composto LQFM332 (4) foi mais efetivo que o LQFM341 (6) contra a forma promastigota do parasita, entretanto para a forma amastigota internalizada no macrófago, o resultado foi inverso, isto é, o composto LQFM341 (6) foi mais eficiente.

Com base nos dados dos ensaios antiproliferativos e da espectroscopia de RPE, foram calculados parâmetros biofísicos que indicaram um grande acúmulo dos três compostos na membrana de promastigotas de *L. amazonensis*. Os parâmetros biofísicos também mostraram que a presença do grupo BHT do composto LQFM332 (4), ao invés do 4-hidroxi-3-metoxifenil do composto LQFM333 (5), resultou em um aumento de afinidade por membrana e da atividade leishmanicida. Por outro lado, a redução da ligação dupla no acceptor de Michael do composto LQFM332 (4), transformando-o no composto LQFM341 (6), reduziu a sua afinidade por membrana, levando a uma menor atividade em baixas concentrações celulares. No entanto, em concentrações celulares mais altas, que são fisiologicamente mais relevantes, as atividades leishmanicidas destes dois compostos (4 e 6) foram equivalentes. Ressalta-se que o fato do composto LQFM341 (6) ter uma maior eficácia contra amastigotas, sugere que a menor afinidade pela membrana favorece o acesso ao parasito no interior do macrófago.

Portanto, considerando que os compostos se acumulam em altas concentrações na membrana celular e que os resultados foram semelhantes aos relatados para a ivermectina, pode-se interpretar que a ação primária dos compostos estudados ocorre na membrana do parasita. É possível que esses derivados de chalcona afetem os canais iônicos da membrana, alterando o potencial de repouso da célula e, conseqüentemente, o potencial de membrana mitocondrial, que por sua vez leva à peroxidação lipídica e oxidação de proteínas da membrana plasmática, entre outros possíveis efeitos citotóxicos.

7 PERSPECTIVAS

Como a atividade *in vitro* dos três compostos contra o parasita *L. amazonensis* foi comparável aos fármacos aprovados, surge o interesse em conduzir testes em modelos animais, desenvolvendo nanopartículas carreadoras, utilizando como veículo um gel facilitador da permeação na pele, com o propósito de viabilizar um tratamento tópico para a leishmaniose cutânea.

Tendo a informação privilegiada que a maior estratégia dos compostos é causar o desequilíbrio iônico, pode-se focar na procura de novos compostos que afetam o transporte iônico do parasita, com menor dano às células hospedeiras. Além disso, é imprescindível realizar mais estudos para investigar o mecanismo de ação dos compostos derivados de chalcona, a fim de confirmar se a ação é na membrana plasmática do parasita.

8 REFERÊNCIAS

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, 2022.

ALONSO, L. et al. Antileishmanial activity of the chalcone derivative LQFM064 associated with reduced fluidity in the parasite membrane as assessed by EPR spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 151, p. 105407, 2020.

ALONSO, L. et al. Antileishmanial activity of 3, 4, 5-trisubstituted isoxazoles by interaction with *Leishmania amazonensis* plasma membrane. **Journal of Molecular Structure**, v. 1249, p. 131604, 2022a.

ALONSO, L. et al. Comparative EPR spectroscopy analysis of amphotericin B and miltefosine interactions with *Leishmania*, erythrocyte and macrophage membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 163, p. 105859, 2021a.

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, 2019.

ALONSO, L. et al. Membrane dynamics in *Leishmania amazonensis* and antileishmanial activities of β -carboline derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1863, n. 1, p. 183473, 2021b.

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, 2022b.

BAILEY, F. et al. A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005739, 2017.

BORGES, E. N. et al. Antileishmanial activities of three chalcone derivatives and their association with plasma membrane rigidity as assessed by EPR spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1292, p. 136123, 2023

CABRAL, B. L. S. et al. A novel chalcone derivative, LQFM064, induces breast cancer cells death via p53, p21, KIT and PDGFRA. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, p. 1-15, 2017.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis: Biology, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 22 de Junho de 2023.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and risk factors, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>. Acesso em: 25 de Junho de 2023.

CHENG, P. et al. Chalcone hybrids and their antimalarial activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 4, p. 1900350, 2020.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251-1265, 2019.

CHRISTENSEN, S. M. et al. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007152, 2019.

CUSTODIO, J. M. F. et al. Benzenesulfonyl incorporated chalcones: Synthesis, structural and optical properties. **Journal of Molecular Structure**, v. 1208, p. 127845, 2020

DAS, M. et al. Chalcone scaffold in anticancer armamentarium: a molecular insight. **Journal of Toxicology**, 2016.

DESOTI, V. C. et al. Trypanocidal action of (-)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. **Marine Drugs**, v. 10, n. 8, p. 1631-1646, 2012.

FAYE, B. et al. Canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Senegal: risk of emergence in humans?. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 14-15, p. 1219-1225, 2010.

FERNANDES, K. S. **Estudo das Interações da Miltefosina com Membranas de *L. (Leishmania) amazonensis* e Macrófagos Peritoneais**. Goiânia, 2016, p. 31. Tese (Doutorado em Física) - Curso de Pósgraduação em Física, Universidade Federal de Goiás- UFG.

FERNANDES, K. S. et al. The cytotoxic activity of miltefosine against *Leishmania* and macrophages is associated with dynamic changes in plasma membrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1859, n. 1, p. 1-9, 2017.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

GARCIA, A. R. et al. Identification of Chalcone Derivatives as Inhibitors of *Leishmania infantum* Arginase and Promising Antileishmanial Agents, **Frontiers in Chemistry** 8 (2021). 2020.

HAGEN, W. Biomolecular EPR Spectroscopy. CRC, Boca Raton, FL, 2009.

HERNÁNDEZ, D. A. A. et al. Overcoming the global burden of neglected tropical diseases. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 7, p. 2049936120966449, 2020.

HERRICKS, J. R. et al. The global burden of disease study 2013: What does it mean for the NTDs?. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005424, 2017.

HOTEZ, P. J. et al. What constitutes a neglected tropical disease?. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0008001, 2020.

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.

JOVANOVIĆ, O. et al. The molecular mechanism behind reactive aldehyde action on transmembrane translocations of proton and potassium ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 1067-1076, 2015.

JUNIOR, L. H. F. et al. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11-19, 2012.

KANE, N. S. et al. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13949-13954, 2000.

KARTHIKEYAN, C. et al. Advances in chalcones with anticancer activities. **Recent Patents on Anti-cancer Drug Discovery**, v. 10, n. 1, p. 97-115, 2015.

KASSI, M. et al. Marring leishmaniasis: the stigmatization and the impact of cutaneous leishmaniasis in Pakistan and Afghanistan. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, p. e259, 2008.

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.

LIN, P. H. et al. Dietary compound isoliquiritigenin, an antioxidant from licorice, suppresses triple-negative breast tumor growth via apoptotic death program activation in cell and xenograft animal models. **Antioxidants**, v. 9, n. 3, p. 228, 2020.

LÓPEZ, R. E. S. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, p. 1541-1548, 2010.

MAAROUF, M. et al. Ribosomes of Leishmania are a target for the aminoglycosides. **Parasitology Research**, v. 81, p. 421-425, 1995.

MANN, S. et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021.

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.

MICHALKOVA, R. et al. Molecular mechanisms of antiproliferative effects of natural chalcones. **Cancers**, v. 13, n. 11, p. 2730, 2021.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1153-1169, 2007

MONDAL, D. et al. Quantifying the infectiousness of post-kala-azar dermal leishmaniasis toward sand flies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 2, p. 251-258, 2019.

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.

NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B (11) para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 1092-1101, 2011.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de Informação Regional de Leishmanioses nas Américas (SisLeish). Washington, DC: OPAS; 2022.

ORLIKOVA, B. et al. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes & Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 125-147, 2011.

PAHO, Pan American Health Organization. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas. Washington, D.C.: PAHO; 2019.

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.

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

PRIEL, A.; SILBERBERG, S. D. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. **The Journal of General Physiology**, v. 123, n. 3, p. 281-293, 2004.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

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

ROZMER, Z.; PERJÉSI, P. Naturally occurring chalcones and their biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, p. 87-120, 2016

RUDRAPAL, M. et al. Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: Chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7177, 2021.

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

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 525-534, 2005.

SINHA, S. et al. Ultrastructural alterations in *Plasmodium falciparum* induced by chalcone derivatives. **BMC Research Notes**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2020.

STONE, N. R. H. et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. **Drugs**, v. 76, p. 485-500, 2016.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

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.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525-e532, 2011.

WALYELDEEN, A. A. et al. Chalcones: Promising therapeutic agents targeting key players and signaling pathways regulating the hallmarks of cancer. **Chemico-Biological Interactions**, p. 110297, 2022.

WERMUTH, C. G. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 1998.

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.

WHO, World Health Organization. Leishmaniasis, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.

YAN, S. et al. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony (III) and trypanothione. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, p. 689-697, 2003.

ZHUANG, C. et al. Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762-7810, 2017.