



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
COLEGIADO DE FARMÁCIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CATARINA ARAÚJO MENEZES CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO FERAI E SUA
NANOPARTÍCULA FRENTE À *Leishmania braziliensis*.**

Salvador, Bahia

2025

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
COLEGIADO DE FARMÁCIA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CATARINA ARAÚJO MENEZES CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO FERAI E SUA
NANOPARTÍCULA FRENTE À *Leishmania braziliensis*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Colegiado de Farmácia para obtenção do
grau de bacharelado em farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisalva
Teixeira Guimarães

Salvador, Bahia

2025

FOLHA DE APROVAÇÃO**CATARINA ARAUJO MENEZES CAMPOS****AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO FERAI E SUA
NANOPARTÍCULA FRENTE À *Leishmania braziliensis*.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado de Farmácia, em 16 de dezembro de 2025, como requisito para obtenção do grau de bacharelado em farmácia, pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

BANCA EXAMINADORA:

Elisalva Teixeira Guimarães.

Profa. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães – Orientadora – UNEB

Laisia Falcão Alonso Uzêda

Prof. MSc. Laisia Falcão Alonso Uzêda – Membro interno – UNEB

Francisnaira da Silva Santos.

Prof. MSc. Francisnaira da Silva Santos – Membro externo

Salvador, Bahia

2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter me guiado e mostrado os caminhos até chegar aqui, tudo vem e vai por um propósito maior, e tenho a plena certeza que a minha jornada sempre será iluminada por Ele.

À minha mãe, Meire, dedico não só esse trabalho, mas tudo que conquistei na minha vida, agradeço incansavelmente por todo apoio, amor e suporte em todo esse processo, nunca serei capaz de expressar em palavras a minha gratidão pela senhora ter sido a minha maior incentivadora, sem a senhora eu não seria nem metade do que sou hoje. Em cada detalhe, vejo uma mãozinha sua ali, sempre me dando forças e confiando que tudo dará certo, e no fim das contas, deu certo mesmo! Obrigada por apostar em mim sem pensar duas vezes, confiar no meu potencial e por ter sempre uma palavra amiga para me dar nos meus momentos de desespero. Sem dúvidas o maior presente que a vida me deu foi a honra de ser a sua única filha! Eu te amo imensamente.

À minha família, em especial as minhas avós, Dete e Dai, agradeço por acompanhar de perto todo o processo, entre dúvidas, receios e medos, nunca estive sozinha, sempre soube que teria pessoas que me amam ao meu redor me apoiando e me dando a certeza que eu sempre terei para onde voltar.

Ao meu namorado, Pedro, que esteve comigo em tantos momentos de dúvidas, obrigada por ser a minha maior certeza, com você pude evoluir como ser humano e pude viver tantas experiências que se tornaram inesquecíveis. Peço, obrigada por ser meu companheiro, meu melhor amigo e meu suporte, graças a você eu tenho a certeza que o futuro brilhante que sempre almejamos está cada dia mais perto de se tornar real. Eu te amo sempre mais!

Aos meus amigos de graduação, em especial à Larissa, Lara, Lua, Vitória e Rodrigo, gostaria de agradecer todo companheirismo, suporte e amor nos momentos mais difíceis, todos esses anos de dedicação foram mais fáceis por que tive vocês para deixar o processo mais leve e divertido. Obrigada por fazer parte da minha história!

Gostaria também de dedicar esse encerramento de ciclo à minha grande amiga e teacher Beatriz, por ser uma grande incentivadora. Graças a você eu vivi algo que para mim era impossível e pude ser testemunha que, sim, nossos sonhos podem ser uma realidade quando nos dedicamos e acreditamos em nós mesmos, e que tudo fica mais fácil quando temos com quem contar.

À minha orientadora e mãe acadêmica, Elisalva, a nossa história começou

a 5 anos atrás quando a senhora me deu a oportunidade de participar do seu grupo, e então, até hoje nunca nos desgradamos! Foram muitos momentos de alegrias e desafios, mas que me fizeram ser quem sou hoje. Prózinha, sempre vou te levar no meu coração como pessoa que moldou minha postura acadêmica para sempre tentar ser a mais correta e dedicada possível, muito obrigada!

Ao meu eterno grupo de pesquisa, GEPPE, e em especial as minhas companheiras fiéis de trabalho, Beatriz, Laísia, Naira e Mari, muito obrigada por enfrentarmos juntas esse desafio que é a pesquisa científica, nunca foi e nunca será fácil, mas quando temos uma equipe baseada em amizade e dedicação, tudo fica mais leve! Sempre vou levar na memória muitos momentos especiais (e perrengues) ao lado de todas vocês!

Aos meus amigos que estiveram comigo em todos os momentos, obrigada por estarem também aqui em mais um encerramento de ciclo! Vocês fazem parte da minha vida e tenho enorme gratidão por uma vida inteira de parceria!

Gostaria de agradecer a minha instituição de ensino, a Universidade do Estado da Bahia, pelo seu corpo docente e pelo suporte ao crescimento acadêmico de cada estudante. E a Fiocruz, que foi o maior suporte estrutural para que esse trabalho saísse do papel.

**Se você apenas olhar para trás, nunca
vai conseguir ver o que está à frente**

Agora suba e olhe!

- Ratatouille

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO FERAI E SUA NANOPARTÍCULA FRENTE À *Leishmania braziliensis*.

INTRODUÇÃO: A leishmaniose é um grupo de doenças parasitárias que tem como agente etiológico o protozoário do gênero *Leishmania*. As alternativas de tratamento para essa condição clínica são poucas e os mais utilizados causam efeitos adversos graves, elevada toxicidade, administração dolorosa, alto custo e crescente resistência medicamentosa. Neste contexto, torna-se necessária a identificação de novas alternativas terapêuticas com ação leishmanicida. **OBJETIVO:** Este trabalho teve como objetivo a investigação da atividade de uma chalcona inédita e sua nanopartícula contra *Leishmania braziliensis*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos da linhagem J774 e da viabilidade frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* após o tratamento com a chalcona inédita e sua nanopartícula foi mensurada utilizando o teste do Alamar Blue®. O número de macrófagos infectados e o número de amastigotas/100 células foi determinado por contagem direta em microscópio óptico. As alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. braziliensis* foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** O FERAI foi cerca de dezoito vezes menos citotóxico que a anfotericina B (FERAI: $CC_{50} = 66 \pm 0,12 \mu\text{M}$; anfotericina B: $CC_{50} = 3,6 \pm 0,50 \mu\text{M}$) enquanto a NANO-FERAI foi cerca de vinte vezes menos citotóxico. Além disso, a chalcona inibiu a proliferação de promastigotas e de amastigotas de *L. braziliensis* ($IC_{50} = 9,75 \pm 1,7 \mu\text{M}$; $10,13 \pm 0,05 \mu\text{M}$, respectivamente), sendo cerca seis vezes mais seletivo para os parasitos do que para células. O FERAI e a NANO-FERAI reduziram de forma concentração dependente a porcentagem de macrófagos infectados por *L. braziliensis* e o número de parasitos intracelulares/macrófagos quando comparado com o controle negativo. Alterações à nível celular também foram observadas após o tratamento com FERAI e a NANO-FERAI como a retração e abaulamento do corpo celular, formação de bolhas na membrana e a desconfiguração do parasito. **CONCLUSÕES:** Os resultados sugerem a NANO-FERAI otimizou a atividade antileishmania do FERAI, sendo potenciais candidatas a tratamentos mais seguros e eficazes contra a leishmaniose.

Palavras-chave: Chalcona; Nanopartícula; *Leishmania braziliensis*; Mecanismo de ação.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ACTIVITY OF FERAI AND ITS NANOPARTICLE AGAINST *Leishmania braziliensis*

INTRODUCTION: Leishmaniasis comprises a group of parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Treatment options for this clinical condition are limited, and commonly used drugs exhibit severe adverse effects, high toxicity, painful administration, high cost, and increasing drug resistance. Therefore, there is a critical need to identify new therapeutic alternatives with leishmanicidal action. **OBJECTIVE:** This study aimed to investigate the activity and mechanism of action of a novel chalcone and its nanoparticle against *Leishmania braziliensis*. **MATERIALS AND METHODS:** Evaluation of cytotoxicity in murine macrophages of J774 lineage and viability against promastigote and amastigote forms of *L. braziliensis* following treatment with the novel chalcone and its nanoparticle was measured using the Alamar Blue® assay. The number of infected macrophages and the number of amastigotes per 100 cells were determined by direct counting under optical microscope. Ultrastructural changes in *L. braziliensis* promastigotes was evaluated by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. **RESULTS AND DISCUSSION:** FERAI was approximately eighteen times less cytotoxic than Amphotericin B (FERAI: $CC_{50} = 66 \mu\text{M} \pm 0,12 \mu\text{M}$; Amphotericin B: $CC_{50} = 3,6 \mu\text{M} \pm 0,50 \mu\text{M}$), while NANO-FERAI was twenty times less cytotoxic. Furthermore, the chalcone inhibited the proliferation of *L. braziliensis* promastigotes and amastigotes ($IC_{50} = 9,75 \mu\text{M} \pm 1,7 \mu\text{M}$; $10,13 \mu\text{M} \pm 0,05 \mu\text{M}$, respectively), being about six times more selective for the parasites than cells. FERAI and NANO-FERAI reduced, in a concentration-dependent manner, the percentage of macrophages infected by *L. braziliensis* and the number of intracellular parasites/macrophage when compared to the negative control. Cellular-level alterations were also observed after treatment with FERAI and NANO-FERAI, such as cell body retraction and bulging, and parasite disconfiguration. **CONCLUSIONS:** The results suggest that NANO-FERAI optimized the antileishmanial activity of FERAI, being potential candidates for safer and more effective treatments against leishmaniasis.

KEYWORDS: Chalcone; *Leishmania braziliensis*; Mechanism of action

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| CC₅₀ | Concentração citotóxica para 50% das células |
| CI₅₀ | Concentração inibitória 50% |
| COX | Ciclooxigenase |
| DCV | Departamento de Ciências da Vida |
| DMEM | Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: " <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> ") |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| LC | Leishmaniose cutânea |
| LETI | Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia |
| LM | Leishmaniose mucosa |
| LT | Leishmaniose tegumentar |
| LV | Leishmaniose visceral |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| min | Minuto |
| mL | Mililitros |
| NO | Óxido nítrico (do inglês: " <i>Nitric Oxide</i> ") |
| OPAS | Organização Pan-Americana da Saúde |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PG | Prostaglandinas |
| REA | Relação estrutura-atividade |
| SBF | Soro bovino fetal |
| UNEB | Universidade do Estado da Bahia |
| USA | Estados Unidos da América (do inglês: " <i>United States of America</i> ") |

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Incidência mundial das leishmanioses. (A) Leishmaniose visceral;(B) Leishmaniose cutânea

Figura 2: Formas evolutivas da leishmania. (A) Forma promastigota; (B) Forma amastigota

Figura 3: Ciclo de vida da Leishmaniose

Figura 4: Diferentes formas de manifestação clínica da leishmaniose tegumentar americana (LTA).

Figura 5: Manifestação clínica da leishmaniose visceral (LV).

Figura 6: Estrutura química do antimoniato de meglumina tem um átomo de estibônio (Sb) pentavalente, também chamado de antimônio, em sua estrutura.

Figura 7: Estrutura química da anfotericina B

Figura 8: Estrutura química da miltefosina

Figura 9: Estrutura química base das chalconas

Figura 10: Estrutura da Licochalcona A

Figura 11: Diferentes tipos de nanopartículas

Figura 12: Chalcona e seus respectivos derivados p-substituídos

Figura 13: Estrutura química do FERAI

Figura 14: Efeito do FERAI e sua forma nanoparticulada na infecção de macrófagos por *L. braziliensis*.

Figura 15: Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. braziliensis* após o tratamento com o FERAI e NANO-FERAI por microscopia eletrônica de varredura

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Valores estimados de tratamentos contra leishmaniose, segundos dados do Ministério da Saúde, 2023

Tabela 2: Atividade antiparasitária e citotóxica da FERAI e sua forma nanoparticulada frente a promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 16 |
| 3.1. Aspectos epidemiológicos | 16 |
| 3.2. Ciclo de vida e manifestações clínicas da leishmaniose | 18 |
| 3.3. Tratamentos disponíveis | 22 |
| 3.4. Chalconas | 25 |
| 3.5. Nanoengenharia e nanopartículas | 26 |
| 3.6. Relação estrutura-atividade das chalconas | 27 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 4.1. Moléculas | 29 |
| 4.2. Formulações de nanopartículas lipídicas | 29 |
| 4.3. Células | 29 |
| 4.4. Parasitos | 30 |
| 4.5. Ensaio de viabilidade celular para avaliação da atividade antiparasitária | 30 |
| 4.6. Teste de citotoxicidade sobre macrófagos <i>in vitro</i> | 30 |
| 4.7. Determinação do Índice de Seletividade (IS) | 31 |
| 4.8. Infecção com macrófagos J774 e <i>Leishmania braziliensis in vitro</i> | 31 |
| 4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 32 |
| 4.10. Análise Estatística | 32 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 5.1. Atividade antiparasitária e citotóxica do FERAI e sua forma nanoparticulada | 35 |
| 5.2. O FERAI e sua forma nanoparticulada são eficazes contra a infecção por <i>Leishmania braziliensis</i> | |
| 5.3. O FERAI altera a morfologia de promastigotas | 36 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 39 |
| 7. REFERÊNCIAS | 40 |

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças zoonóticas com transmissão vetorial e ciclo de transmissão complexo, que envolve uma pluralidade de parasitos, reservatórios e vetores (OMS, 2021). Estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas são afetadas por esta doença, com aproximadamente 700.000 a 1 milhão de novos casos/ano e 350 milhões de pessoas vivem em área de risco. É considerada a segunda principal causa de morte por parasitos, responsável por aproximadamente 30.000 mortes por ano (OMS, 2020). No período de 2001 a 2021, um total de 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) foram notificados à OPAS, correspondendo a uma média de 52.645 casos por ano. No mesmo período, foram registrados 69.665 novos casos de leishmaniose visceral (LV), com média anual de 2.488 casos e taxa de letalidade de cerca de 8% – considerada a mais alta quando comparada a outros continentes (OPAS, 2021).

Este complexo de doenças é causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, parasito pertencente à família *Trypanosomatidae*, transmitido aos humanos pela picada das fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Gontijo; Carvalho, 2003; BATES, 2018, Brasil, 2019), cujo nome popular é “mosquito-palha” ou “birigui”. Estão incluídos nesse grupo a leishmaniose cutânea (LC), a mucocutânea (LMC), a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a Leishmaniose Visceral (LV). A LMC é a aquela em que lesões ulcerosas destrutivas surgem nas mucosas do nariz, da boca e da faringe (Siqueira-Batista, 2020).

Os tratamentos atuais utilizados em pacientes com leishmaniose apresentam elevada toxicidade (Lúcia, 2016). Além disso, efeitos adversos como dor abdominal, vômito, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade são constantes (Hendrickx *et al.*, 2019). Todas as terapias utilizadas atualmente não foram desenvolvidos inicialmente para tratamento contra a leishmaniose e apresentam uma série de limitações, que incluem a aplicação dolorosa, a exigência de administração prolongada e a necessidade de hospitalização (Romero & Lopez, 2017; Tiwari, 2018). Além de todos esses malefícios, esses medicamentos possuem elevadas taxas de recidivas, resistência parasitária e custo elevado (Carvalho *et al.*, 2021).

Este cenário demonstra a urgência na busca de substâncias ativas de fácil administração, com menor toxicidade e maior eficácia no combate da doença.

Essa perspectiva foi intensificada nos últimos anos através diversos compostos isolados que vêm demonstrando propriedades bioativas promissoras, a exemplo de flavonoides, alcaloides e compostos fenólicos (Sandilyan et al., 2018; Kloostern, 2016).

As chalconas, moléculas que são pertencentes a classe dos flavonoides, têm despertado interesse científico devido ao grande número de atividades farmacológicas identificadas, como a anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiparasitária (Castaño *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019; Gao; Huang; Xiao, 2020). Concomitante a essa promissora molécula, a utilização da nanoengenharia para aprimorar e aumentar a biocompatibilidade de compostos tem favorecido a redução de diferentes efeitos adversos. É justamente na busca destas características que a nanotecnologia tem viabilizado o desenvolvimento científico-tecnológico, por meio do fornecimento de novos materiais funcionais (nanopartículas, nanofios, nanotubos) e técnicas de manipulação da matéria na nanoescala. Por exemplo, bioreceptores, biomoléculas como enzimas e anticorpos capazes de reconhecer um biomarcador de uma dada doença, são entidades de dimensão nanométrica fundamentais para conferir seletividade aos dispositivos (Furlan, 2022).

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram a atividade antileishmania de uma chalcona bromada, o FERAI (Santos, 2023; Silva *et al.*, 2025). No presente trabalho, investigou-se a atividade antileishmania de duas chalconas individualmente, com intuito de comparar e evidenciar possíveis atividades aprimoradas com a nanoengenharia aplicada ao composto.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade do FERAI e sua nanopartícula contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania braziliensis in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade dos compostos em estudo;
- Avaliar a atividade anti- *L. braziliensis* dos compostos em ensaios com o parasito axênico e em ensaio de infecção de macrófagos de linhagem com o parasito em testes *in vitro*;
- Analisar as alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. braziliensis* tratados com FERAI e sua nanopartícula.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Aspectos Epidemiológicos

A leishmaniose é uma doença crônica, não contagiosa, e com transmissão por vetores. É considerada uma doença com ampla distribuição no mundo, e prevalente em todos os continentes, que afeta a saúde e o trabalho do indivíduo acometido. Apesar da importância clínica, ainda apresenta-se negligenciada e demanda prevenção, controle dos vetores e de seus reservatórios (Júnior *et al.*, 2021). Foram identificadas 15 das 22 espécies de leishmanias patogênicas para humanos e cerca de 54 diferentes espécies de vetores que estão potencialmente envolvidos na transmissão. No período de 2001 a 2021, um total de 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) foram notificados à OPAS, correspondendo a uma média de 52.645 casos por ano. No mesmo período, foram registrados 69.665 novos casos de leishmaniose visceral (LV), com média anual de 2.488 casos e taxa de letalidade de cerca de 8% – considerada a mais alta quando comparada a outros continentes (OPAS, 2021).

A LC, a forma mais comum de leishmaniose, é causada por diferentes espécies nos hemisférios oriental (Velho Mundo) e ocidental (Novo Mundo). *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica* são os principais agentes etiológicos da doença no Velho Mundo. No Novo Mundo, destacam-se as espécies incluídas no complexo *Leishmania mexicana* (*Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania venezuelensis*) ou no subgênero *Viannia* (*Leishmania [Viannia] braziliensis*, *Leishmania [Viannia] guyanensis*, *Leishmania [Viannia] panamensis* e *Leishmania [Viannia] peruviana*). *Leishmania infantum/Leishmania chagasi* e *Leishmania donovani* são responsáveis pela forma visceral da condição mórbida (CDC, 2018; Real et al.; 2013; Van der Auwera; Dujardin, 2015).

A doença está presente em cinco dos seis continentes com casos citados por 98 países (Figura 1). Dados publicados pela OMS em 2022 relatam que 48 países são endêmicos de leishmaniose visceral e 50 países endêmicos de leishmaniose tegumentar (OMS, 2022).

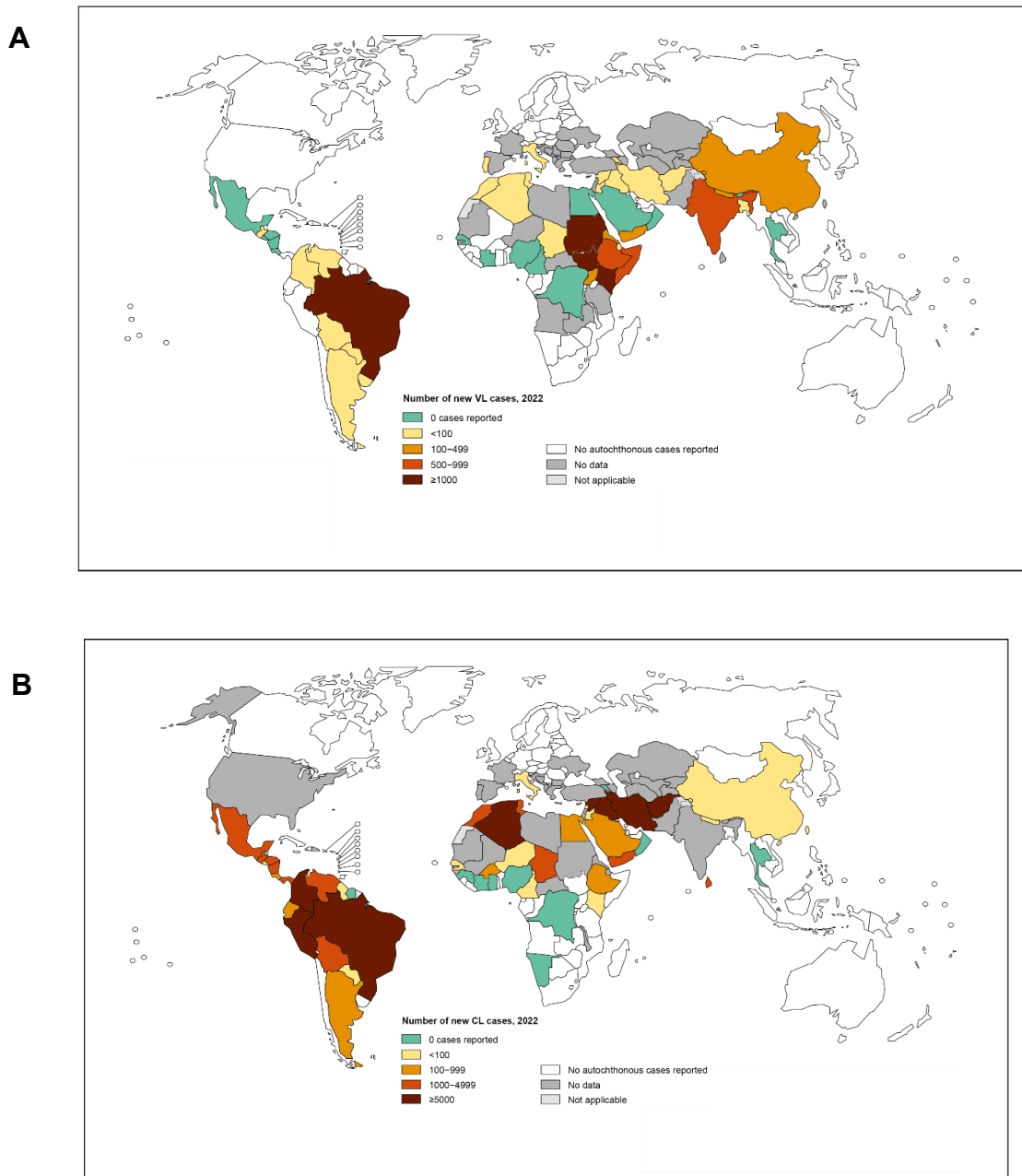


Figura 1. Incidência mundial das leishmanioses. (A) Leishmaniose visceral;(B) Leishmaniose cutânea (Adaptado de OMS, 2022).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é o maior desafio epidemiológico nas Américas em termos de volume de pacientes, sendo endêmica em 20 países da região. Entre os anos de 2018 e 2022, a LTA manteve uma alta taxa de notificação, com aproximadamente 50.000 a 55.000 novos casos registrados anualmente. Esta carga da doença está altamente concentrada, com o Brasil, a Colômbia e o Peru notificando, em conjunto, mais de 85% do total regional. Tendo a *L. braziliensis* como principal agente no Brasil, a LTA permanece como um problema de saúde pública que exige o desenvolvimento de

fármacos mais seguros e eficazes para prevenir a progressão para as formas mucocutâneas destrutivas (OPAS, Boletins Epidemiológicos Recentes).

3.2. Ciclo de vida e manifestações clínicas da Leishmaniose

Protozoários do gênero *Leishmania* apresentam dois estágios evolutivos bem distintos (Lago *et al.*, 2019). As formas promastigotas extracelulares, alongada, flagelada, móvel e as formas amastigotas, as quais são intracelulares obrigatórias, esféricas ou ovais e com cinetoplasto localizado próximo ao núcleo (Figura 2) (Anversa *et al.*, 2018; Hussaini *et al.*, 2017).



Figura 2: Formas evolutivas da leishmania. (A) Forma promastigota; (B) Forma amastigota (SIQUEIRA-BATISTA, 2020).

O ciclo biológico da leishmania é heteroxeno (digenético), com dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. O hospedeiro invertebrado, a fêmea do flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo em animal infectado, ingere sangue contendo células do sistema fagocítico mononuclear com as formas amastigotas (Figura 2B). Durante a passagem pelo intestino do vetor, ocorre a

diferenciação em promastigotas e a multiplicação por divisão binária. O processo de metaciclogênese culmina na formação das promastigotas metacíclicas, que representam a forma infectante do parasito (Figura 2A).

Ao realizar o repasto sanguíneo em hospedeiro suscetível, o vetor infectado poderá regurgitar os promastigotas metacíclicos, os quais, por fagocitose, são internalizados pelas células do sistema fagocítico mononuclear, reduzem de tamanho, perdem o flagelo e se diferenciam em mastigotas. Estes se multiplicam até o rompimento dos macrófagos, quando podem infectar outras células ou serem ingeridos pelo flebotomíneo, viabilizando a manutenção e o prosseguimento do ciclo (Figura 3).

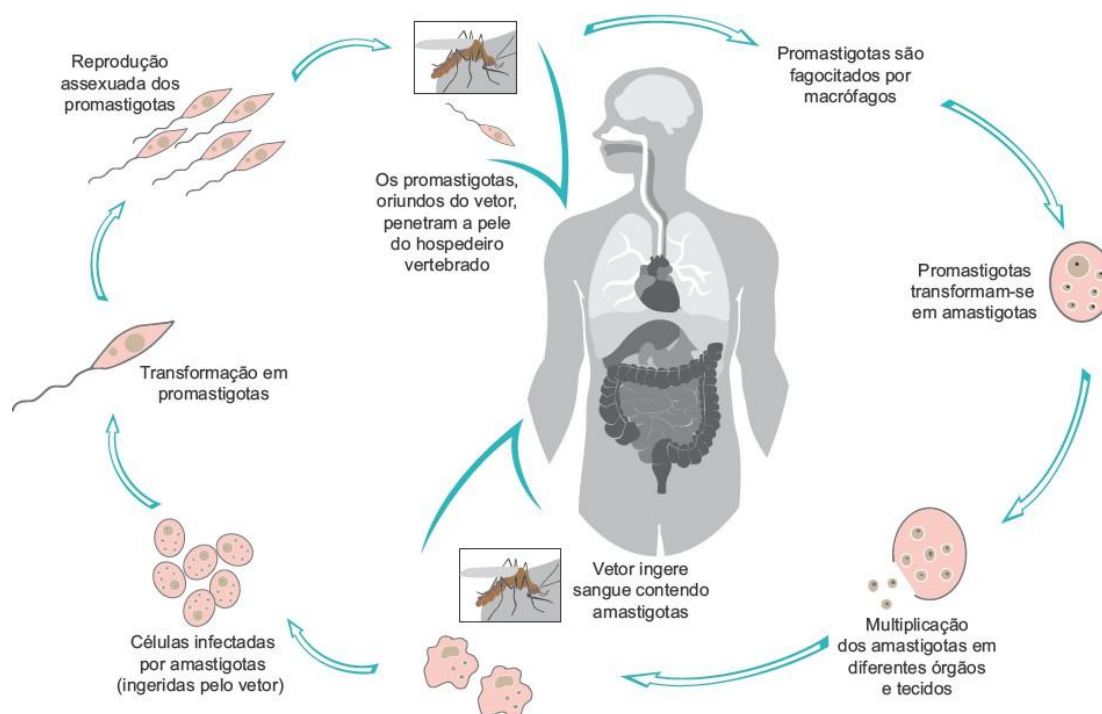


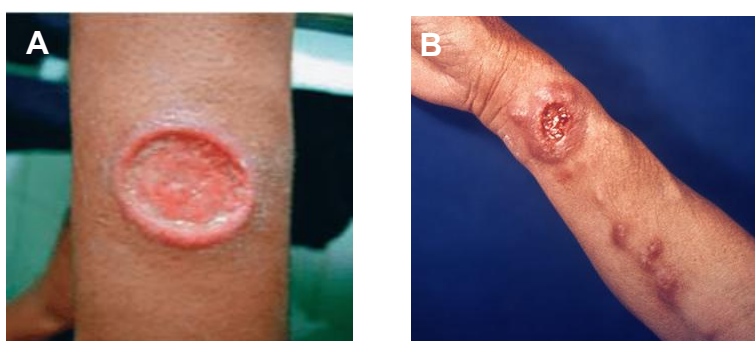
Figura 3: Ciclo de vida da Leishmaniose (fonte: Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2023)

A LT apresenta-se sob quatro formas clínicas bem definidas: a leishmaniose cutânea, a leishmaniose mucosa, a leishmaniose cutânea difusa e a leishmaniose cutânea disseminada. Esta diversidade de apresentações clínicas está diretamente relacionada com a carga genética e o estado imunológico do hospedeiro, bem como com a variabilidade antigênica e grande capacidade de adaptação dos parasitos (Yurdakul *et al.*, 2005; Kaye & Scott, 2011; Goto & Lindoso, 2012). As principais espécies envolvidas na LT são a *L. amazonensis*, a *L. braziliensis*, a *L. major*, a *L. mexicana*, a *L. tropica*, a *L. panamensis* e a *L. guyanensis*. A leishmaniose cutânea se manifesta como

lesões ulceradas, de bordas elevadas, indolores e com fundo granuloso, que acometem exclusivamente a pele, se instalando no sítio de entrada do parasito após um período de incubação, que pode ser de semanas a meses. Esta forma pode desenvolver uma evolução metastática que atinge as mucosas e cartilagens, originando outra manifestação clínica, a leishmaniose mucosa. Esta forma é a mais agressiva de LT, produzindo quadro de lesões desfigurantes da área oronasal, gerando uma tendência à cronicidade e significativa refratariedade ao tratamento, além de consequências psicossociais (Pinheiro *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2009). Cepas de *L. braziliensis* estão 22 envolvidas em manifestações de lesões graves e de longa duração. (Souza *et al.*, 2000; Brasil, 2017).

Embora a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) seja classicamente associada à *L. amazonensis*, a *L. braziliensis* é o agente etiológico dominante no Brasil, sendo responsável por um vasto espectro de apresentações clínicas, que incluem a forma Disseminada (LD). A LD caracteriza-se por múltiplas lesões acneiformes e ulceradas, resultantes da migração do parasito, e a *L. braziliensis* tem sido associada à sua ocorrência (Teles *et al.*, 2023). A complexidade do tratamento se acentua nessas formas graves, onde a elevada carga parasitária e a ineficácia terapêutica se tornam desafios clínicos críticos (Caldas *et al.*, 2020).

Leishmaniose cutânea



Leishmaniose mucocutânea



Leishmaniose disseminada



Leishmaniose difusa



Figura 4: Diferentes formas de manifestação clínica da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Leishmaniose cutânea (Figuras A e B); leishmaniose mucocutânea (Figura C); leishmaniose disseminada (Figura D); leishmaniose difusa (Figura E). Fonte: Adaptado de ESTRATÉGIA MED (2024).

As principais espécies reconhecidas como agentes etiológicos da LV são a *L. donovani*, *L. infantum*, e *L. chagasi*. No Brasil, foram identificados parasitos de *L. infantum chagasi* envolvidos em casos por todo país. A visceralização da doença com a disseminação dos parasitos tem como alvo o sistema retículo-endotelial em vários tecidos, infiltrando-se predominantemente no baço, medula óssea, fígado e linfonodos. A LV apresenta um perfil sistêmico, de curso crônico, grave, e de alta letalidade se não tratada, apresenta principalmente hepatoesplenomegalia, podendo aparecer febres irregulares de intensidade média e de longa duração, acompanhada de diversas alterações hematológicas, principalmente, anemia, leucopenia e trombocitopenia. Associado a isso, o emagrecimento, o edema e o estado de debilidade progressiva contribuem para agravamento dos casos e o óbito. Após o tratamento aparentemente eficaz de LV causado por *L. infantum chagasi*, pode-se desenvolver a leishmaniose dérmica pós-calazar, uma erupção cutânea crônica de difícil tratamento (Desjeux, 2004; Rey, 2010; Brasil 2014; Kaye & Scott, 2011; Mcgwire & Satoskar, 2014; Van Griensven & Diro, 2019).

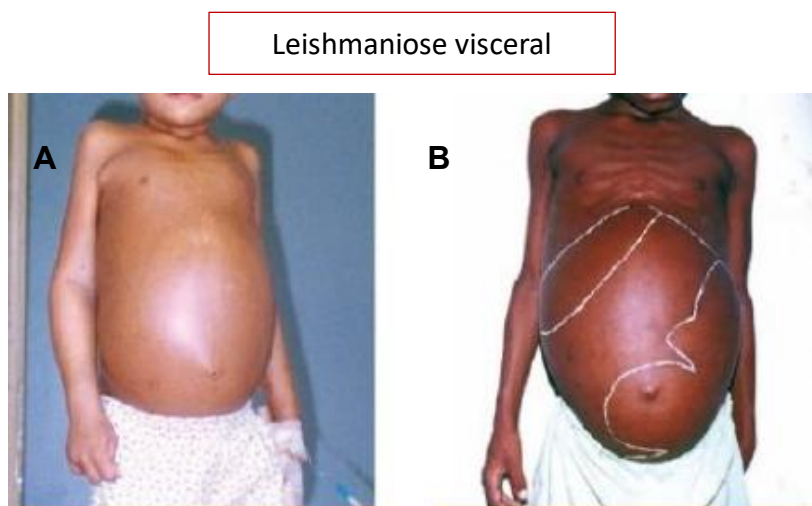


Figura 5: Manifestação clínica da leishmaniose visceral (LV). Leishmaniose visceral (Figuras A e B) Fonte: Adaptado de ESTRATÉGIA MED (2024).

3.3. Tratamentos disponíveis

São poucas as alternativas terapêuticas disponíveis para a leishmaniose, todas relacionadas a significativa toxicidade (Carvalho, E. M. *et al.*, 2018; Goto; Lindoso, 2010; Pinart *et al.*, 2020). Por esse reduzido número de estudos de qualidade, as recomendações mais recentes de tratamento desta doença produzidas pela OPAS/OMS são ainda baseadas em evidências clínicas de baixa ou muito baixa qualidade, e os Antimoniais Pentavalentes, pela maior experiência acumulada, permanecem fortemente recomendados (Paho, 2022).

Os antimoniais trivalentes (SbIII) já eram usados no Brasil em 1912 como o primeiro tratamento eficaz para leishmaniose (Vianna, 1912; Hendrickx, *et al.*, 2019) sendo posteriormente substituídos pelos pentavalentes (SbV) na tentativa de reduzir seus diversos efeitos secundários graves. Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira escolha para todas as formas de leishmaniose (Kato, *et al.*, 2014). A problemática da utilização dos antimoniais pentavalentes incluem efeitos adversos graves sobre o aparelho cardiovascular, sendo necessária uma maior vigilância com pacientes com idade superior a 50 anos, portadores nefropatias e hepatopatias, devido a elevação transitória das transaminases hepáticas e de toxicidade. Nestes casos, a suspensão ou a redução da dose torna-se necessária (Arboleda *et al.*, 2019; Brasil, 2017; Rath *et al.*, 2003; Sampaio, 2017). Mesmo sendo bem tolerado, este fármaco apresenta efeitos indesejados, incluindo alterações gastrintestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancreatite e elevação das transaminases hepáticas (indicativo de sobrecarga e/ou lesão). Também pode ocorrer resistência do parasito, seja por tratamento insuficiente ou pelo abandono, que ocorre em função do difícil acesso aos serviços que realizam o tratamento parenteral (Marques, 2021)

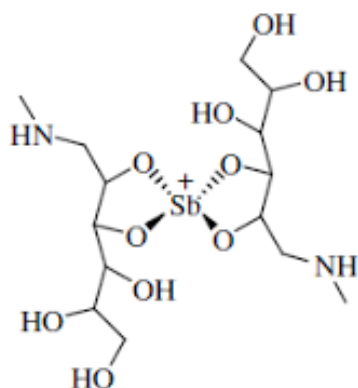


Figura 6: Estrutura química do antimoniato de meglumina tem um átomo de estibônio (Sb) pentavalente, também chamado de antimônio, em sua estrutura.

A anfotericina B é um antimicrobiano e fungicida que interfere na bioenergética das formas amastigotas com alta afinidade por membranas contendo esterol. O ergosterol é o principal esteroide na membrana plasmática dos parasitos de *Leishmania*, sendo assim, anfotericina B liga-se ao ergosterol, causando desorganização da membrana, formação de poros aquosos, alteração da permeabilidade, extravasamento de conteúdo, desequilíbrio iônico e consequente morte do parasito (Hamill, 2013; Kip, *et al.*, 2018; Tiwari, *et al.*, 2018). É a droga de segunda escolha no tratamento, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade de seu uso. Os efeitos indesejados mais frequentes são febres, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão, e não está indicada para cardiopatas, hepatopatas e nefropatas. O custo do tratamento é altíssimo e requer administração parenteral, o que também limita o acesso e adesão ao tratamento (Marques, 2021)

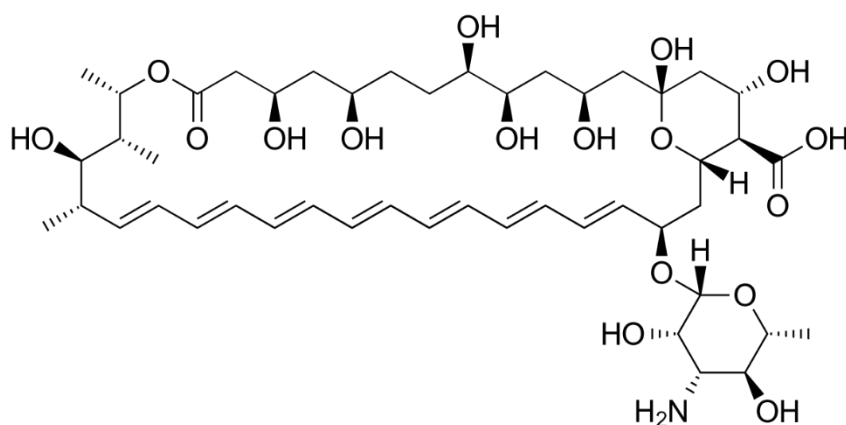


Figura 7: Estrutura química da anfotericina B, estrutura complexa e polar.

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), originalmente desenvolvido com ação anti-inflamatória e antineoplásica, pertence a classe das alquilfosfocolinas, que são ésteres de fosfocolina, álcoois alifáticos de cadeia longa (Kip, *et al.*, 2018; Tiwari, *et al.*, 2018). O fármaco age inibindo a biossíntese de fosfolípidos e esteróis na membrana celular do parasito, interferindo nas vias celulares de sinalização e na permeabilidade da membrana, causando morte celular por apoptose em promastigotas e amastigotas de várias espécies de *Leishmania* (Marques, 2021). Em 2018, a miltefosina foi incorporada para o tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral no Brasil pelo Ministério da Saúde, sendo o primeiro medicamento de administração oral licenciado para uso no ambiente

hospitalar (Brasil, 2018). A miltefosina tem contraindicação absoluta a pacientes que apresentem hipersensibilidade à substância ativa ou a qualquer dos excipientes; danos graves e pré-existentes da função hepática ou renal; Síndrome de Sjogren-Larsson; problemas hereditários raros de intolerância à galactose, deficiência de lactase ou má absorção de glucose-galactase; e gravidez (Marques, 2021)

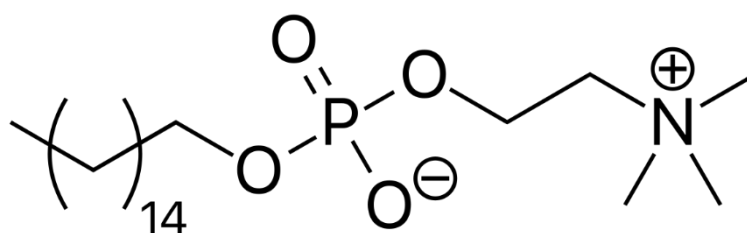


Figura 8: Estrutura química da miltefosina com uma longa cadeia carbônica e grupo fosfato.

Os medicamentos utilizados para o tratamento são adquiridos de forma centralizada pelo MS e a seguir são distribuídos aos estados e ao Distrito Federal, cabendo a esses a distribuição aos municípios (Brasil, 2022). São terapias de custo muito elevado (Quadro 1), inviabilizando a adesão de muitos pacientes.

| MEDICAMENTO | ANO | VALOR EM ÂMBITO AMBULATORIAL (R\$) | INDICAÇÃO CLÍNICA | FONTE |
|--|------|---|-----------------------|-----------|
| Antimoniato de Meglumina 300mg/mL solução injetável | 2018 | 1.025,39 | Visceral e cutânea | MS |
| Anfotericina B 50mg (Lipossomal) | 2018 | 1.727,84 | Visceral e cutânea | MS |
| Miltefosina 50 mg cápsulas | 2019 | 2.822,13 | Visceral | MS |

Tabela 1: Valores estimados de tratamentos contra leishmaniose, segundo dados do Ministério da Saúde, 2023

Em geral, os efeitos colaterais causados por estes medicamentos, a toxicidade, a administração parenteral, os regimes de tratamento prolongados, o elevado custo e o aparecimento de resistência justificam a busca de drogas alternativas mais eficazes (Fernandes, 2014; Cogo, 2018).

A elucidação de um composto que estabeleça uma melhor terapia para a leishmaniose, seja por reduzir o tempo de tratamento, os custos, os efeitos adversos ou o surgimento de cepas resistentes, mantém-se como a principal linha de trabalho no esforço de atenuar a endemicidade dessa infecção (Field, 2017).

3.4. Chalconas

Os produtos naturais e sintéticos são alternativas promissoras na busca de compostos ativos para diferentes atividades biológicas. O uso popular de produtos extraídos da natureza para o tratamento de doenças, por exemplo, acompanha o homem ao longo da sua história. Um terço das drogas mais utilizadas na terapêutica em todo o mundo é derivado de produtos naturais. Segundo Costa e Colaboradores (2004), antes da industrialização dos produtos farmacêuticos, a única fonte de recursos para o tratamento de doenças era os produtos naturais.

As chalconas, moléculas pertencentes a classe dos flavonoides, têm despertado interesse científico devido ao grande número de atividades farmacológicas identificadas, como a anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiparasitária (Castaño *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019; Gao; Huang; Xiao, 2020). Chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-ona) (Figura 6) são um grupo de cetonas aromáticas α - β insaturadas, sintetizadas por plantas e indispensáveis para o funcionamento de seu metabolismo. Participa na sinalização da simbiose entre planta e microrganismo e são conhecidas por conceder a pigmentação amarela das folhas (Díaz-Tielas *et al.*, 2016)

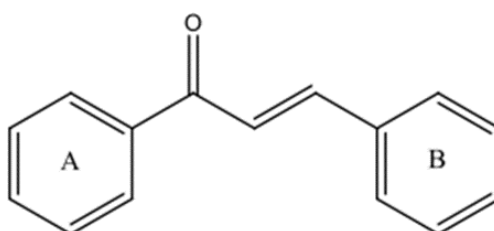


Figura 9: Estrutura química base das chalconas (Mandge, 2007).

Sob o ponto de vista da química medicinal, a relação estrutura-atividade

das chalconas permite que modificações ou adições nos seus substituintes sejam realizadas como estratégias relevantes para reduzir a toxicidade e aumentar o potencial biológico (Ko *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Gutteridge *et al.*, 2007). Outras atividades biológicas das chalconas também são maximizadas a partir da modificação sintética, seja pela diminuição da concentração inibitória média (IC₅₀) ou pela maior bioafinidade que a molécula desenvolve (Sinha *et al.*, 2019).

A primeira chalcona reportada na literatura com atividade leishmanicida foi a licochalcona A, extraída das raízes da planta *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae), conhecida também como alcaçuz chinês. Essa substância apresentou expressivo efeito inibitório sobre o crescimento das formas amastigotas e promastigotas das espécies *Leishmania major* e *Leishmania donovani* (Chen, 1994).

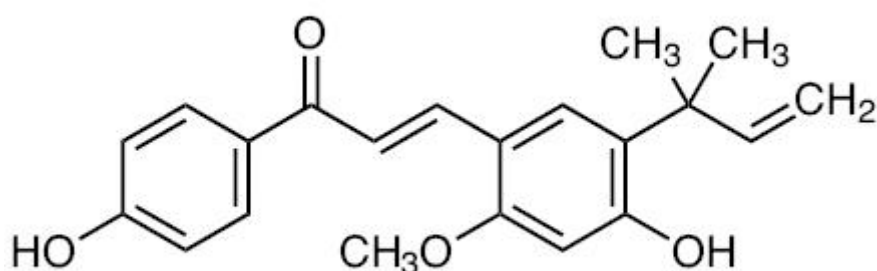


Figura 10: Estrutura da Licochalcona A (TCI Chemicals, 2025)

3.5. Nanoengenharia e nanopartículas

A nanomedicina surgiu como uma nova ferramenta para alavancar os avanços das aplicações de nanomateriais na medicina tradicional. Com isso, inúmeras aplicações de nanomateriais para diagnóstico e tratamento têm sido descritas na literatura desde seu surgimento (Blanco, 2011). A utilização de nanomateriais em medicina faz com que as instrumentações e metodologias tradicionais de análise sejam melhoradas a cada nova descoberta (Kranz, 2011).

O rápido avanço da nanomedicina está intimamente relacionado com algumas propriedades dos nanomateriais as quais permitem aplicações em diagnósticos e terapias. Os agentes terapêuticos podem ser encapsulados, ligados covalentemente ou adsorvidos sobre os nanomateriais, dando origem aos chamados materiais teranósticos que servem para terapia e diagnóstico ao

mesmo tempo. Essas abordagens podem facilmente resolver questões de solubilidade e biodispersão de muitos ativos. Nesse cenário, métodos cada vez mais eficientes têm sido desenvolvidos para a produção de nanomateriais com elevado controle dos seus parâmetros físico-químicos (Chen, 2011). Isso se deve especialmente ao avanço e ao design de nanofármacos, que compreendem um agente farmacêutico aprisionado em um transportador nanoescalar (por exemplo, lipossomas, nano géis, nanopartículas, microemulsões e micelas poliméricas), que se tornaram o mais recente avanço nano tecnológico para melhorar a solubilidade, farmacocinética, perfil de liberação, especificidade do alvo e segurança dos compostos entregues (Souto, 2024)

A limitada quantidade de informações acerca dos efeitos tóxicos desses nanomateriais faz com que a nanomedicina enfrente várias questões regulatórias em um processo complexo e dispendioso, mas necessário, independentemente do nanomaterial ou aplicação (Cancino, 2013). Para isso, metodologias analíticas e biológicas clássicas estão sendo adaptadas para investigações toxicológicas entre nanomateriais e sistemas biológicos. Dentre elas estão a citometria de fluxo, proliferação celular, fragmentação do DNA, ciclo celular, histologia, biodisponibilidade e biodispersão (Kim, 2008).

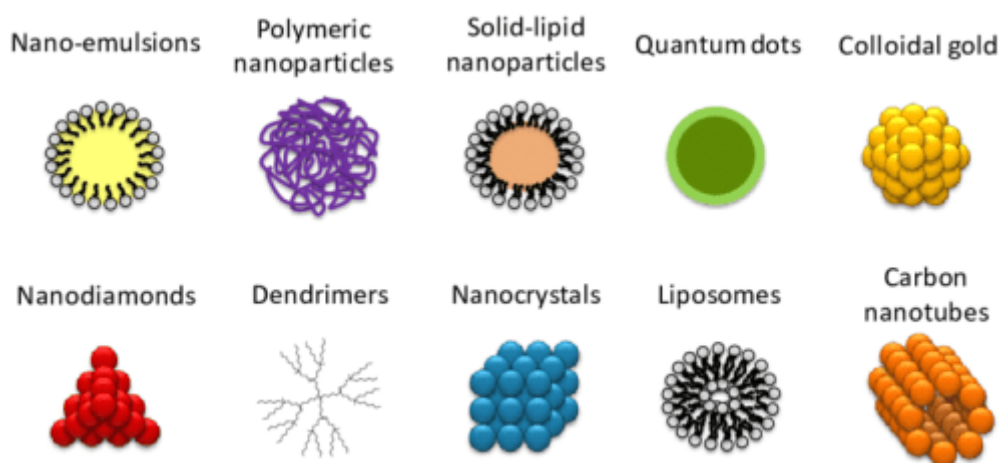


Figura 11: Diferentes tipos de nanopartículas (Fonte: adaptado de IBAP cursos)

3.6. Relação estrutura-atividade de chalconas

Uma molécula ativa e com eficácia elevada é reflexo das interações responsáveis pelo reconhecimento molecular do fármaco pelo biorreceptor (farmacodinâmica) e biodisponibilidade, resultado de fatores responsáveis pela absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco (farmacocinética),

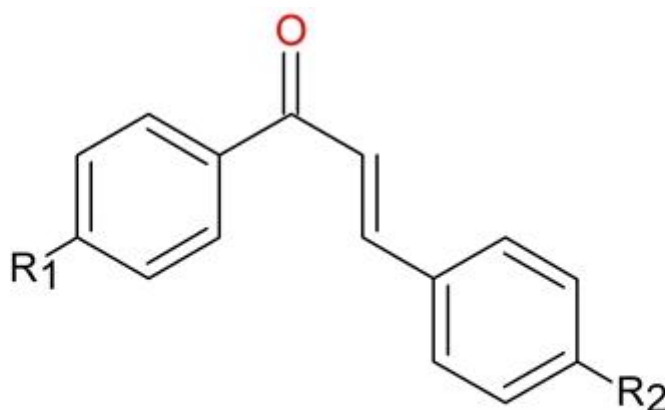
além de apresentar baixa toxicidade (Barreiro, 2001). Os estudos de correlação estrutura e atividade, fundamentados no efeito do substituinte em um determinado anel aromático, são muito comuns na química medicinal, uma vez que mais de 50% dos fármacos ou compostos bioativos possuem este tipo de anel (Calixto, 2001). As substituições feitas em moléculas previamente conhecidas podem modificar diferentes propriedades físico químicas da molécula, como a hidrofobicidade e conformação estrutural, a fim de aprimorar os efeitos biológicos do composto.

As chalconas apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, as quais variam conforme os diferentes substituintes nas moléculas, e são alvo de vários estudos de isolamento, identificação e investigação de suas propriedades. As atividades antioxidantes, bem como as propriedades citotóxicas dos flavonóides, são influenciadas pelo seu grau de pureza, pela posição dos substituintes e pela quantidade de hidroxilas (Schroeter *et al.*, 2002).

Desta forma, muitas chalconas e seus análogos sintéticos têm demonstrado a capacidade de inibir a síntese de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PG), que são produtos das vias óxido nítrico sintetase (NOS) e cicloxigenase (COX), sendo as principais vias pró-inflamatórias. Assim, compostos que atuam nessas vias se constituem promissores para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios e antinociceptivos (Ahmad *et al.*, 2006). As propriedades antioxidantes das chalconas são bastante influenciadas pela presença de dois grupos arila e seus padrões de substituição, sendo o grupamento hidroxila um dos grupos-chave para aumentar a atividade antioxidante devido à sua fácil conversão ao radical fenoxi através do mecanismo de transferência de hidrogênio (Shenvi, 2013).

ANEL A

Chalcona

 $R_1 = H$ 1. $R_1 = CH_3$ 2. $R_1 = OH$ 3. $R_1 = NO_2$ 4. $R_1 = OCH_3$ 5. $R_1 = Cl$ **ANEL B**

Chalcona

 $R_2 = H$ 6. $R_2 = CH_3$ 7. $R_2 = OH$ 8. $R_2 = NO_2$ 9. $R_2 = OCH_3$ 10. $R_2 = Cl$

Figura 12: Chalcona e seus respectivos derivados p-substituídos (Fonte: Santos, 2019)

Nesse contexto, a exploração da variabilidade estrutural das chalconas, buscando otimizar sua atividade antileishmania e, ao mesmo tempo, a aplicar uma nova tecnologia com resultados positivos já relatados, torna-se uma candidata a aprimorar o cenário terapêutico atual para essa condição clínica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Moléculas

Chalconas, pertencentes a classe dos flavonoides, foram preparadas utilizando métodos validados por pesquisadores do grupo liderado pelo Prof. Hemerson Iury Ferreira Magalhães, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Estas moléculas foram gentilmente cedidas para avaliação da atividade antiparasitária pelo nosso grupo de pesquisa. A anfotericina B (Cristália, São Paulo, SP, Brasil) e a violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil) serão utilizadas como controle positivo nos testes antiparasitários. A chalcona avaliada será a (*E*)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona, também chamada de FERAI (Leite, 2024).

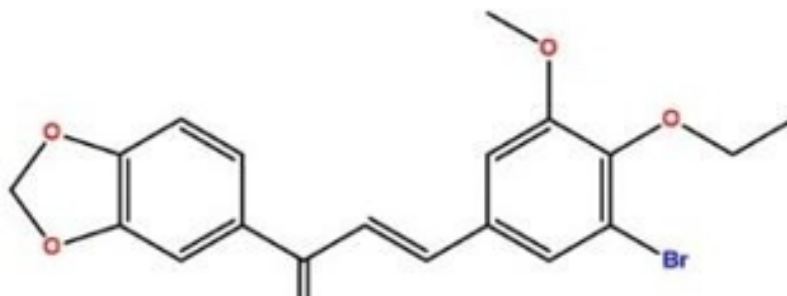


Figura 13: Estrutura química do FERAI (Leite, 2024)

4.2. Formulações de nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas sólidas foram produzidas por método de ultrassonicação (Malik *et al.*, 2014), essa técnica permite a formação de partículas de aproximadamente 30-180 nm com baixa tensão de cisalhamento (Ganesan; Narayanasamy, 2017).

4.3. Células

Os macrófagos de linhagem J774 foram mantidos em meio de cultura celular meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies - GIBCO), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; Gibco, Thermo Fisher Scientific, SP, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) e incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.4. Parasitos

Promastigotas de *L. braziliensis* foram cultivadas em meio de Schneider (Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), suplementado com 10% de SFB (Gibco) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil), sendo incubadas a 26 °C. A densidade dos parasitos foi monitorada diariamente por cinco dias consecutivos, utilizando uma câmara de Neubauer. Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, novas passagens *in vitro* foram realizadas para manutenção da cultura.

4.5. Ensaio de viabilidade celular para avaliação da atividade antiparasitária

Promastigotas de *L. braziliensis* (1×10^6 por poço) foram cultivadas em placa de 96 poços em meio Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; GIBCO, Life Technologies - GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma) e submetidas ao tratamento com cinco diferentes concentrações dos compostos em estudo. Os parasitos foram incubados por 72 horas a 26°C. Em seguida, 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen) foi adicionado durante 6 horas. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA) nos comprimentos de onda de 540 e 600 nm. O percentual de inibição da cultura axênica foi determinado baseado no controle não tratado e na violeta de genciana (Synth, Brasil).

4.6. Teste de citotoxicidade sobre macrófagos *in vitro*

Para a avaliação da atividade dos compostos foram utilizados macrófagos de linhagem tumoral J774, incubados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies - GIBCO), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SIGMA) e 50 µg/mL de gentamicina (Life) e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os compostos foram testados em séries de cinco concentrações, em triplicatas, incubados por 72 horas. Posteriormente, foram adicionados 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 6 horas. A leitura no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA) foi realizada a 540 e 600 nm. Os resultados foram expressos através dos valores da concentração citotóxica de 50% para as células (CC₅₀). Como controle positivo foi utilizada a anfotericina B (Cristália) violeta de genciana (Synth).

4.7. Determinação do Índice de Seletividade

O índice de seletividade foi calculado pela razão entre valor de CC_{50} obtido em macrófagos e o valor de CI_{50} obtido em promastigotas tratados com as moléculas em estudo. O índice de seletividade é utilizado para determinar o quanto a molécula testada é mais ativa contra a leishmania do que tóxica para o macrófago, indicando maior seletividade para o parasito e, ao mesmo tempo, sem causar danos para a viabilidade das células de mamíferos. O índice de seletividade deve ser superior a um (>1).

4.8. Infecção com macrófagos J774 e *Leishmania braziliensis* in vitro

5×10^5 macrófagos J774 foram cultivados em placas de 24 poços, com lamínulas redondas adicionadas previamente aos poços, e infectados com *L. braziliensis* em fase estacionária, na razão de 10 parasitos por macrófago. Diferentes concentrações dos compostos em teste (50 μ M, 25 μ M, 12,25 μ M, 6,125 μ M), foram adicionadas aos poços após lavagem de cada poço com meio DMEM. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo na concentração de 5 μ M, previamente padronizada para infecção. Após 24 horas, as células foram fixadas em metanol e coradas por giemsa (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda, SP, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos foram determinados pela contagem de 100 células/poço e os resultados analisados estatisticamente.

4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura

Promastigotas de *L. braziliensis* (1×10^7) foram tratadas com duas concentrações a partir dos valores de IC_{50} (5 e 10 μ M) dos compostos por 48h a 26°C. Os parasitos foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e tampão cacodilato de sódio 0,1M por 2h em temperatura ambiente. Após fixação, as amostras foram marcadas com solução contendo tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1h em temperatura ambiente. Os parasitos foram colocados em suporte de lamínulas de vidro com poly-L-lysina 0,01%, desidratados com série de etanol (30 a 100%) e submetidos ao ponto crítico (substituição do etanol por CO_2) LEICA CPD 030. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e observado no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

4.10. Análise estatística

O teste one-way ANOVA e os testes de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e Bonferroni foram utilizados para determinar a significância estatística das comparações entre os grupos nos estudos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 9 (GraphPad Software).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade citotóxica do FERAI e sua forma nanoparticulada

Inicialmente, a citotoxicidade dos compostos foi avaliada. A anfotericina B demonstrou elevada citotoxicidade ($CC_{50} = 3,6 \pm 0,50 \mu\text{M}$), bem como a violeta de genciana, um controle já conhecido para toxicidade celular ($CC_{50} = 0,6 \pm 0,01 \mu\text{M}$). Em contrapartida, o FERAI e a NANO-FERAI apresentaram valores superiores a $50 \mu\text{M}$ ($CC_{50} = 66 \pm 0,12$, $CC_{50} = 70,99 \pm 4,48$, respectivamente) (Tabela 1). Estudos anteriores que mensuraram a citotoxicidade de derivados de chalconas também demonstraram que esses compostos apresentam baixa toxicidade, sugerindo que grupos funcionais como grupo hidroxila no anel A, contribuiu de maneira decisiva tanto para atividade antioxidante como para atividade anti-inflamatória (Leite *et al*, 2023; Silva, 2023; Prabhakar *et al*, 2016; Cheng, 2001)

Os resultados obtidos demonstram a relevância da pesquisa por novos fármacos com tecnologias inovadoras que consigam maior atividade que os fármacos convencionais. A anfotericina B, mesmo apresentando eficácia, é amplamente conhecido por ter elevada toxicidade e exigir regimes de internação hospitalar para monitoramento intensivo, elevando os custos e a debilitação dos pacientes (Brasil, 2017).

| COMPOSTO | $CC_{50} \pm D.P.$ | Promastigotas | IS | Amastigotas | IS |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|------|--------------------------------|-----|
| | M ϕ J774 / μM | $IC_{50} \pm DP (\mu\text{M})$ | | $IC_{50} \pm DP (\mu\text{M})$ | |
| FERAI | 66 \pm 012 | 14,08 \pm 0,5 | 4,68 | 9,75 \pm 1,7 | 6,8 |
| NANO-FERAI | 70,99 \pm 4,48 | 12,25 \pm 0,12 | 5,8 | ND | ND |
| ANFOTERICINA B | 3,6 \pm 0,50 | 0,32 \pm 0,004 | 11,2 | 0,7 \pm 0,01 | 5,1 |
| VG | 0,6 \pm 0,01 | 0,5 \pm 0,01 | ND | ND | ND |

Tabela 2: Tabela de CC_{50} , IC_{50} e IS dos testes realizados utilizando o FERAI e a NANO-FERAI frente a *L. braziliensis*. VG= Violeta de Genciana; CC_{50} = concentração citotóxica de 50%; IC_{50} = concentração inibitória de 50%; IS= índice de seletividade. Valores calculados a partir de dois experimentos independentes.

5.2. Atividade antiparasitária do FERAI e sua forma nanoparticulada

A NANO-FERAI apresentou um IC_{50} de 12,25 \pm 0,12 μM , o que representa um aumento na atividade contra formas promastigotas de 1,15 vezes maior que o FERAI (14,08 \pm 0,5 μM). Anfotericina B e a violeta de genciana, fármacos já conhecidos, exibiu um IC_{50} significativamente menor (IC_{50} de 0,32 μM e 0,5 μM ,

respectivamente). O IC_{50} para formas amastigotas do parasito, sua forma clinicamente relevante, também foi mensurado. O FERAI apresentou o IC_{50} de $9,75 \pm 1,7 \mu\text{M}$, e a anfotericina B um IC_{50} de $0,7 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Dessa forma, ambas as chalconas demonstraram atividade contra o parasito, inibindo a proliferação das formas promastigotas e intracelulares, mantendo a baixa citotoxicidade.

O índice de seletividade ($IS = CC_{50}/IC_{50}$) é um resultado crucial para compreender o potencial terapêutico, uma vez que esse é o parâmetro que avalia o quão seletivo o fármaco é para o parasito em comparação com a toxicidade com a célula hospedeira. Nesse estudo, o FERAI ($IS = 4,68$) e a NANO-FERAI ($IS = 5,8$) apresentaram seletividade considerável ao parasito, mesmo que a anfotericina B tenha apresentado um valor superior ($IS = 11,2$). Com base em outros estudos, a obtenção de um IS acima de 4 em ensaios *in vitro* já é considerado um critério de triagem válido para novos candidatos terapêuticos antileishmania (Azzuz *et al.*, 2023). Em adição, o FERAI demonstrou um IS de 6,8 para as formas amastigotas, sendo mais seletivo que a anfotericina B ($IS = 5,1$), indicando que o composto orgânico em teste possui uma margem de segurança 1,13 vezes maior para a célula do hospedeiro em comparação com o fármaco de referência.

Mesmo que o IS para a NANO-FERAI contra amastigotas não tenha sido determinada (ND), a partir do que foi observado contra as formas promastigotas sugere-se que a nanoformulação manterá ou até mesmo vai otimizar esse perfil, uma vez que pesquisas recentes em nanoengenharia tem demonstrado que a formulação em nanopartículas eleva o IS de novos compostos contra amastigotas intracelulares, sendo uma das principais vantagens para a utilização dessa tecnologia (Monteiro *et al.*, 2023; Ferreira, 2020). O aumento do potencial antileishmania pode ser atribuído à seletividade que a nanoengenharia proporciona, um mecanismo chamado *drug targeting*, permitindo a entrega concentrada do fármaco diretamente no sítio de infecção, o vacúolo parasitóforo, resultando na potencialização do efeito terapêutico com doses menores (Silva Júnior *et al.*, 2022; Ferreira, 2020).

5.3. A FERAI e sua forma nanoparticulada é eficaz contra a infecção da *Leishmania braziliensis*.

A atividade do FERAI e sua forma nanoparticulada contra as formas intracelulares do parasito foi investigada em macrófagos infectados. Ambos os compostos reduziram significativamente a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por 100 macrófagos apresentando efeitos similares à anfotericina B.

A NANO-FERAI apresentou resultados de forma concentração-dependente, em que na concentração mais elevada (25 μM) houve uma redução estatisticamente significativa do número de macrófagos infectados ($p < 0,001$), e manteve uma eficácia acentuada na sua concentração mais reduzida (6,25 μM). O FERAI também apresentou atividade, especialmente na concentração de 12,5 μM . Ambas as chalconas demonstraram resultados significantes em comparação com o fármaco de referência, a anfotericina B.

Estudos de relação entre estrutura e atividade sugerem que a posição e o número de grupos hidroxila na estrutura da chalcona são determinantes para sua interação molecular com alvos específicos, sendo fundamentais para a eficácia de certas atividades, como a atividade antileishmania ou a inibição da superprodução de óxido nítrico. O FERAI e sua forma nanoparticulada possui a adição do bromo, o que provavelmente otimizou seus efeitos antileishmania. A literatura já relaciona as substâncias sintéticas bromadas com potencial bioativo e aumento da potência de agentes terapêuticos, embora os mecanismos que expliquem esses resultados ainda não estejam totalmente elucidados. Diversas possibilidades são sugeridas como a elevação da lipofilicidade e permeabilidade através das membranas biológicas ou aumento da meia vida (Jitareanu *et al.*, 2018).

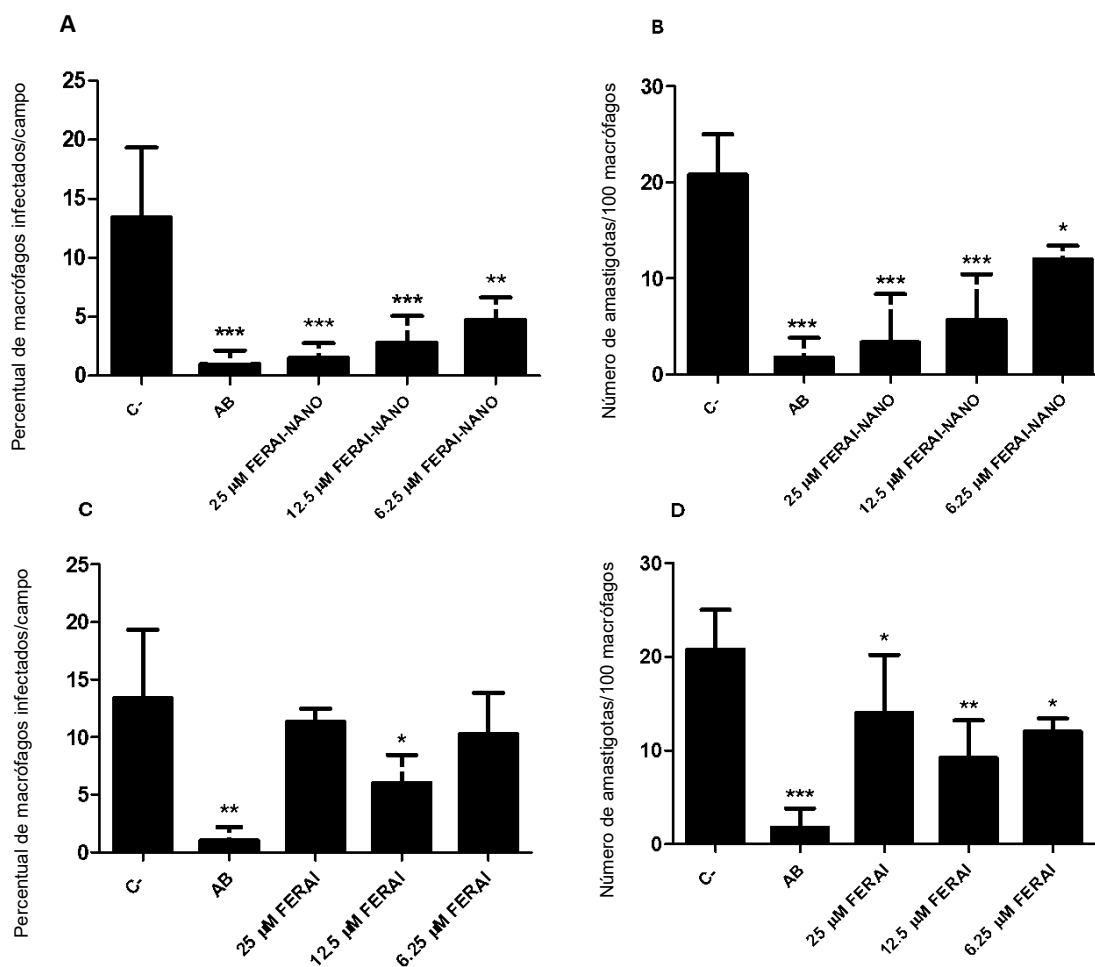


Figura 14: Efeito do FERAI e sua forma nanoparticulada na infecção de macrófagos por *L. braziliensis*. Avaliação do percentual de macrófagos infectados e do número de amastigotas por 100 macrófagos após tratamento com diferentes concentrações das chalconas NANO-FERAI (A e B) e FERAI (C e D) por 24 horas. A anfotericina B (AB - 3 μ M) foi utilizada como controle positivo e os macrófagos infectados e não tratados como controle negativo (C -). * $p < 0,05$ referente ao teste one-way ANOVA.

5.4. Alterações ultraestruturais no parasito após tratamento com FERAI e sua forma nanoparticulada

A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada para avaliar a morfologia de promastigotas *L. braziliensis* tratados ou não com FERAI e a sua forma nanoparticulada. Os promastigotas não tratados mantinham a morfologia típica da promastigota com corpo celular de forma alongada e fusiforme, contornos lisos e integridade estrutural, sugerindo sua motilidade normal (Figuras A e D). Parasitos tratados por 48 h com FERAI e NANO-FERAI a 5 μ M apresentaram alterações morfológicas, como perda da forma alongada, abaulamento e retração do corpo celular (Figuras B e E,

respectivamente). Promastigotas tratados com FERAI a 10 μM apresentam lise da membrana plasmática, extravasamento de conteúdo e surgimento de bolhas (Figuras C e F). O FERAI e a NANO-FERAI, portanto, induzem a severas alterações morfológicas que danificam a forma infectante do parasito, confirmando o resultado observado no IC_{50} apresentado neste trabalho.

Santos *et al* (2023) investigaram alterações ultraestruturais e morfológicas em promastigotas de *L. braziliensis* após tratamento chalconas sintéticas. Os autores observaram a perda da morfologia celular com encolhimento e deformação do corpo celular, bem como a desorganização completa do citoplasma, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

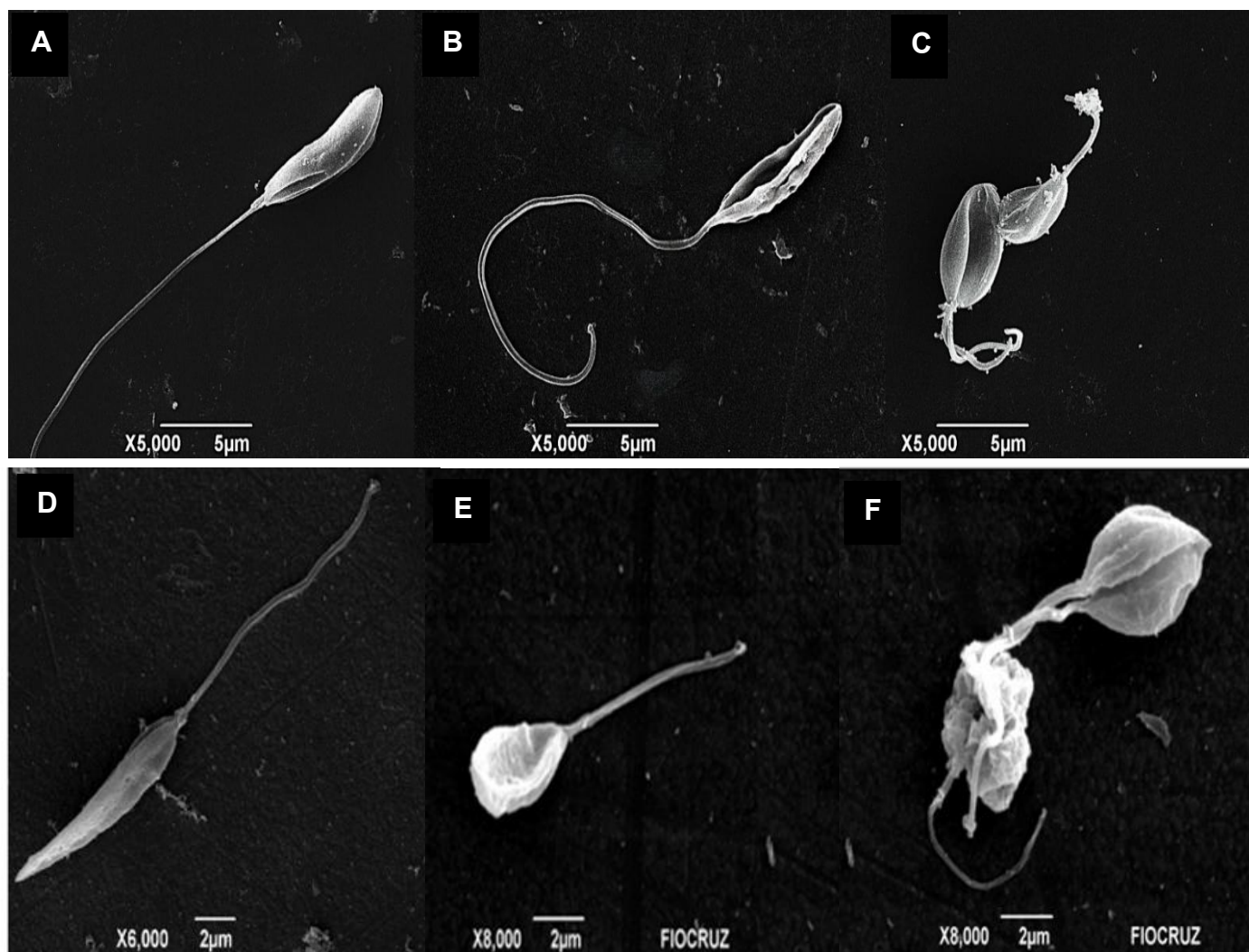


Figura 15: Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. braziliensis* após o tratamento com o FERAI e NANO-FERAI por microscopia eletrônica de varredura; Promastigotas de *L. braziliensis* não tratados (A e D), tratados com 5 μM e com 10 μM da NANO-FERAI (B e C, respectivamente) e do FERAI (E e F, respectivamente).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos sugerem que o FERAI e NANO-FERAI não são citotóxicos e possuem atividade antileishmania em promastigotas e em macrófagos infectados, sugerindo o seu potencial como candidatas a tratamentos mais seguros e eficazes contra a leishmaniose.

REFERÊNCIAS

AFONSO, M. M. S. “Estudos sobre *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis*: hábitos alimentares, infecção natural por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* e correlação com a expansão da leishmaniose visceral americana”. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública)-**Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2013.

ALATAŞ, Ö.; KAPLANCIKLİ, Z. A. Synthesis and Evaluation of New Indole- Based Chalcones as Potential Antiinflammatory Agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v.89, p.304,2015.

ALIANÇA, ASDS, OLIVEIRA, AR, FEITOSA, APS, RIBEIRO, KRC, DE CASTRO, M. CAB, LEITE, ACL, et al. (2017).Avaliação *in vitro* da Citotoxicidade e Atividade Leishmanicida de Derivados Ftalimido-Tiazólicos.EUR. **J. Pharm. Ciência**105,p.1–10. doi:10.1016/j.ejps.2017.05.005.

AL-MUTAIRI, N; ALSHILTAWY, M; EL KHALAWANY, M; JOSHI, A; EASSA, B. I; MANCHANDA, Y; GOMAA, S; DARWISH, I AND RIJHWANI, M. Treatment of old world cutaneous leishmaniasis with dapsons, itraconazole, cryotherapy, andimiquimod, alone and in combination. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 8,p. 862–869, 2009.

ANDERSON,C.F.; STUMHOFER, J.S.; HUNTER,C.A.; SACKS, D. IL-27 regula IL-10 e IL-17 de células CD4+ em não cicatrização *Leishmania major* J Immunol p.46 69–27,2009.

ANVERSA, L. S. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.

ANDRADE, B. B. et al. Métodos diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 75, n. 1, p. 75-82, 2005.

ARCE-FONSECA M, Rios-Castro M, CarrilloSánchez SC, Martinez-Cruz M, RodríguezMorales O. Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease. *Parasit Vec - tors* 2015; 8:121.

AHMAD, S.; Israf, D. A.; Lajis, N. H.; Shaari, K.; Mohamed, H.; Wahab, A. A.; Ariffin, K. T.; Hoo, W. Y.; Aziz, N. A.; Kadir, A. A.; Sulaiman, M. R.; Somchit, M. N. Cardamonin, inhibits proinflammatory mediators in activated RAW 264.7 cells and whole blood. **European Journal of Pharmacology** 2006, 538, 188. [CrossRef] [PubMed]

ASSOLINI, Joao Paulo et al. 4-nitrochalcone exerts leishmanicidal effect on *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes, and the 4-nitrochalcone encapsulation in beeswax copaiba oil nanoparticles reduces macrophages cytotoxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 884, p. 173392, 2020.

AZZUZ, T. et al. Leishmanicidal activity and selectivity of natural compounds. **Molecules**, v. 28, n. 4, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28041539>. Acesso em: 8 out. 2025.

BARÉA, P., BARBOSA, VA, BIDÓIA, DL, DE PAULA, JC, STEFANELLO, TF, DA COSTA, W. F., Estudos de Síntese, Atividade Antileishmania e Mecanismo de Ação de Novos Híbridos de β -carbolina-1,3,5-triazina. **J. Med. Chem.** p.579–590, 2018. Doi :10.1016/j.ejmech.2018.03.014.

BARROSO G.N. Efeito tripanocida *in silico* e *in vitro* de p-aminochalconas sintéticas. Universidade Federal do Ceará, 2003.

BASTOS M. M.; BÔAS L. V.; BOECHAT N.; OLIVEIRA A. P. Quimioterapia Antileishmanial: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, v.8, n. 6, p.2072-2104, 2016.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2017.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta médica da Bahia**, 78 (Suplemento 1), p. 98-106, 2008.

CHENG, Z.-J.; Lin, C.-N.; Hwang, T.-L.; Teng, C.-M. Brousochalcone A, a potent antioxidant and effective suppressor of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-activated macrophages. **Biochemical Pharmacology** 2001, 61, 939. [CrossRef] [PubMed]

Secretaria de Vigilância em Saúde Boletim Epidemiológico Ministério da Saúde Brasília 2021.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 2. 5ª Ed. Ministério da Saúde, Brasília, 2019.

Doenças Tropicais Negligenciadas. Boletim Epidemiológico Brasília, v. 19 especial. 2021. Disponível em: [boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf](#) (www.gov.br) Acesso em: 6 out. 2025.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 653–660, 2009.

DOMINGUEZ F. R.M. Ligantes multialvos-dirigidos como estratégia no combate à leishmaniose. síntese de derivados híbridos triazina-chalconas. **Tese de Mestrado**. Instituto de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2022.

DE MELLO, Marcos Vinícius Palmeira et al. **A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 150, p. 920-929, 2018.

ESTRATÉGIA MED. Resumo de Leishmaniose Cutânea: Manifestações Clínicas e Mais. [S. I.], 2024. Disponível em: <https://med.estrategia.com/portal/conteudos-gratis/doencas/resumo-de-leishmaniose-cutanea-manifestacoes-clinicas-e-mais/>. Acesso em: 10 out. 2025.

LIMA, E. B; MOTTA, J. O. C; POTO, C; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da

Leishmaniose Tegumentar Americana *. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111–124, 2007.

LIMA, D. A. et al. Aspectos epidemiológicos, sociais e ambientais relacionados a transmissão e ao controle da leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia, Mangaratiba–Rio de Janeiro. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 64–81, 2019.

LIMA E.B, PORTO C., MOTTA J.C.O, SAMPAIO R.N.R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *An. Bras. Dermatol.* v 82:p 11 2018.

COELHO A.C. Papel do transportador ABC PRP1 na resistência a pentamidina em *Leishmania ssp.* Tese de mestrado. Universidade de São Paulo.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 1 nov. 2012.

CHIARADIA D.L. Obtenção de chalconas sintéticas com potencial atividade biológica. Tese de mestrado. Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

SILVA JÚNIOR, F. C. et al. Nanotechnology applications against leishmaniasis. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 4, p. 450, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph15040450>. Acesso em: 8 out. 2025.

LUIS BELÉM DOS SANTOS, K. (UNIFAP/UFPA) ; Carvalho Lobato, C. (UNIFAP/UFPA) ; Marques de Oliveira, H. (ABQ-AP/SEED-AP) ; da Silva Freire, A.P. (SEED-AP) ; Eduarda da Silva, N. (UNIFAP) ; Vanessa Pena Pinto, A. (UNIFAP) ; Oliveira de Aguiar, C.P. (UFPA) ; Pinheiro da Silva Júnior, C. (UNIFAP) ; Rodrigues dos Santos, C.B. (UNIFAP/ABQ-AP) ; dos Santos Borges, R. (UFPA)

SANTOS, Franciscnaira da Silva; SILVA, Gleice Rayanne; UZÉDA, Laísia Alonso; CAMPOS, Catarina Araújo Menezes; FERREIRA, Fernando Leite; GUERRA, Felipe Sarmiento; RODRIGUES, Luís Cesar; MAGALHÃES, Hemerson Iury Ferreira; MENDONÇA JUNIOR, Francisco Jaime Bezerra; SOARES, Milena

Botelho Pereira; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira. FERAI, a novel brominated chalcone, induces ultrastructural alterations and apoptosis like-death in *Leishmania braziliensis*. **Acta Tropica**, v. 268, ID 107689, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2025.107689>. Acesso em: 21 nov. 2025.

Síntese de chalconas com potencial atividade antitumoral. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 59., 2019, [Cidade do Evento]. **Anais [...]**. [Local de Publicação]: Associação Brasileira de Química, 2019. Disponível em: (<https://www.abq.org.br/cbq/2019/trabalhos/3/1698-20396.html>). Acesso em: 21 nov. 2025.

SHENVI, S.; Kumar, K.; Hatti, K. S.; Rijesh, K.; Diwakar, L.; Reddy, G. C. Synthesis, anticancer and antioxidant activities of 2, 4, 5-trimethoxy chalcones and analogues from asaronaldehyde: Structure-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry** 2013, 62, 435. [CrossRef] [PubMed]

PRABHAKAR, V.; Iqbal, H.; Balasubramanian, R. Antioxidant studies on monosubstituted chalcone derivatives - understanding substituent effects. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences** 2016, 29, 165. [Link] [PubMed]

GONTIJO,B.; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(1):71-80, jan-fev, 2003.

GOTO H.,LINDOSO J.A.Current diagnosis and Treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmania.**Expert Ver Anti Infect Ther** p.419-433,2010.

JUNIOR G.S.O.Indicadores epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no estado do Tocantins no período de 2001 a 2018.**Revista de Patologia do Tocantins**,2012.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Review Microbiology**. Vol. 9, pag. 604-15, 2011

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2012 In: Contr ol of Leishmaniasis.

Geneva:World HealthOrganization.Disponível em https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949 > Acesso em: 16 de out 2025.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Diminuindo diferenças: a prática das políticas sobre determinantes sociais da saúde: documento de discussão. Rio de Janeiro:2021

Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the who expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva, 2010. Disponível em:<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf?sequence=1>. Acesso em 16 de out de 2025.

SILVA, S. C. “Estudo comparativo de cepas de Leishmania Infantum – Avaliação da susceptibilidade a antimoniais e da expressão de micrornas em macrófagos J774.A1 e camundongos Balb/c experimentalmente infectados”. 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Rio Preto, Minas Gerais, 2017.

SOTO J. et al. Miltefosine Combined with Intralesional Pentamidine for Leishmania braziliensis Cutaneous Leishmaniasis in Bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 99 p. 1153-1155,2018.

TIWARI, N.; GEDDA, M. R.; TIWARI, V. K. et al. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **MiniReviews in Medicinal Chemistry**, v.18, p.26-41, 2018.

TIWARI, N.; GEDDA, M. R.; TIWARI, V. K. et al. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.18, p.26-41, 2018.

