



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGFARMA)

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE DERIVADOS
DO ÁCIDO BETULÍNICO

TATIANA BARBOSA DOS SANTOS MAGALHÃES

Salvador

2021

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE DERIVADOS DO ÁCIDO BETULÍNICO

TATIANA BARBOSA DOS SANTOS MAGALHÃES

Dissertação apresentada ao de Programa
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências
Farmacêuticas (PPGFARMA), da
Universidade do Estado da Bahia (UNEB),
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elisalva Teixeira
Guimarães

Linha de Pesquisa: Prospecção de
Fármacos e Recursos Naturais.

Salvador

2021

Universidade do Estado da Bahia

Sistema de Biblioteca

Ficha Catalográfica - Produzida pela Biblioteca Edivaldo Machado Boaventura

Magalhães, Tatiana Barbosa dos Santos.

Avaliação da atividade antileishmania de derivados do ácido betulínico: /
Tatiana Barbosa dos Santos Magalhães.-- Salvador, 2021.
109 fls.

Orientador: Prof. (a) Dr. (a) Elisalva Teixeira Guimarães

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento
de Ciências da Vida. Campus I. Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas - PPGFARMA, 2021

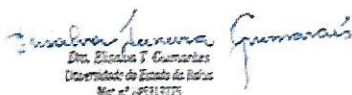
1. Leishmaniose. 2. Ácido betulínico. 3. Mecanismo de ação. 4. L.
amazonensis. I. Guimarães, Prof. (a) Dr. (a) Elisalva Teixeira II. Universidade
do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I.

CDD: 615

FOLHA DE APROVAÇÃO
"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE DERIVADOS DO ÁCIDO
BETULÍNICO"

TATIANA BARBOSA DOS SANTOS MAGALHÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 11 de março de 2021, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:


Dr. Elisalva T. Guimarães
Universidade do Estado da Bahia
Mat. nº 145313373

Professor(a) Dr.(a) ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES
Universidade do Estado da Bahia – UNEB
Doutorado em Patologia
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA
Orientador(a) Presidente UNEB/ PPGFARMA



Professor(a) Dr.(a) CÁSSIO SANTANA MEIRA
Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU
Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
Examinador(a) Interno UNEB/ PPGFARMA



Professor(a) Dr.(a) SIMONE GARCIA MACAMBIRA
Universidade Federal da Bahia - UFBA
Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador(a) Externo UFBA/ PMBqBM

**Ao meu esposo e minha filha que me
motivam e me dão forças para trilhar
este árduo e belo caminho.**

Agradecimentos

À minha família por acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos. Ao meu esposo, Marcus Levi, por ser o melhor parceiro, pelo melhor abraço e por tornar possível esse grande desafio. À minha filha, Maria Valentina, por me ensinar a resiliência e por deixar a vida mais feliz. À minha mãe Mércia e minha sogra Maria José por serem exemplo de força, pelas orações diárias, pelo colo afável, pelo café pronto e por segurarem as pontas nos momentos mais difíceis com a pequena Valentina. Ao meu sogro Gilvan por estar sempre disponível para sanar dúvidas e solucionar problemas.

À minha irmã, Milena, que sempre me apoiou e comemorou a cada pequena vitória. Aos meus pilares Nikita, Patrícia e Thais que sempre estiveram comigo em todos os momentos e me ajudaram a construir essa trajetória. Vocês não só acreditaram em mim, como também correram ao meu lado atrás de todos os objetivos. À Nicolle e Rayssa pela escuta, pelo carinho e por aparecerem no momento mais necessário e me ajudarem a chegar até o final.

À Liu, minha orientadora e mãe acadêmica, por nunca duvidar de que eu conseguiria alcançar qualquer coisa que a mim desafiasse. Por exigir de mim sempre o melhor e me mostrar os possíveis caminhos para chegar lá. Por todas as oportunidades a mim oferecidas, pelos conselhos e tantas risadas. Pelos abraços e confiança compartilhada. Serei eternamente grata.

À Dahara Keyse, Jéssica Teixeira e Juliana Dizaira pela amizade e companheirismo no dia-a-dia. Sou extremamente grata por todo apoio em qualquer horário, pelo incentivo quando tudo parecia desandar, pelas risadas no cansaço, pelo aprendizado compartilhado de todas as formas. Tenho orgulho das cientistas que são e meus dias são mais alegres com vocês.

A todos pertencentes ao PPGFARMA, representado pelo prof. Aníbal Freitas e Leia. Ambos sempre parceiros e dispostos a dissolver as dificuldades que apareceram nesse percurso. Aos meus queridos colegas da primeira turma do programa. Vocês são incríveis e tornaram esse desafio mais leve e divertido. À Rose e sua equipe, sempre solícitas e prestativas, possibilitaram o desenvolvimento dos nossos trabalhos no laboratório. À equipe NUHISPAT, representados pelos professores Djalma, Manoela e Silvana por disponibilizarem o espaço e nos fornecer materiais e reagentes quando necessário.

À equipe LETI sempre disposta e companheira. À Dra Milena Botelho pela oportunidade de desenvolver os experimentos no LETI. Em especial à Cassio Meira, por ter me ensinado a mergulhar no mundo da pesquisa, por acreditar no meu potencial e abraçar comigo todas as oportunidades que surgiram. À Valdenizia Rodrigues, Renan Fernandes, Luciano Souza, Breno Cardim, Carolzinha, Jadson Borges, Paula Ladeia, Rafaela Alves, Sheila Suarez pela amizade, companheirismo e sempre terem me socorrido quando correndo lhes solicitei. À Arlene Lessa, Cláudio Perreira e Marcio dos Santos que foram tão cuidados, solícitos e fundamentais para a etapa da microscopia eletrônica. À Liliane e Alan que estiveram sempre dispostos e auxiliaram na etapa da citometria de fluxo. A todos que de alguma forma contribuíram com meu crescimento e me ajudaram em muitos momentos: Rute, Ivan, Larissa, Rosane, Patrícia, Gabriela, Vinícius, Edileuza.

Lista de Abreviaturas

BA	Ácido betulínico (do inglês: <i>betulinic acid</i>)
CC ₅₀	Concentração citotóxica de 50% (do inglês: <i>50% cytotoxicity concentration</i>)
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbeco (do inglês: <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDI	Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (do inglês: <i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>)
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% (do inglês: <i>50% inhibitory concentration</i>)
IFN	Interferon
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL	Interleucina
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCM	Leishmaniose cutânea mucosa
LIT	Triptose infusão de fígado (do inglês: <i>liver infusion tryptose</i>)
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS	Ministério da Saúde
NFκB	Fator nuclear de transcrição kappa B (do inglês: <i>Nuclear factor kappa B</i>)
NO	Óxido nítrico (do inglês: <i>nitric oxide</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPS	Organização Panamericana de Saúde (do espanhol: <i>Organización panamericana de la salud</i>)

PBS	Tampão fosfato-salina (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
PI	Iodeto de propídeo (do inglês: <i>propidium iodide</i>)
SBF	Soro bovino fetal
SEM	Erro padrão da média (do inglês: <i>standard error of the mean</i>)
TH	Linfócito T auxiliar (do inglês: <i>T helper</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral (do inglês: <i>tumor necrosis factor</i>)
Treg	Linfócitos T reguladores

Lista de Figuras

Figura 1	Incidência mundial da leishmaniose	18
Figura 2	Ciclo de vida de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	19
Figura 3	Estruturas químicas do BA, BA5 e BA8	27
Figura 4	Efeito do BA, BA5 e BA8 contra parasitos intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	37
Figura 5	Macrófagos peritoneais infectados por <i>L. amazonensis</i> e tratados com BA, BA5 e BA8 após 24h de infecção	38
Figura 6	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> incubadas com BA5	40
Figura 7	Padrão de morte celular por citometria de fluxo	42
Figura 8	Potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> incubadas com BA5	44
Figura 9	Análise da progressão do ciclo celular após tratamento com BA5 e marcação com PI por citometria de fluxo	46
Figura 10	Isoblograma descrevendo os efeitos de sinergismo entre BA5 e anfotericina B sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	48

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1	Avaliação da citotoxicidade, atividade antileishmania e índice de seletividade do BA, BA5 e BA8 frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> .	33
Tabela 2	Avaliação da citotoxicidade, atividade antileishmania e índice de seletividade do BA, BA5 e BA8 frente às formas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> .	36
Tabela 3	Reduções de concentração e índices de combinação do BA5 e anfotericina B frente a <i>L. amazonensis</i>	48

Resumo

MAGALHÃES, T. B. S. **Avaliação da atividade antileishmania de derivados do ácido betulínico** (dissertação). Salvador: Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado da Bahia, 2021; 109p.

Introdução: As leishmanioses são doenças endêmicas causadas por diferentes espécies de parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*. O tratamento utilizado para estas doenças é o mesmo há décadas e está associado a efeitos adversos graves, baixa eficácia, elevada toxicidade, dificuldade de administração, alto custo e crescente resistência. Diante disto, torna-se necessária a identificação de novos fármacos com ação leishmanicida mais efetivos do que as substâncias atualmente disponíveis. O ácido betulínico é um composto de origem natural presente em regiões de mata atlântica do nordeste brasileiro, com atividade anti-inflamatória e antiparasitária já relatadas na literatura. **Objetivos:** Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial leishmanicida de derivados do ácido betulínico em ensaios *in vitro* frente a diferentes espécies de leishmania, bem como os seus possíveis mecanismos de ação. **Materiais e métodos:** Inicialmente, ensaios de citotoxicidade frente a células de mamíferos e a avaliação da viabilidade de formas promastigotas de diferentes espécies de leishmania foram realizados *in vitro*. A partir destes dados, foram determinados a CC₅₀ e a CI₅₀ dos compostos. Ensaios de apoptose e necrose, ciclo celular, potencial de membrana mitocondrial foram realizados por citometria de fluxo, além da microscopia eletrônica de varredura a fim de elucidar os possíveis mecanismos de ação. Por fim, foi realizado ensaio de terapia combinada a fim de avaliar sinergismo entre BA5 e anfotericina B. **Resultados e discussão:** Os derivados do BA foram mais potentes que o protótipo (BA: CC₅₀=18,8 ± 0,1 µM; CI₅₀>100 µM para as espécies de leishmania em estudo). O BA5 e BA8 apresentaram baixa citotoxicidade (CC₅₀=31,1±1,2 µM ;53,5 ± 0,4 µM) e inibiram a proliferação de formas promastigotas de *L. amazonensis* (CI₅₀=4,5±1,1 µM; 8,1± 0,8 µM), *L. major* (CI₅₀= 3,0± 0,8 µM ;12,89 ± 0,5 µM), *L. braziliensis* (CI₅₀= 0,9 ± 1,1 µM;1,3 ± 0,09 µM) e *L. infantum* (CI₅₀ = 0,15 ± 0,05µM). Os compostos também reduziram a porcentagem de macrófagos infectados por *L. amazonensis* e o número de parasitos intracelulares/macrófago. O BA5 apresentou CI₅₀= 4,1 ± 0,7µM e o BA8 exibiu CI₅₀= 5,9 ± 0,4 µM. Formação de blebs na membrana, alterações no tamanho e danos flagelares foram observadas após análise ultraestrutural por MEV de promastigotas incubadas com BA5. Análises de citometria de fluxo demonstraram que o BA5 induz apoptose e parada no ciclo celular na fase G0/G1. Não houve alteração de potencial da membrana mitocondrial de *L. amazonensis* após o tratamento com o BA5. Surpreendentemente, a combinação de BA5 e anfotericina B revelou efeito sinérgico contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Em conclusão, o composto BA5 é um agente antileishmania eficaz, seletivo e uma alternativa terapêutica promissora no tratamento das leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmaniose; Ácido betulínico; Mecanismo de ação; *L. amazonensis*.

Abstract

MAGALHÃES, T. B. S. **Evaluation of antileishmania activity of betulinic acid derivatives** (dissertation). Salvador: Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Bahia State University, 2021; 109p.

Introduction: Leishmaniasis are endemic group of diseases caused by species of intracellular parasites of the *Leishmania* genus. The treatment used for these conditions has been the same for decades and is associated with serious adverse effects, such as low efficacy, high toxicity, difficulty in administration, high cost and increased resistance. Thereby, it becomes necessary to identify new drugs with a more effective leishmanicidal action than the currently available substances. Betulinic acid is a naturally occurring compound present in Atlantic forest regions of northeastern Brazil, with anti-inflammatory and anti-parasitic activity already reported in the literature. **Objectives:** This study aimed to investigate the leishmanicidal potential of betulinic acid derivatives *in vitro* assays against different species of *Leishmania*, as well as its possible mechanisms of action. **Materials and methods:** Initially, cytotoxicity assay against mammalian cells and an evaluation of the viability of promastigote forms of different species of *Leishmania* were performed *in vitro*. From these data, compounds CC₅₀ and CI₅₀ were determined. Apoptosis and necrosis assays, cell cycle, mitochondrial membrane potential and scanning electron microscopy were conducted by flow cytometry aiming to elucidate the possible mechanisms of action. **Results and discussion:** BA derivatives were more potent than the prototype. BA5 and BA8 showed low cytotoxicity (CC₅₀ = 31.1 ± 1.2 µM; 53.5 ± 0.4 µM) and inhibited the proliferation of promastigote forms of *L. amazonensis* (IC₅₀ = 4.5 ± 1.1 µM; 8.1 ± 0.8 µM), *L. major* (CI₅₀ = 3.0 ± 0.8 µM; 12.89 ± 0.5 µM), *L. braziliensis* (CI₅₀ = 0.9 ± 1.1 µM ; 1.3 ± 0.09 µM) and *L. infantum* (IC₅₀ = 0.15 ± 0.05µM). The compound also reduced the percentage of macrophages infected by *L. amazonensis* and the number of intracellular / macrophage parasites. BA5 showed IC₅₀ = 4.1 ± 0.7 µM and BA8 showed IC₅₀ = 5.9 ± 0.4 µM. In the ultrastructural analysis, it was observed that the promastigotes incubated with BA5 showed morphological changes, such as membrane blebbing, flagella damage, increased size, and body deformation. Flow cytometry analysis indicated that the death of the parasite is possibly induced by apoptosis, the cell cycle arrest in the G0 / G1 phase and did not induce alterations in membrane potential in *L. amazonensis* promastigotes. Surprisingly, the combination of BA5 and amphotericin B revealed synergistic effects in the promastigote forms of *L. amazonensis*. In conclusion, the compound BA5 is an effective, selective antileishmania agent and a promising therapeutic alternative in the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; Betulinic acid; Mechanisms of action; *L. amazonensis*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 Aspectos epidemiológicos	17
3.2 A infecção por <i>Leishmania</i>	18
3.3 Formas clínicas	21
3.4 Tratamentos disponíveis	22
3.5 O ácido betulínico e seus derivados	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Cultivo de Parasitos.....	28
4.2 Teste de citotoxicidade sobre macrófagos <i>in vitro</i>	28
4.3 Ensaio de viabilidade celular	28
4.4 Obtenção de macrófagos peritoneais	29
4.5 Infecção de macrófagos <i>in vitro</i> e tratamento	29
4.6 Avaliação do Índice de seletividade	29
4.7 Avaliação do padrão de morte celular.....	30
4.8 Ensaio de ciclo celular.....	30
4.9 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	31
4.10 Microscopia eletrônica de varredura.....	31
4.11 Terapia combinada.....	31
4.12 Análise estatística.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Citotoxicidade dos BA, BA5 e BA8 frente a macrófagos murinos	32
5.2 Efeito dos compostos sobre formas promastigotas de diferentes espécies de leishmania	34
5.3 BA5 e BA8 reduzem infecção de macrófagos por <i>L. amazonensis</i>	35
5.4 Mecanismos de ação	39
5.4.1 Alterações ultraestruturais no parasito	39
5.4.2 BA5 induz morte celular por apoptose	41
5.4.3 O BA5 atua por uma via independente de despolarização de membrana mitocondrial	43
5.5 BA5 interfere na progressão do ciclo celular	45

5.6	Efeito sinérgico do BA5 e anfotericina B.....	47
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças endêmicas, negligenciadas e com prevalência mundial, causadas por mais de 20 espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania* (ALVAR, 2012). Estima-se que cerca de 12 milhões indivíduos estão infectados pelas leishmanioses e em torno de 1,3 milhões de novos casos são reportados por ano à OMS. Em 2021, relatou-se que 54 países são endêmicos de leishmaniose visceral (LV) e 53 países endêmicos de leishmaniose tegumentar (LT) (WHO, 2021).

Diferentes manifestações clínicas podem se estabelecer após a picada de flebotomíneos contaminados, a depender da espécie envolvida na infecção e da resposta imunogenética do hospedeiro. As leishmanioses podem ser classificadas de acordo com os tecidos de tropismo do parasito em duas formas distintas: a LV, provocada por *L. infantum/chagasi* e *L. donovani* e a LT, cujas principais espécies causadoras são *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*. Estas apresentações clínicas diferem na imunopatologia e no grau de morbimortalidade (SCHREIFER *et al.*, 2005).

A LV é a forma caracterizada como sistêmica devido à disseminação dos parasitos em determinados órgãos do hospedeiro como baço, fígado, medula óssea e linfonodos. É uma doença crônica, caracterizada por febres de longa duração, perda de peso, astenia, anemia, dentre outros sintomas. Apresenta evolução rápida, caso não seja diagnosticada e tratada adequadamente, levando ao óbito. A LT consiste na forma mais comum da doença na população e é caracterizada pela presença de lesões na pele e em regiões de mucosa, como boca e nariz (DESJEUX, 2004; KAYE & SCOTT, 2011). Representa um relevante problema de saúde pública, com reflexos no campo social e econômico. As formas mucocutâneas, por exemplo, possuem uma evolução crônica podendo causar deformidades e sequelas no convívio em comunidade (TEMPONI *et al.*, 2018). No Brasil, foram registrados cerca de 12.690 novos casos de LT no ano de 2016, sendo o norte e o nordeste as regiões mais afetadas (OPS, 2017).

Embora nas últimas três décadas os conhecimentos da biologia celular e imunologia das leishmanioses tenham avançado, a quimioterapia não foi aprimorada em igual amplitude. Os antimoniais pentavalentes, utilizados há décadas, são os fármacos de primeira escolha. Nos casos de contraindicação ou resistência a esses

medicamentos, a anfotericina B pode ser utilizada. Apesar do uso destes fármacos, a elevada toxicidade e efeitos adversos, além da aplicação dolorosa, exigência de administração prolongada, necessidade de hospitalização e uma possível resistência clínica, limitam a continuidade do tratamento (ROMERO & LOPEZ, 2017; TIWARI, 2018). Em alguns casos, os pacientes só evoluem para cura após a tentativa de vários esquemas terapêuticos (BRYCESON *et al.*, 2001; RATH *et al.*, 2003). Neste contexto, torna-se necessária a identificação de novos fármacos de maior efetividade e que possuam menos efeitos adversos do que as substâncias atualmente disponíveis no mercado.

O ácido betulínico é uma molécula da classe dos triterpenos pentacíclicos de ampla distribuição no reino vegetal. Este composto tem despertado interesse na comunidade científica devido ao vasto número de atividades descobertas, como a antitumoral, a anti-inflamatória, a imunomoduladora, a antimicrobiana e a antiparasitária (CHEN *et al.*, 2008; INNOCENTE *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2014). Modificações estruturais estratégicas nos grupos carboxila do ácido betulínico podem gerar moléculas mais ativas do que o seu protótipo (YOGEE SWARI & SRIRAM, 2005). Diante disto, uma série de moléculas semissintéticas derivadas do ácido betulínico foi testada por nosso grupo de pesquisa. Atividades anti-*T. cruzi* (MEIRA *et al.*, 2016) e imunomoduladora (MEIRA *et al.*, 2017) foram descritas.

Ainda há poucos estudos na literatura relatando a atividade do ácido betulínico e seus derivados em modelos experimentais de leishmaniose. No geral, esses estudos enfatizam apenas os tratamentos *in vitro* e não aprofundam em mecanismo de ação (ALAKURTTI *et al.*, 2010; DOMINGUEZ-CARMONA *et al.*, 2010). Neste trabalho, investigamos se derivados do ácido betulínico com modificações estruturais no C-28 possuem atividade leishmanicida contra diferentes espécies de leishmania, responsáveis pelas manifestações tegumentares no Brasil (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*), no Velho Mundo (*L. major*) e pela forma visceral no Brasil (*L. infantum chagasi*). Além disto, avaliamos possíveis mecanismos de ação da molécula mais promissora e comparamos o efeito desta com o seu protótipo, visando a prospecção de tratamentos alternativos para as leishmanioses.

2. OBJETIVOS

I. Objetivo geral

Investigar o potencial leishmanicida de derivados do ácido betulínico frente a diferentes espécies de leishmania em ensaios *in vitro*, bem como os seus possíveis mecanismos de ação.

II. Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade dos compostos em estudo frente a macrófagos murinos;
- Avaliar a atividade antileishmania do ácido betulínico e seus derivados em ensaios contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Avaliar o efeito das moléculas sobre formas intracelulares na infecção por *L. amazonensis*;
- Estudar, ultraestruturalmente, os efeitos das moléculas frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Elucidar o padrão de morte celular de *L. amazonensis* após tratamento com o BA5;
- Investigar a influência da molécula mais ativa em alterar o potencial de membrana mitocondrial de *L. amazonensis*;
- Avaliar efeito do BA5 no ciclo celular de *L. amazonensis*;
- Avaliar o efeito da combinação do BA5 com a anfotericina B contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Aspectos epidemiológicos

As leishmanioses são um complexo de doenças com prevalência mundial causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Em 2020, a OMS publicou que 56 países são endêmicos de LV e 59 países endêmicos de LT. As leishmanioses estão presentes em cinco dos seis continentes e casos desta doença já foram citados por 98 países (**Figura 1**). Estima-se que cerca de 12 milhões indivíduos estão infectados pelas leishmanioses e em torno de 1,3 milhões de novos casos são reportados por ano à OMS. Nos países menos desenvolvidos, as leishmanioses crescem exponencialmente e constituem um problema de saúde pública (COSTA *et al.*, 2009; BURZA *et al.*, 2018; WHO, 2020).

A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) relatou que 17 países endêmicos reportaram 989.096 casos de leishmaniose cutânea e mucosa no período de 2001 a 2018. A média anual foi de 54.950 casos da doença para este mesmo período. O Brasil registrou os números elevados de novos casos (16432) em 2018. Diversos fatores podem estar envolvidos com esses dados, como as profundas e rápidas mudanças nos aspectos demográficos, socioeconômicos e ambientais, além das complexidades clínica, biológica e epidemiológica das leishmanioses (TEDESQUI *et al.*, 2012; BRITO *et al.*, 2019).

Em 2020, a OPAS publicou que mais de 90% dos casos globais de LV foram relatados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Atualmente, a LV é endêmica em 13 países das Américas. Cerca de 65.934 novos casos foram registrados entre os anos de 2001 e 2019, apresentando uma média de 3.470 casos por ano. Em 2019, 97% do total de casos foram notificados apenas no Brasil (OPAS, 2020).

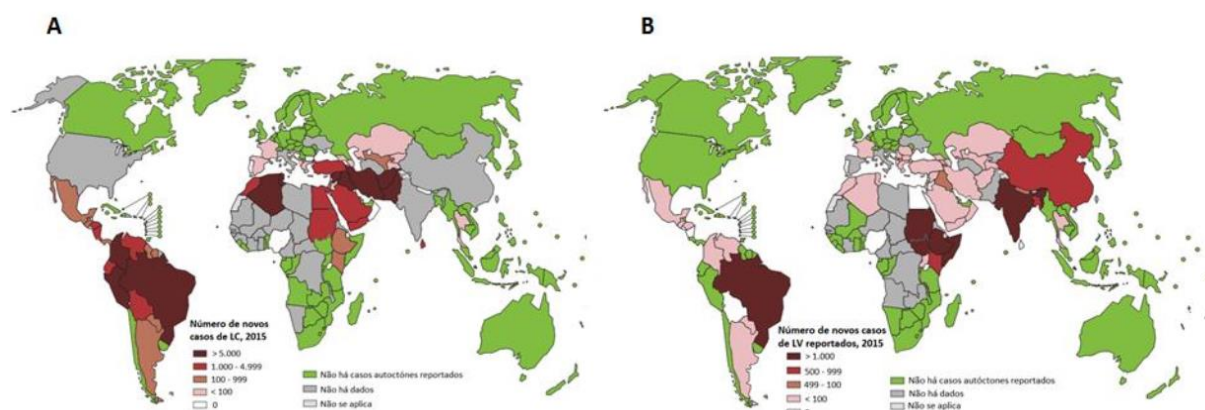


Figura 1. Incidência mundial das leishmanioses. (A) Leishmaniose cutânea e (B) leishmaniose visceral (Adaptado de OMS, 2015).

3.2 A infecção por *Leishmania*

As leishmanioses são causadas por diferentes espécies de protozoários da família Trypanosomatidae. Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético ou heteroxênico, isto é, para sobreviver, necessitam parasitar hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Estes últimos são responsáveis pela transmissão das leishmanias de um mamífero a outro. A transmissão ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Dípteros da sub-família Phlebotominae, de espécies pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, são os principais vetores e popularmente conhecidos como mosquito palha ou birigui (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

O ciclo de vida inicia no momento do repasto sanguíneo do inseto vetor infectado. Formas promastigotas metacíclicas de leishmania são inoculadas no animal vertebrado, penetram nos macrófagos e em outras células do sistema retículo endotelial. Nestas, os parasitos adquirem a forma amastigota, com formato arredondado e aflagelado. A replicação ocorre obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário, estabelecendo a infecção. À medida que as formas amastigotas se multiplicam, os macrófagos são lisados liberando parasitos na corrente sanguínea, onde podem ser fagocitados por novos macrófagos ou ingeridos durante o repasto sanguíneo pelo inseto vetor. Na luz do trato digestivo do flebotomíneo, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas, as quais são formas alongadas, flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas. Após sofrer um processo de metaciclogênese, as promastigotas se tornam

infectantes, sendo novamente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada do mosquito (BRASIL, 2017) (**Figura 2**).

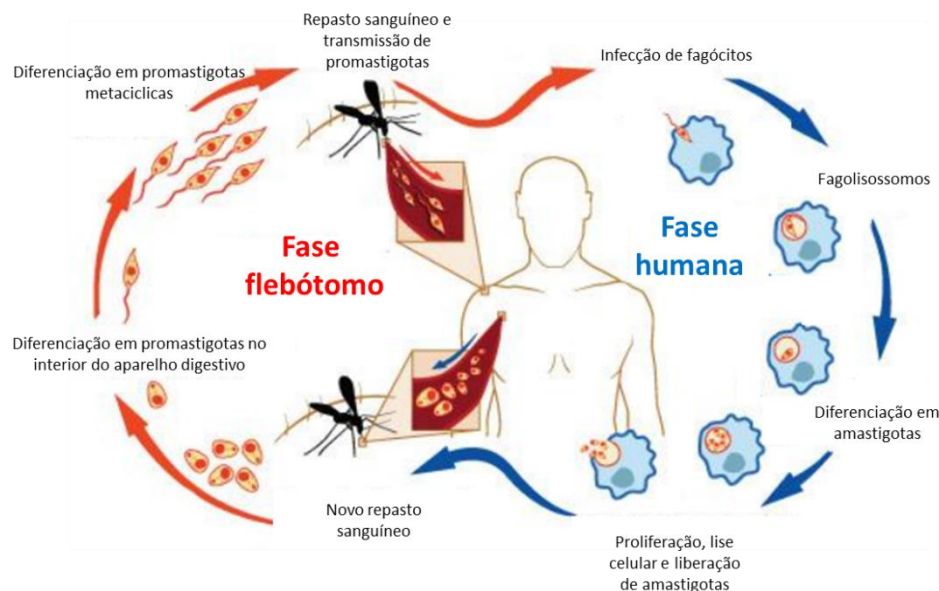


Figura 2. O ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania* (Adaptado de RUBIO, 2010).

Durante a inoculação da forma promastigota metacíclica, moléculas presentes na saliva do vetor conferem ao parasito uma resistência aumentada a resposta imune local, aumentando sua sobrevivência aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro e favorecendo a infecção (TEIXEIRA *et al.*, 2005; HOLZMULLER, 2006).

Nos macrófagos, os parasitos internalizados ficam dentro de vacúolos parasitóforos. As leishmanias são bem adaptadas à entrada na célula hospedeira através da fagocitose por macrófagos, alcançando estabilidade no meio intracelular, protegendo-se dos mecanismos de destruição e, assim, proliferando no interior do fagossomo. Apesar do mecanismo ainda não estar totalmente esclarecido, sabe-se que o parasito se adere à superfície dos macrófagos e células de Langerhans, passando para o meio intracelular por meio de um processo de fagocitose mediada por receptores. Uma vez que tenham alcançado linfonodos, as partículas antigênicas do parasito são apresentadas às células do sistema imune, as quais estimuladas auxiliam na formação do processo inflamatório (VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002).

Quando estimuladas com antígeno solúvel de leishmania, as células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados secretam níveis elevados de interferon- γ (IFN- γ) e do fator de necrose tumoral (TNF) (OLIVEIRA,

2014). A partir deste estímulo, as possibilidades de sucessões de eventos diferentes influenciam na evolução da doença, variando em intensidade e perfil de resposta imune, direcionando para a cura espontânea, formas autolimitadas ou mesmo as manifestações mais agressivas (GUPTA *et al.*, 2013).

Desta forma, uma vez que ocorra a apresentação antigênica pelos macrófagos e células dendríticas aos linfócitos *naive*, ocorre a diferenciação em vários tipos celulares. O aumento de células T CD4+, promove a produção de diferentes perfis de citocinas, resultando na expansão de subgrupos como Th1, Th2, Th17 ou Tregs. A rede biológica que atua para o equilíbrio entre a eliminação do parasito e a preservação do tecido em humanos envolve a participação de cada uma destas populações (BACELLAR *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2013; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

Quando a resposta ativada é do tipo Th1, são sintetizadas citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12. A liberação destas citocinas ativa os macrófagos e, conseqüentemente, leva a destruição dos parasitos com produção de espécies de oxigênio reativo, óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Entretanto, apesar dos esforços do sistema imunológico para a eliminação do protozoário, a leishmania é capaz de modular a diferenciação de células T para linfócitos do tipo Th2, levando a manutenção da infecção. Se isto ocorrer, a resposta direcionada é do tipo Th2 e serão produzidas citocinas como IL-4 e IL-10, que inibem a ativação macrófágica e, conseqüentemente, as formas clínicas aparecerão (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998; HOLZMULLER *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006). A dificuldade para ativação de macrófagos e conseqüente destruição do parasito sem provocar danos aos tecidos indica ser o mais importante desafio associado ao desenvolvimento da doença (YURDAKUL, 2005).

As células Tregs são umas das principais secretoras de IL-10 e TGF- β . Estas células podem estar intrinsecamente relacionadas a algumas manifestações clínicas, atuando como fonte de citocinas supressoras do sistema imune inato, favorecendo a sobrevivência do parasito (SAKAGUCHI *et al.*, 2008; EHRLICH *et al.*, 2014). Os linfócitos Th17 desempenham papel crucial na regulação do sistema imune, prevenindo o desenvolvimento de muitos transtornos inflamatórios e autoimunes. Nas leishmanioses, apesar de sua atuação ainda não estar inteiramente elucidada, sabe-se que os linfócitos Th17 atuam também no recrutamento de neutrófilos e modulam

duplamente a síntese de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias no local da lesão. A principal citocina sintetizada por estas células é a IL-17 que está associada à proteção do indivíduo infectado. Estudos apontam para ação de IL-17 estimuladora modulando a síntese de IL-23 ou regulatória, associada as citocinas IL-27, IL-10 e IL-13, as quais são importantes na determinação de quanto tempo IL-17 permanece presente. Outros trabalhos apontam o papel complementar e independente da IL-22, secretada pelas Th17, além da IL-17 e Th1 na proteção contra a forma visceral da doença (PITTA *et al.*, 2009; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

3.3 Formas clínicas

As leishmanioses podem ser agrupadas em duas formas distintas de manifestações clínicas, de acordo com a migração do parasito para tecidos específicos. Na LT, a doença é desencadeada a partir de parasitos localizados em lesões cutâneas e mucosas. A LV se desenvolve através da migração dos parasitos para determinados órgãos internos do hospedeiro (GOTO *et al.*, 2010; HARHAY *et al.*, 2011).

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; LOEUILLET *et al.*, 2016). 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

envolvidas em manifestações de lesões graves e de longa duração. A *L. major*, mais comum fora das Américas, induz manifestações menos graves e autolimitadas quando comparada com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, principais espécies encontradas nas Américas, incluindo o Brasil (SOUZA *et al.*, 2000; BRASIL, 2017).

A leishmaniose disseminada é caracterizada pela presença de numerosas lesões acneiformes, papulosas e ulceradas, espalhadas pelo corpo. Esta disseminação provavelmente se relaciona com a migração do parasito pelo sangue ou linfa, gerando lesões distantes do sítio de inoculação. Alguns casos de leishmaniose cutânea causados por *L. amazonensis* podem disseminar apresentando múltiplas lesões (VASCONCELOS *et al.*, 2018).

A leishmaniose cutânea difusa é uma das formas mais graves, caracterizada por múltiplas lesões nodulares infiltradas e não ulceradas, não havendo envolvimento das mucosas. Os achados histológicos para esta forma da leishmaniose indicam elevada quantidade de parasitos presentes nos tecidos e a resposta à terapêutica se torna ineficaz. Nestes casos, a *L. amazonensis* causa lesão única ou de número limitado (SILVEIRA, 2019).

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. As manifestações típicas incluem febre crônica, perda de peso e hepatoesplenomegalia com pancitopenia ao exame de sangue, linfadenopatias e anemia. Após o tratamento aparentemente eficaz de VL causado por *L. infantum chagasi*, pode-se desenvolver a leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), uma erupção cutânea crônica de difícil tratamento (DESJEUX, 2004; KAYE & SCOTT, 2011; MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; VAN GRIENSVEN & DIRO, 2019).

3.4 Tratamentos disponíveis

Atualmente, os tratamentos disponíveis no mercado mundial para as leishmanioses compreendem poucos medicamentos: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e sua formulação lipossômica, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina (OMS, 2010). No Brasil são apenas disponibilizados pelo Ministério da Saúde para o tratamento da LT o antimoniato de meglumina (Glucantime), o

desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal (AmBisome). Exceto os compostos antimoniais, os demais compostos não foram desenvolvidos com efeito leishmanicida, mas se tornaram alternativas terapêuticas para as limitações dos antimoniais e individualidades de cada paciente. Estas substâncias estão associadas a graves efeitos como elevada toxicidade, exigência de administração prolongada e possível resistência clínica (ROMERO & LOPEZ, 2017; TIWARI, 2018).

Apesar dos antimoniais pentavalentes serem utilizados desde 1945, seu mecanismo de ação ainda não foi bem elucidado. O antimoniato de meglumina apresenta eficácia no tratamento das duas apresentações das leishmanioses (visceral e tegumentar), provavelmente por inibição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise em formas amastigotas, sugerindo que este fármaco possa atuar através da estimulação imunológica do indivíduo parasitado (LIMA, 2007; TEIXEIRA, 2010; ALMEIDA & SANTOS, 2011).

Os antimoniais promovem rápida melhora das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como reduz consideravelmente o número de parasitos. Entretanto, devido às doses serem baixas, bem como os tratamentos descontínuos, a terapia se torna ineficiente, e conseqüentemente, ocorre um aumento das formas resistentes de parasitos. Segundo a OMS, as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/ dia (limite de 850 mg), devido à sua elevada toxicidade. Alguns efeitos associados a utilização de antimoniais são mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas, insuficiência renal aguda, pancreatite e distúrbios cardiológicos. Pacientes com distúrbios renais, hepatopatas e cardiopatas são contraindicados para utilização dos antimoniais (RATH *et al.*, 2003).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico que apresenta elevada atividade contra promastigotas em experimentos *in vitro*, bem como contra amastigotas. Este fármaco é comercializado na forma de desoxicolato (suspensão coloidal) e a lipossomal. O protocolo utilizado pelo Ministério da Saúde é de administração pela via endovenosa em doses de 0,7 a 1,0 mg/kg/dia, respeitando a dose total de 25 a 40 mg/kg (desoxicolato) ou 2 a 5 mg/kg/dia (sem limite de dose máxima diária) até atingir a dose total de 25 a 40 mg/kg, no caso, lipossomal (SOARES-BEZERRA, 2004).

O mecanismo de ação da anfotericina B está relacionado com o estabelecimento de interação com um esteróide constituinte exclusivo da parede celular do protozoário, o ergosterol, promovendo a formação de poros através da

bicamada lipídica. Desta maneira, o aumento da permeabilidade celular a pequenos íons e metabólitos, direciona à morte celular (BOLARD *et al.*, 1993). Além de apresentar um alto custo, possui graves efeitos adversos e a via de administração invasiva (SALAH *et al.*, 2009; ASSILIAN *et al.*, 2003).

As pentamidinas (isotionato e mesilato) são derivados sintéticos das amidinas e utilizados como segunda escolha no tratamento das leishmanioses desde 1941. O seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas uma das hipóteses é de que as diaminas atuem por inibição de diferentes processos celulares. Sabe-se que estas moléculas se ligam ao DNA do cinetoplasto, interferem na replicação e também provoca alterações estruturais na mitocôndria das leishmanias (YANG *et al.*, 2016). As principais reações adversas incluem dor no local da injeção, gosto metálico, dores de cabeça, hipotensão, síncope e hipoglicemia. Há um aumento de casos de resistência da droga pelos parasitos (RATH *et al.*, 2003; ROATT *et al.*, 2020).

Paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que atua inibindo a atividade mitocondrial. O medicamento é utilizado para o tratamento tópico da doença, mostrando-se ativo contra espécies nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os efeitos colaterais mais relatados são a nefrotoxicidade, ototoxicidade e disfunção hepática. Em 2007, o uso da paromomicina injetável foi liberado na Índia, uma vez que o tratamento se apresentou eficaz e bem tolerado para LV, fazendo com que este fármaco fosse incluído na lista de medicamentos da OMS para o tratamento das leishmanioses. Diferentes terapias combinadas foram testadas com a paromomicina. Atualmente, um ensaio clínico em fase III está sendo desenvolvido, na África e Américas, associando a miltefosina e a paromomicina em pacientes com LV (RATH *et al.*, 2003; ALMEIDA & SANTOS, 2010).

Um dos principais avanços no arsenal terapêutico das leishmanioses surgiu com a descoberta da ação antileishmania da miltefosina em 1980. Inicialmente, a miltefosina era utilizada como fármaco antineoplásico e se tornou o primeiro tratamento por via oral para as duas formas principais de leishmanioses. O mecanismo de ação da miltefosina ainda não está completamente elucidado. Sugere-se que composto se liga à membrana plasmática do parasito e induz alterações significativas em seu metabolismo, induz a morte celular por apoptose e atua modulando a resposta imunológica e inflamatória de macrófagos. Os efeitos colaterais mais comuns incluem distúrbios gastrointestinais, toxicidade renal levando à interrupção antecipada do

tratamento e teratogenicidade, limitando o seu uso por mulher em idade fértil (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004; ROATT *et al.*, 2020).

Há mais de 100 anos busca-se o desenvolvimento de tecnologias para o controle das leishmanioses por imunoprofilaxia. Entretanto, apesar das vacinas para cães (Leishmune, Leishtech e CaniLeish) oferecerem proteção parcial, nenhuma vacina humana está atualmente licenciada contra a LV ou LC. Apenas duas vacinas humanas chegaram em fase de teste. Uma vacina de lisado de leishmania (autoclavada de *L. major*), precipitada com alumínio de primeira geração, testada com BCG em uma fase II de estudo com crianças no Sudão, mostrou ser imunogênica e segura. E a segunda vacina, a LeishF3, utiliza o nucleosídeo hidrolase NH36 de *L. donovani*, o mesmo antígeno da Leishmune para cães (BASTOS *et al.*, 2016; PALATNIK-DE-SOUSA e NICO, 2020).

As terapias combinadas e reposicionamento de fármacos são estratégias que apresentam múltiplas vantagens em relação à farmacoterapia atual. Os objetivos principais são a redução do tempo de tratamento e dos efeitos tóxicos, aumento da adesão do paciente ao tratamento, a diminuição dos gastos públicos para o sistema de saúde e a atenuação do desenvolvimento de resistência do parasito (BASTOS *et al.*, 2016). Além disto, estudos clínicos em fases I, II e III estão sendo desenvolvidos por diferentes países. Um ensaio de fase II está avaliando a anfotericina B lipossomal em combinação com a miltefosina e a combinação entre a paromomicina e a miltefosina no Sudão. Em fase III, há um estudo na Índia para avaliar a terapia atualmente recomendada de anfotericina B lipossomal e uma combinação deste com a miltefosina para o tratamento de VL em pacientes co-infectados com HIV (DNDI, 2020; ROATT *et al.*, 2020).

Estudos recentes identificaram novas formas farmacêuticas sítio-específicas como potenciais alvos de drogas antileishmania através de ensaios moleculares e bioquímicos (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014). Apesar de algumas moléculas apresentarem potencial antiparasitário, a maioria dessas pesquisas está limitada à avaliação primária e não evoluem (TIWARI, 2018). As limitações da atual terapêutica farmacológica disponível contra as diferentes apresentações clínicas das leishmanioses, associadas ao aumento de resistência e baixo investimento para o desenvolvimento de novos medicamentos impulsionam a busca de novas estratégias de combate e controle das doenças negligenciadas. Alternativas de baixo custo como

a termoterapia e a crioterapia associados ao tratamento medicamentoso já são utilizados e demonstram bons resultados (DNDI, 2020; ROATT *et al.*, 2020).

3.5 O ácido betulínico e seus derivados

A busca por moléculas de origem natural tem se intensificado e desempenhado um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN & CRAGG, 2016). Os terpenos são metabólitos secundários alvos de investigação farmacológica, cuja estrutura é derivada de uma associação de duas ou mais subunidades isoprênicas, compostas por cinco carbonos. O ácido betulínico é uma molécula da classe dos triterpenos pentacíclicos do tipo lupano encontrado em todas as partes dos vegetais superiores. Esta molécula apresenta um vasto número de atividades descritas na literatura, como antitumoral, antimalárica, anti-HIV, analgésica, anti-inflamatória e bactericida (TAKADA *et al.*, 2003; DEHELEAN *et al.*, 2011; ALI-SEYED *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017) (**Figura 3A**).

Diferentes espécies de plantas são ricas em ácido betulínico, como o *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), árvore típica da vegetação dos sertões nordestinos. Em suas cascas também é encontrada a betulina, uma molécula precursora da síntese do ácido betulínico, via oxidação química ou enzimática (CICHEWICZ *et al.*, 2004; CSUK *et al.*, 2014). Após extração e isolamento destas moléculas, alguns métodos já estão bem descritos para a síntese de derivados, a partir da inserção de aminas secundárias (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1985).

Alguns trabalhos demonstram que modificações estruturais de substituição no grupo carboxila (C-3, C-20 e C-28) geram moléculas mais potentes do que o protótipo, visando diferentes alvos farmacológicos (KIM *et al.*, 2001; YOGESHWARI & SRIRAM, 2005; FUJIOKA *et al.*, 1994; CHANDRAMU, 2003; KROGH, 1999). As modificações mais promissoras relatadas foram no C-3 e C-28 (MULLAUER, 2010). Um trabalho recente relatou que a inserção de aminas no C-28 aumentou a atividade anti-*T. cruzi*, ao induzir alterações ultraestruturais no parasito, como perda da integridade da membrana plasmática, retração flagelar, aparecimento de vacúolos atípicos e a formação de autofagossomos, gerando morte do parasito por necrose (MEIRA *et al.*, 2016). Adicionalmente, a atividade imunomoduladora de um derivado do ácido betulínico foi avaliada sobre macrófagos e linfócitos com inibição dupla das vias de NF- κ B/calcineurina (MEIRA *et al.*, 2017). Apesar da resposta imune na leishmaniose ainda não estar totalmente caracterizada, sabe-se que consiste em um mecanismo

envolvendo síntese de citocinas, moléculas co-estimulatórias e ativação de linfócitos T auxiliares (PIRES *et al.*, 2012).

Diante disto, investigamos de forma inédita o efeito de dois derivados do BA, codificados como BA5 e BA8 (**Figura 3B e C**), sobre as formas promastigotas de diferentes espécies de leishmania (*L. amazonensis*, *L. major*, *L. infantum chagasi* e *L. braziliensis*) e amastigotas de *L. amazonensis*, bem como os prováveis mecanismos de ação contra esta espécie de parasito. O BA foi convertido inicialmente em anidrido misto usando cloroformato de isobutil, seguido pela adição das respectivas aminas secundárias. O BA5 sofreu a inserção do tetrahydro-1,4-oxazina, estrutura conhecida como morfolina, inibidora da via de síntese do ergosterol em fungos (ROCHA, 2019). Em seguida, o BA8 foi sintetizado a partir da adição do radical de fenilpiperidina, com atividade reconhecidamente anestésica e analgésica (ELBARIDI, 2017). Ainda não há informações sobre o efeito destes derivados sobre estas espécies de leishmania, constituindo a proposta do presente trabalho.

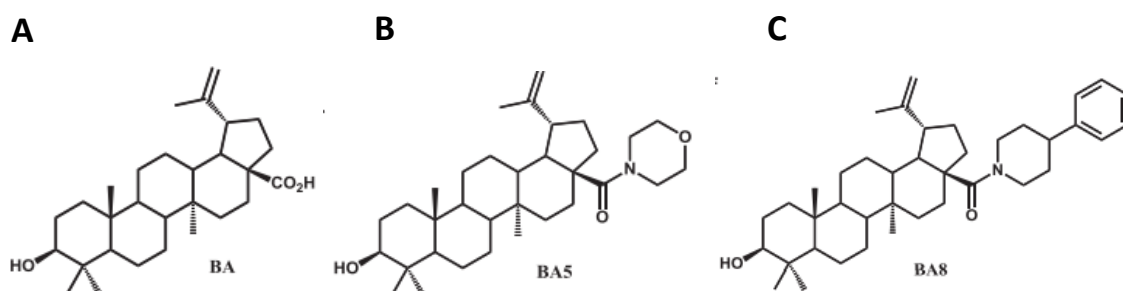


Figura 3. Estruturas químicas do BA, do BA5 e do BA8 (MEIRA, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo de Parasitos

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125 Leila strain), *L. major* (MHOM/RI/WR173), *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) e *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262) foram cultivadas em meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) ou Schneider (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) contendo 10% de soro bovino fetal (FBS, GIBCO, ThermoFisher científico, Waltham, MA EUA), 50 µg/mL de gentamicina (Life, Carlsbad, CA), pH 7,2 e incubados a 26°C. Os parasitos foram contados diariamente em câmara de Neubauer, durante cinco dias. Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, novas passagens *in vitro* dos parasitos foram realizadas. A infectividade dos parasitos foi mantida através de passagens em camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c.

4.2 Teste de citotoxicidade sobre macrófagos *in vitro*

Para a avaliação da atividade dos compostos foram utilizados macrófagos peritoneais murinos, incubados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), 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 seis concentrações, em triplicatas, incubados por 72 horas. Posteriormente, foram adicionados 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 6 h. A leitura no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA) foi realizada a 570 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 violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil) (MEIRA *et al.*, 2017).

4.3 Ensaio de viabilidade celular

Promastigotas de *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (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) e 50 µg/mL de gentamicina (Life) e submetidas ao tratamento com diferentes concentrações (50µM-3,125 µM; diluições 1:2) do ácido betulínico e seus derivados. Os parasitos foram

incubados por 72h a 26°C. Em seguida, 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen) foi adicionado durante 2 horas para *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* ou 24 horas para *L. Infantum* devido a metabolização mais lenta. A leitura foi realizada no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O percentual de inibição da cultura axênica foi determinado baseado no controle não tratado (GUEDES *et al.*, 2018).

4.4 Obtenção de macrófagos peritoneais

Camundongos da linhagem BALB/c foram estimulados com 2 mL de tioglicolato 3% (Sigma), por via intraperitoneal. Após 5 dias de estímulo, os animais foram eutanasiados e cerca de 10 mL de salina estéril gelada foi injetado no abdome dos animais para a obtenção de macrófagos por lavagem peritoneal. Após coleta do lavado peritoneal, as células foram adicionadas aos tubos e, em seguida, centrifugadas a 1500 RPM, por 10 minutos e a 4°C. Os macrófagos foram contados em câmaras de Neubauer.

4.5 Infecção de macrófagos *in vitro* e tratamento

5×10^5 macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram cultivados em placas de 24 poços, com lamínulas redondas adicionadas previamente aos poços, e infectados com *L. amazonensis* em fase estacionária, na razão de 10 parasitos por macrófago. Diferentes concentrações do BA (9,4 µM, 4,7 µM e 2,35 µM), BA5 (15,5 µM, 7,75 µM e 3,87 µM) e BA8 (26,7 µM, 13,35 µM e 6,67 µM) foram adicionadas aos poços após lavagem de cada poço com meio DMEM. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo nas concentrações de 3 µM e 1,5 µM, previamente padronizadas 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. As micrografias foram capturadas em câmera acoplada ao microscópio óptico (Leica, ICC50W, Wetzlar, Alemanha) e as imagens analisadas através do aplicativo Leica Microsystems AirLab.

4.6 Avaliação do Índice de seletividade

O índice de seletividade foi calculado pela razão entre valor de CC₅₀ obtido em macrófagos e o valor de CI₅₀ 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 (>3) (PASSOS *et al.*, 2015; PRAYONG *et al.*, 2018).

4.7 Avaliação do padrão de morte celular

Para correlacionar a atividade antiparasitária com um possível mecanismo de ação, avaliou-se o potencial das moléculas em induzir apoptose ou necrose pela técnica de citometria de fluxo. Promastigotas de *L. amazonensis* (1x10⁶) foram adicionadas a placas de 24 poços contendo meio Schneider (Sigma), na presença ou não do BA5, e incubadas por 48 horas a 26°C. Após esse período, os parasitos foram transferidos para tubos de citometria, lavados duas vezes com 1mL de PBS a 3000 RPM por 5 minutos, ressuspensos em 100 µL do tampão de ligação da anexina-V (HEPES/NaOH a 10 mM, pH 7,4; NaCl a 140 mM; e CaCl₂ a 2,5 mM) e marcadas com 5 µL de anexina-V (BioSource, Camarillo, CA, EUA) por 15 minutos, na ausência de luz. Em seguida, 400 µL do tampão de ligação da anexina-V e 10 µL de iodeto de propídio (BioSource) foram adicionados. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e analisados no programa FlowJo_v10.6.1 (Becton, Dickinson and Company, Ashland, OR, EUA).

4.8 Ensaio de ciclo celular

Promastigotas de *L. amazonensis* (1 × 10⁷ / poço) foram incubados com BA5 (9,0 e 4,5 µM) por 48 h. Os parasitos foram lavados com solução salina, centrifugados por 10 min a 1.500 rpm e diluídos na solução de lise contendo PI (0,1% Triton X-100 e 2 µg ml⁻¹ iodeto de propídio em PBS 1x) a 37 ° C na ausência de luz. Após 30 min, as amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo LSRFortessa (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) e analisadas pelo software FlowJo v.10 (Tree Star, Ashland, OR).

4.9 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para determinar o efeito do composto no potencial de membrana mitocondrial, promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 /poço) foram tratadas com 9,0 e 4,5 μ M de BA5 por 72h. Após o tratamento, os parasitos tratados e o controle foram incubados com 10 μ g/mL de rodamina 123 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) por 15 minutos. As células na presença de metanol por 30 minutos foram utilizadas como controle negativo. A aquisição de dados foi realizada por meio de citômetro de fluxo LSRFortessa e a análise pelo software FlowJo v.10.

4.10 Microscopia eletrônica de varredura

Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^7) foram tratadas com três concentrações a partir dos valores de CI_{50} (2,25 ;4,5 e 9,0 μ M) de BA5 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 CO₂) LEICA CPD 030. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e observado no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

4.11 Terapia combinada

Isobologramas foram construídos utilizando o método de razão fixa (FIVELMAN *et al.*, 2004). Diluições seriadas duplas foram realizadas em quadruplicatas nas razões de 1:1 e de 10:1 de BA5 e anfotericina B. Para cada razão um valor de CI_{50} foi calculado para cada uma das drogas e para a combinação entre elas. As concentrações inibitórias fracionárias (CIF) foram calculadas pela $[CI_{50}$ quando em combinação/ CI_{50} da droga isolada]. Os valores de CIF de diferentes razões foram utilizados para a construção do isoblograma no programa Graph Pad Prism versão 5.01.

4.12 Análise estatística

Os valores numéricos apresentados nos gráficos e tabelas correspondem as médias $\pm$ S.E.M a partir das triplicatas de cada experimento. A significância das diferenças entre os grupos foi avaliada utilizando o teste one way ANOVA e o pós-teste de comparação múltipla Newman Keuls para o grupo de amostras ou análise de variância. O limite crítico de significância foi estabelecido para $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Citotoxicidade dos BA, BA5 e BA8 frente a macrófagos murinos

A determinação da CC_{50} foi realizada em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e os valores das moléculas em estudo foram comparados com a violeta de genciana ($CC_{50} = 0,8 \pm 0,1$), a droga citotóxica de referência. O BA apresentou valor de CC_{50} igual a $18,8 \mu M$. Os seus derivados BA5 e BA8 foram menos citotóxicos do que o protótipo com valores de CC_{50} iguais a $31,1 \mu M$ e $53,5 \mu M$, respectivamente. Modificações estruturais na molécula do ácido betulínico estão associadas à redução da citotoxicidade dos novos compostos (SOUSA *et al.*, 2014; MEIRA *et al.*, 2016). A anfotericina B, medicamento utilizado na clínica para tratamento das leishmanioses, apresentou valor de CC_{50} igual a $3,3 \mu M$. Estes dados indicam que o ácido betulínico e os seus derivados são menos citotóxicos que a anfotericina B. A partir destes resultados, concentrações inferiores ao CC_{50} foram utilizadas nos experimentos *in vitro* subsequentes (**Tabela 1**).

Tabela 1. Citotoxicidade, atividade antileishmania e índice de seletividade do BA, BA5 e BA8 frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Compostos	Células de mamífero			Promastigotas de Leishmania					
	***CC ₅₀ ± DP (µM)	***CI ₅₀ ± DP (µM)	IS	***CI ₅₀ ± DP (µM)	IS	**CI ₅₀ ± DP (µM)	IS	**CI ₅₀ ± DP (µM)	IS
	µØ peritoneal	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. major</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. infantum</i>	
BA	18,8 ± 0,1	29,2 ± 0,9	<1	>100	<1	16,3 ± 1,3	1,1	>100	<1
BA5	31,1 ± 1,2	4,5 ± 1,1	6,9	3,0 ± 0,8	10,4	0,9 ± 1,1	34,5	0,15 ± 0,05	207
BA8	53,5 ± 0,4	8,1 ± 0,8	6,6	12,9 ± 0,5	4,1	3,4 ± 0,2	15,7	7,02 ± 0,1	7,6
Anfo	3,3 ± 0,50	0,09 ± 0,02	36,6	0,2 ± 0,005	16,5	1,3 ± 0,09	2,5	0,0002 ± 0,0001	>1000
VG	0,3 ± 0,01	ND		ND		ND		ND	

CC₅₀= concentração citotóxica de 50%; CI₅₀= concentração inibitória de 50%; Anfo= anfotericina B; VG = violeta de genciana; DP= desvio padrão; IS= índice de seletividade; ND= não determinado. Valores calculados a partir de dois (**) ou três (***) experimentos independentes

5.2 Efeito dos compostos sobre formas promastigotas de diferentes espécies de leishmania

Para avaliar a atividade dos compostos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis*, e *L. infantum*, o valor da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) foi calculado a partir do ensaio de viabilidade celular em cultura axênica. Os derivados foram mais potentes na inibição do crescimento de todas as espécies testadas de leishmania quando comparados com o protótipo. O BA apresentou valores de CI₅₀ superiores a concentração citotóxica para macrófagos. Os BA5 e BA8 exibiram valores de CI₅₀ inferiores a 12, 89 ± 0,5 para as quatro espécies avaliadas. A anfotericina B apresentou, como esperado, reduzidos valores de CI₅₀ para *L. amazonensis* (0,09 ± 0,02), *L. braziliensis* (1,3 ± 0,09), *L. major* (0,2 ± 0,005) e *L. infantum* (0,0002 ± 0,0001). O índice de seletividade foi calculado a partir da razão entre os valores de CC₅₀ e CI₅₀ e indica o quanto a molécula é mais seletiva para o parasito do que para célula de mamífero. O BA5 foi 6,9 vezes mais seletivo para as formas promastigotas de *L. amazonensis*, 10,4 vezes para as promastigotas de *L. major*, 34,5 vezes mais seletivo para *L. braziliensis* e, destacando-se, 207 vezes mais seletivo para *L. infantum* quando comparados aos seus efeitos citotóxicos contra macrófagos. O BA8 foi 6,6 vezes mais seletivo para *L. amazonensis*, 4,1 vezes mais seletivo para *L. major*, 15,7 vezes mais seletivo para *L. braziliensis* e 7,6 vezes mais seletivo para a *L. infantum* quando comparados com seus efeitos citotóxicos frente a macrófagos. O BA5 foi tão seletivo às promastigotas de *L. amazonensis* quanto a droga de referência (IS= 34,5) e foi mais seletivo para promastigotas de *L. infantum* do que a anfotericina B (**Tabela 1**). O BA não apresentou seletividade para estes parasitos (IS<1). Há poucos relatos sobre os efeitos de derivados do ácido betulínico frente às diferentes espécies de leishmania. Derivados heterocíclicos do ácido betulínico apresentaram atividade frente *L. donovani* com CI₅₀ iguais a 8,9 a 30 µM e derivados carbamatos frente a *L. infantum* com CI₅₀ iguais a 25,8 µM (ALAKURTTI *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2014). Dominguez-Carmona relatou atividades de um derivado acetato frente a *L. amazonensis* (CI₅₀ = 44,9 µM) (DOMINGUEZ-CARMONA *et al.*, 2010). A adição de aminas no C-28 do BA5 e BA8 otimizaram os efeitos das moléculas em

relação ao protótipo e apresentaram atividade antileishmania superior aos demais triterpenos. A maior seletividade do BA5 e BA8 ao parasito justifica a continuidade dos ensaios seguintes. A forma clínica cutânea da LT é a mais prevalente no Brasil. A *L. amazonensis* é a principal espécie associada a forma cutânea da doença, enquanto a *L. braziliensis* está envolvida com uma possível metástase e forma mucosa das Leishmanioses (BRASIL, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020). Diante da importância epidemiológica no Brasil e dos resultados obtidos nestes primeiros ensaios demonstrando baixa citotoxicidade e CI_{50} , prosseguimos os ensaios apenas com a *L. amazonensis*.

5.3 BA5 e BA8 reduzem infecção de macrófagos por *L. amazonensis*

As células do sistema fagocitário mononuclear, como os macrófagos, são primariamente recrutadas nos hospedeiros vertebrados durante a infecção por leishmania (VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002). O modelo experimental de infecção em cultura de macrófagos peritoneais foi realizado para avaliar o potencial dos derivados do BA em inibir a infecção destas células. Como observado nas figuras 4 e 5, houve uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,001$) e concentração dependente tanto no percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, como também no número de parasitos intracelulares por macrófagos infectados quando tratados com o BA5 e o BA8 nas três concentrações testadas. O BA5 na concentração de 15,5 μM reduziu em 99,2% o percentual de células infectadas e em 99,87% o número de parasitos intracelulares por 100 macrófagos quando comparados ao controle não tratado. De maneira semelhante, o BA8 reduziu em mais de 90% os percentuais de macrófagos infectados e de parasitos intracelulares por célula infectada em todas as concentrações. O BA reduziu apenas o número de amastigotas por macrófago (32,5%), na maior concentração utilizada. A anfotericina B a 1,5 μM , como já esperado, foi capaz de reduzir em mais de 98% tanto o percentual de células infectadas e o número de amastigotas intracelulares (**Figuras 4 e 5**). O CI_{50} calculado para os parasitos intracelulares demonstrou uma maior atividade do BA5 frente a estas formas ($CI_{50} = 4,1 \mu M$) do que as promastigotas ($CI_{50} = 4,5 \mu M$). O BA apresentou CI_{50} superior a 200 μM . Estudos testando derivados alcalóides têm demonstrado resultados semelhantes com redução da infecção em torno de 83%. Entretanto, as concentrações utilizadas são elevadas com CC_{50} iguais a 210 μM (MORAES, 2015). Em 2018, foi relatada a redução da infecção de macrófagos por *L. major* (81%) quando

tratados com ácido betulínico carregado por nanopartículas, melhorando sua atividade e reduzindo os efeitos tóxicos (MEHRIZI *et al.*, 2018). Resultados preliminares do nosso grupo demonstram que BA5 reduz a infecção de macrófagos de linhagem J774 infectados por *L. infantum chagasi* após 24h de tratamento. A molécula reduziu significativamente o percentual de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos de maneira concentração-dependente ($CI_{50} = 2,6 \pm 4,4 \mu M$). De maneira semelhante, Mello *et al.*, em 2018, apresentaram o efeito de derivados de chalconas sobre formas amastigotas de diferentes espécies de leishmania demonstrando variações de CI_{50} (1,3- 30 μM).

Tabela 2. Citotoxicidade, concentração inibitória de 50% e índice de seletividade do BA, BA5 e BA8 para as formas intracelulares de *L. amazonensis*

COMPOSTOS	***CC ₅₀ (μM)	**CI ₅₀ Amast. (μM)	IS
<i>L. amazonensis</i>			
BA	18,8 $\pm$ 0,1	> 200	<1
BA5	31,1 $\pm$ 1,2	4,1 $\pm$ 0,7	7,5
BA8	53,5 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,4	9,0
Anfo	3,3 $\pm$ 0,50	0,05 $\pm$ 0,02	66,0
VG	0,3 $\pm$ 0,01	ND	ND

CC₅₀= concentração citotóxica de 50%; CI₅₀= concentração inibitória de 50%; Anfo= anfotericina B; VG = violeta de genciana; DP= desvio padrão; IS= índice de seletividade; ND= não determinado. Valores calculados a partir de dois (**) ou três (***) experimentos independentes.

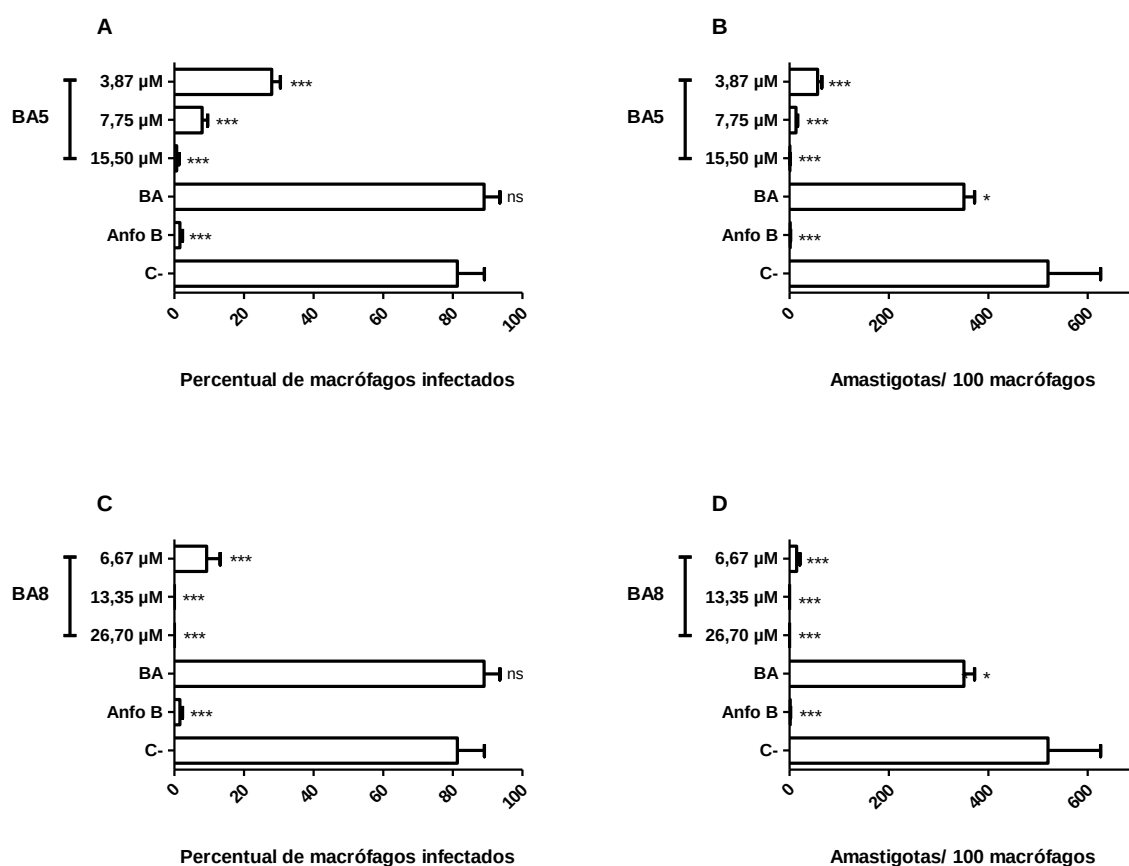


Figura 4. Efeito do BA, BA5 e BA8 contra parasitos intracelulares de *L. amazonensis*. Os macrófagos foram infectados com *L. amazonensis* (10:1) e tratados com BA, BA5, BA8 e anfotericina B (1,5 μ M) por 24h. O percentual de macrófagos infectados (A, C) e número de parasitos intracelulares por 100 macrófagos (B, D) foram determinados após 24h de tratamento. A anfotericina B foi utilizada como fármaco de referência. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

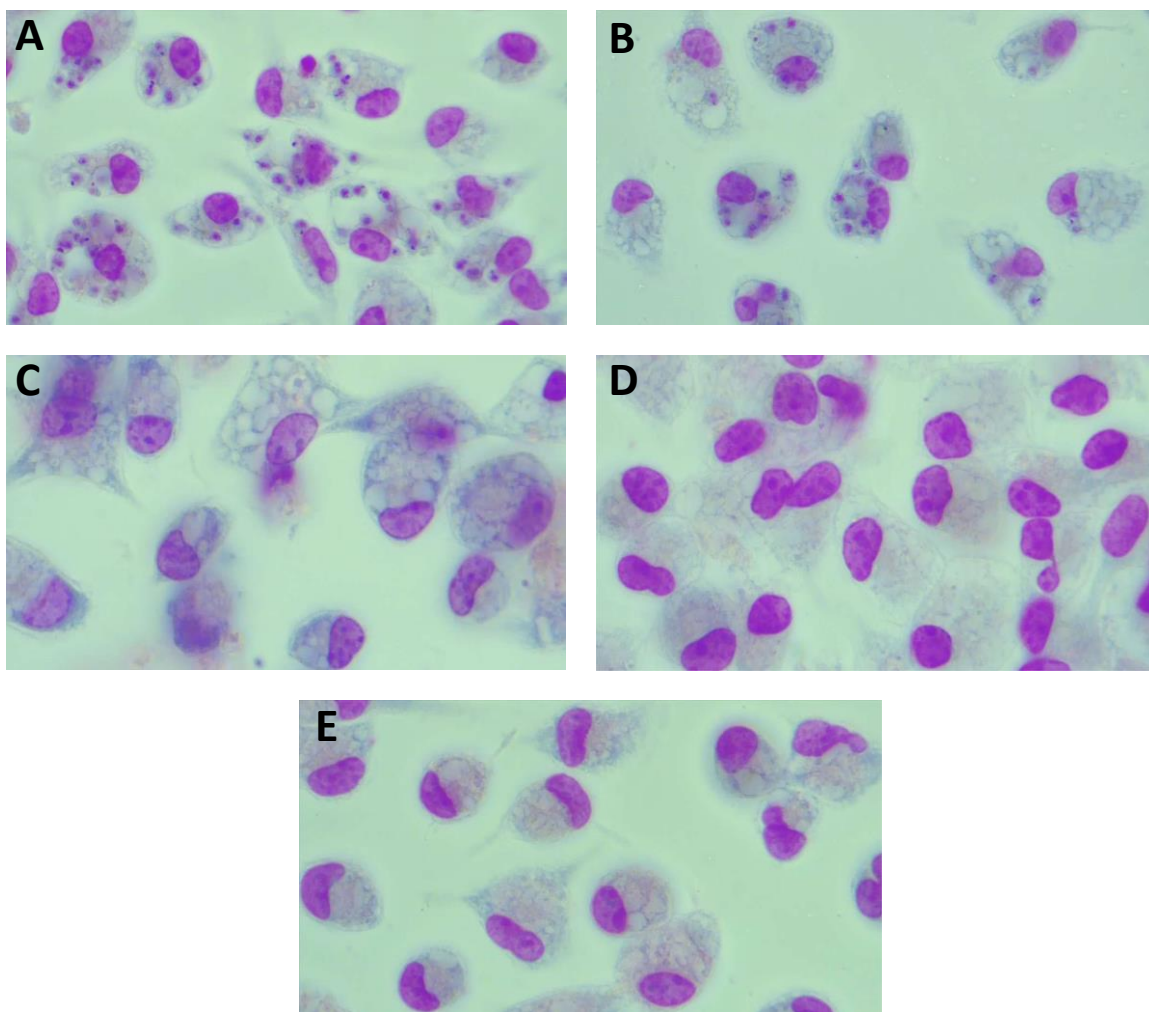


Figura 5. Macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis* e tratados após 24h com (B) BA a 9,4 μM , (C) BA5 a 15,5 μM , (D) BA8 a 13,35 μM e (E) anfotericina B a 1,5 μM . (A) controle não tratado. Aumento de 1000x; Leica Microsystems.

5.4 Mecanismos de ação

Após a determinação da atividade contra as formas promastigotas e amastigotas de leishmania, foram realizados ensaios para elucidar os possíveis mecanismos de ação do BA5, como análise ultraestrutural, padrão de morte celular, despolarização da membrana mitocondrial e ciclo celular.

5.4.1 Alterações ultraestruturais no parasito

Parasitos não tratados mantem suas características normais, como estabilidade superficial da membrana, típico alongamento do corpo celular e longo flagelo preservado. Promastigotas tratadas no tempo de 48h com três concentrações diferentes do BA5 apresentaram danos diretos aos parasitos, vistos por microscopia eletrônica de varredura. Parasitos tratados com metade do valor de CI_{50} apresentaram alterações morfológicas, como *blebs* de membrana e deformações no flagelo. O aumento da concentração de BA5 promoveu maior desorganização da membrana, *blebs* e aumento de tamanho do parasito, consistente com a redução na viabilidade (**Figura 9**). Alterações semelhantes foram visualizadas na mesma espécie de parasitos tratados com uma serie de híbridos de triazinas (BARÉA *et al.*, 2018) e com um inibidor de calpaina (MARINHO *et al.*, 2014). A anfotericina B, como esperado, promove alterações morfológicas no parasito, como encurtamento do flagelo e danos na membrana. O surgimento de *blebs* de membrana, alterações no tamanho e danos flagelares são características presentes em parasitos em morte celular por apoptose (MARINHO *et al.*, 2014; STEFANELLO *et al.*, 2014).

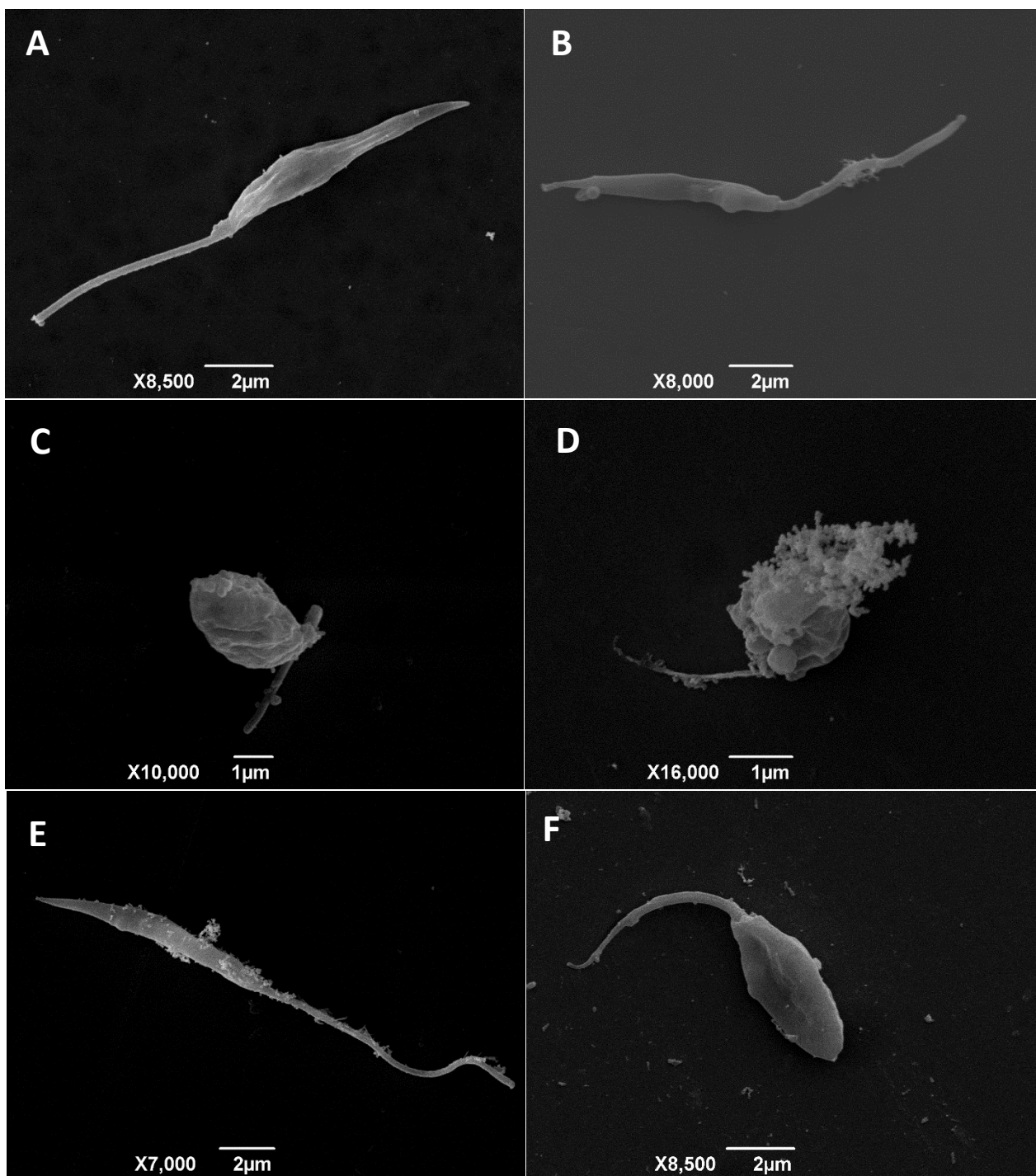


Figura 6. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de promastigotas de *L. amazonensis* incubadas com BA5. Controle não tratado (A) e parasitos tratados com BA5 na concentração de $IC_{50}/2$ ($2,2 \mu M$) exibindo protusões de membrana semelhantes a *blebs*; (B) parasitos tratados com BA5 IC_{50} ($4,5 \mu M$) apresentando dano flagelar e edema; (C) parasitos tratados com BA5 - $2x IC_{50}$ ($9,0 \mu M$) demonstrando deformação no corpo celular; (E) parasitos tratados com anfo B (IC_{50}) mostrando danos flagelares e na membrana and (F) parasitos tratados com anfoB $2x IC_{50}$ demonstrando retração flagelar e edema.

5.4.2 BA5 induz morte celular por apoptose

Uma vez que a análise ultraestrutural exibiu características apoptóticas, foi avaliado o efeito do BA5 sobre a morte celular de promastigotas de *L. amazonensis* por citometria de fluxo. As células em apoptose apresentam externalização da fosfatidilserina de membrana, a qual em condições normais fica na membrana voltada na face citosólica. A anexina-V tem afinidade por esta proteína, sendo um eficaz marcador de apoptose tanto na fase inicial quanto na fase tardia. A medida que o processo apoptótico evolui, a bicamada lipídica de membrana sofre pequenas rupturas. Estes poros são suficientes para a internalização do PI, marcador de elevado peso molecular e alta afinidade pelos ácidos nucleicos (STROPPA *et al.*, 2017). Após o tratamento com BA5, houve um aumento significativo ($p < 0,01$) do percentual de parasitos marcados com anexina-V nas três concentrações testadas, indicando morte celular por apoptose. Em comparação ao controle não tratado (4,35%), o BA5 na concentração de $IC_{50}/2$ apresentou 34,6% de parasitos marcados para anexina-V e nas concentrações de IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ apresentou cerca de 67% de marcação. Esses dados corroboram com os resultados da análise ultraestrutural dos parasitos tratados com BA5. Alterações morfológicas semelhantes, como dano flagelar, aparecimento de blebs e aumento no tamanho do parasito, foram previamente associadas à morte apoptótica induzida. A apoptose é um evento importante no contexto da resposta imune do hospedeiro e no sucesso do estabelecimento da infecção. A sobrevivência desses parasitos no interior dos macrófagos é uma questão crucial na patogênese da doença no hospedeiro mamífero. Apesar de ser um evento marcadamente de organismos multicelulares, atualmente, há dados na literatura que sugerem um mecanismo semelhante a apoptose em eucariotos unicelulares. Em tripanossomatídeos, a morte celular regulada se mostra vantajosa para evitar a ativação do sistema imunológico e, por conseguinte, a sobrevivência dos parasitos intracelulares (SHAHA, 2006; MARINHO *et al.*, 2014).

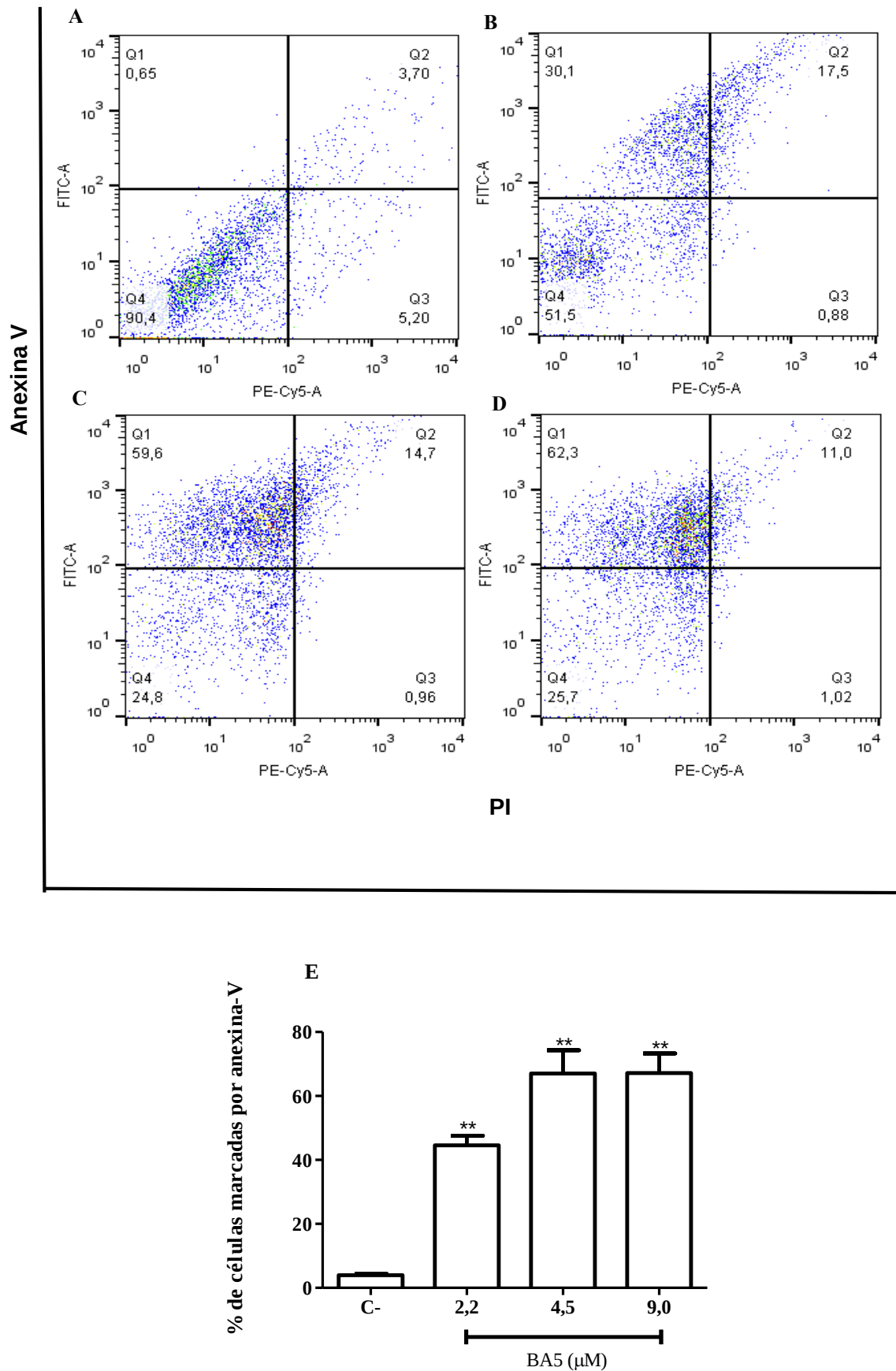


Figura 7. Padrão de morte celular por citometria. Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com BA5 e incubadas com iodeto de propídio e anexina V após 48h de incubação. (A) Promastigotas não tratadas; (B) promastigotas tratadas com 2,2 μM de BA5; (C) promastigotas tratadas com 4,5 μM de BA5; (D) promastigotas tratadas com 9,0 μM de BA5; (E) Percentual de parasitos marcados por anexina V após 48h de tratamento com BA5. Valores representativos de medias ± DP de três determinações obtidas em dois experimentos. ***P< 0.01 comparado ao controle não tratado.

5.4.3 O BA5 atua por uma via independente de despolarização de membrana mitocondrial

A mitocôndria única de tripanossomatídeos tem importante papel na morte celular por apoptose em leishmania e tem sido alvo molecular na prospecção de novas drogas (FIDALGO & GILLE, 2011). O potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. amazonensis* foi mensurado através da marcação dos parasitos com rodamina 123, após tratamento com o BA5. A rodamina 123 é um corante lipofílico catiônico que se distribui no compartimento mitocondrial. Seu acúmulo eletroforético na matriz mitocondrial da célula metabolicamente ativa gera intensidade proporcional a quantidade absoluta do corante. A redução na intensidade está relacionada com a despolarização, ou seja, a perda do potencial da membrana mitocondrial interna. Pode-se observar que em comparação com o metanol, o controle positivo para despolarização, não houve redução da intensidade de marcação com a rodamina 123 dos parasitos após tratamento com o BA5, em ambas as concentrações de CI_{50} e 2x o valor de CI_{50} (**Figura 6**). Isto indica que não houve alteração do potencial da membrana mitocondrial do parasito com o tratamento e a molécula age, possivelmente, por uma via independente da despolarização de membrana mitocondrial. Entretanto, ao contrário do que foi visto, há trabalhos na literatura descrevendo o efeito do ácido betulínico e alguns derivados sobre despolarização de mitocôndrias (SOUSA *et al.*, 2014). Atualmente, já se sabe que a apoptose pode ser realizada por diferentes vias. A despolarização da membrana mitocondrial é necessária para a ativação da via intrínseca clássica dependente das caspases. No entanto, há estudos que mostram que após um estímulo apoptótico por agentes químicos como medicamentos, as vias independentes das caspases podem ser ativadas. Assim, a apoptose pode prosseguir sem interrupção mitocondrial. Além disso, há relatos de que as leishmanias não têm as caspases propriamente ditas, mas exibem peptidases e metacaspases cujas atividades são as mesmas e a morte celular semelhante à apoptose (EISCHEN *et al.*, 1917; ANAZETTI & MELO, 2007; MARINHO *et al.*, 2014).

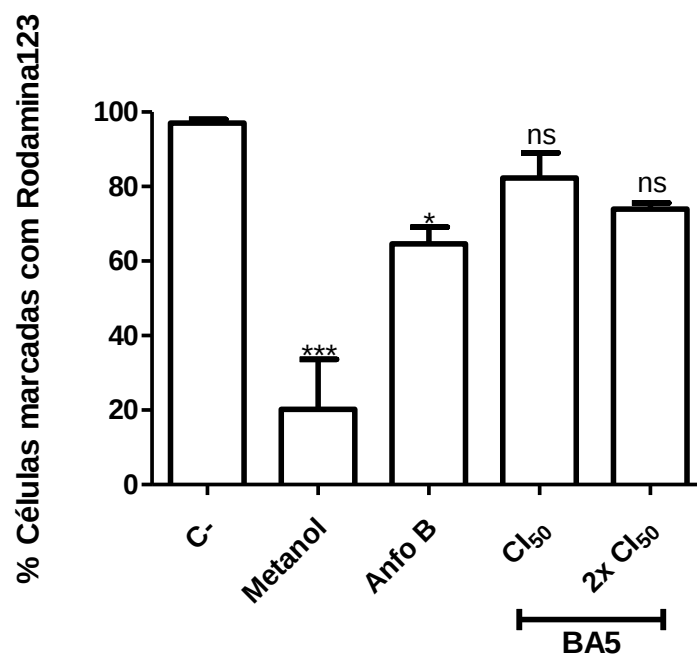


Figura 8. Potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. amazonensis* incubados com BA5. Promastigotas foram incubadas ou não com BA5 nas concentrações de Cl₅₀ (4,5 µM) e 2x IC₅₀ (9,0 µM). Após 72h de incubação, os parasitos foram marcados com rodamina 123. O metanol foi utilizado como o controle positivo. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo LSRFortessa e analisadas pelo software FlowJo (10.000 eventos foram coletados e analisados). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e ns= não significativo em comparação com o grupo não tratado.

5.4.4 BA5 interfere na progressão do ciclo celular

Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com BA5 e anfotericina B nas concentrações de CI_{50} e $2x CI_{50}$ foram marcadas com PI e analisadas por citometria de fluxo. A Figura 9 mostra a distribuição do DNA através do ciclo celular dos parasitos, na ausência e presença dos compostos testados. Após 24 horas de incubação, houve parada do ciclo celular na fase G0 com aumento seguinte na fase G1 nas duas concentrações testadas. Na literatura há poucos trabalhos avaliando o efeito do BA e seus derivados na progressão do ciclo celular. Sousa e colaboradores demonstraram que outro derivado do BA, de forma semelhante, induziu parada na fase G0/G1 de promastigotas de *L. infantum*. Anteriormente, nosso grupo avaliou o efeito do BA5 sobre esplenócitos de camundongos BALB/c. O BA5 induziu uma parada do ciclo celular nas fases G0/G1 em todas as concentrações testadas (500; 50 e 5 nM) (MEIRA *et al.*, 2017). De forma semelhante, BA5 induziu parada na mesma fase após tratamento de *L. amazonensis* em concentrações maiores. Estes dados, somados aos observados nos ensaios anteriores sugerem que a apoptose induzida por BA5 pode ter levado à degradação do DNA.

Adicionalmente, o nosso grupo já relatou os efeitos imunossupressores do BA5 (MEIRA *et al.*, 2017). Esta molécula reduz a síntese de importantes citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-2, IFN- γ e IL-17. Este derivado do ácido betulínico, assim como seu protótipo inibem a síntese de óxido nítrico, uma importante molécula leishmanicida. Apesar do efeito benéfico do tratamento *in vitro* com o BA5 pareça contraditório devido à sua atividade imunossupressora, a inibição do crescimento de diferentes espécies de leishmania pode ser devido a uma ação direta desta molécula nos parasitos como observado neste trabalho.

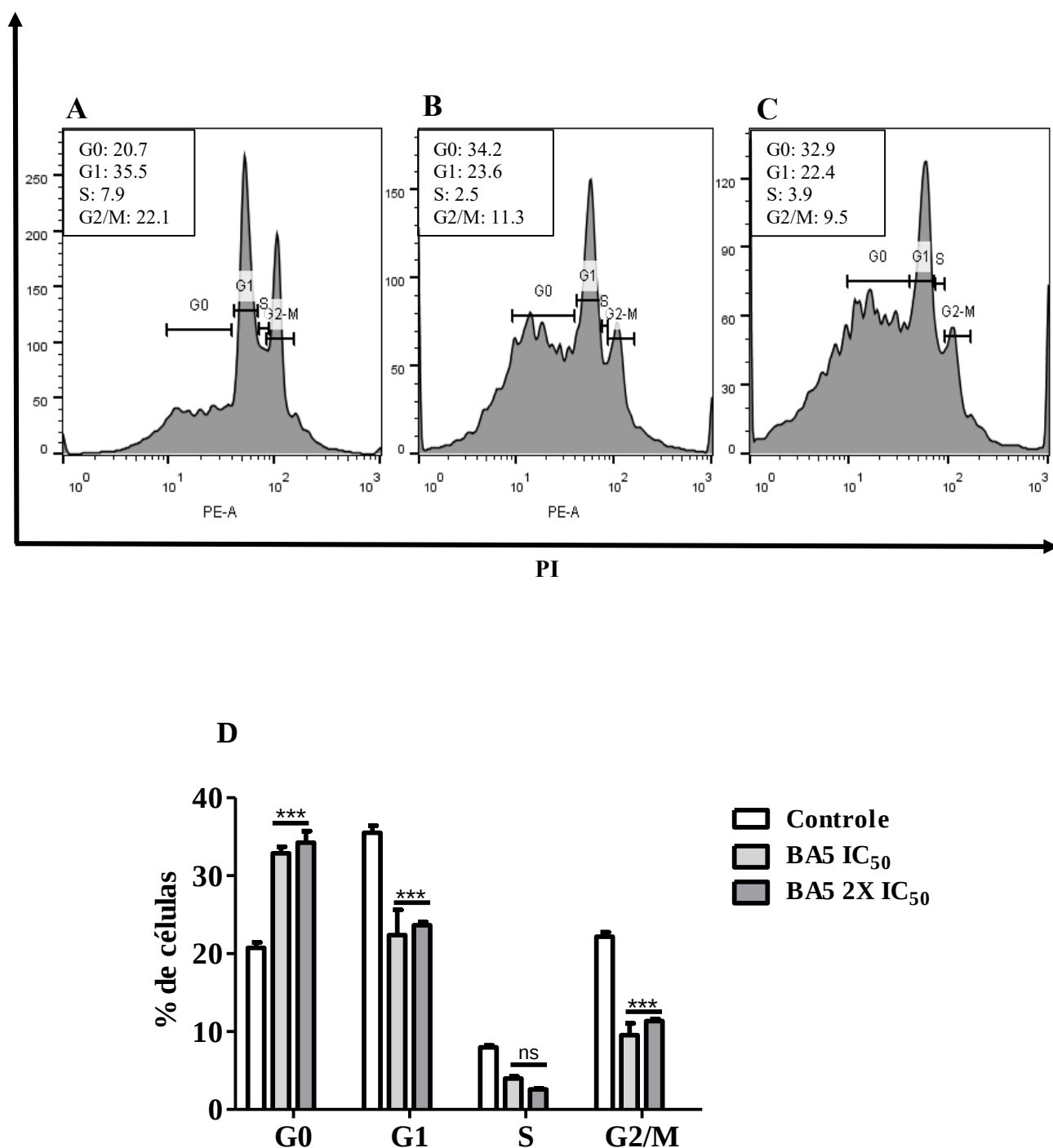


Figura 9. Análise da progressão do ciclo celular após tratamento com BA5 e marcação com PI por citometria de fluxo. A distribuição do percentual de parasitos na pre-fase G0, G1, S and G2/M fase do ciclo celular está indicado (A-C). Um significativo aumento dos parasitos na fase G0 e significativa redução na população de células na fase G2/M foi observado em parasitos tratados com BA5 nas concentrações de IC₅₀ (B) e 2x IC₅₀ (C) comparados com o controle não tratado (Valores representativos de médias $\pm$ DP de três determinações de um experimento realizado. *** p < 0.001 comparado aos parasitos não tratados.

5.5 Efeito sinérgico do BA5 e anfotericina B

Combinações de medicamentos são alternativas aplicadas na clínica para o tratamento das leishmanioses e apresenta vantagens em relação à monoterapia atual. O efeito antileishmania da combinação de BA5 e anfotericina B foi investigado sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Em comparação com cada droga isolada, a combinação de BA5 e anfotericina B reduziu os valores de CI_{50} da anfotericina cerca de sete vezes e do BA5 50 vezes (**Tabela 2**). O BA5, em combinação, exibiu valor de CI_{50} igual ao da anfotericina B isolada ($0,09 \pm 0,01 \mu M$). Os valores do índice de combinação associados a um isoblograma revelaram que BA5 e anfotericina B têm efeitos sinérgicos (**Figura 7**). A anfotericina B é um medicamento de segunda escolha no Brasil para o tratamento das leishmanioses. A sua utilização é empregada em casos em que são encontrados altos níveis de resistência aos antimoniais. Entretanto, há limitações quanto a sua utilização concernentes a elevada toxicidade. A terapia medicamentosa combinada pode ser uma importante ferramenta para redução dos efeitos tóxicos, bem como diminuir a duração do tratamento e melhorar a adesão ao tratamento pelo paciente (MONGE-MAILLO & LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Neste sentido, alguns estudos se desenvolveram com o objetivo de associar compostos promissores à anfotericina B (SUNDAR *et al.*, 2004; MURRAY *et al.*, 2005; ALVAR *et al.*, 2006). Atualmente, está em fase II um ensaio clínico avaliando o uso da anfotericina B lipossomal associado a miltefosina, contudo, a toxicidade ainda é um desafio (DNDI, 2020; ROATT *et al.*, 2020). Ademais, nosso grupo já relatou a atividade do BA5 aumentando o efeito imunossupressor da dexametasona (MEIRA *et al.*, 2017). Ao interagir com a anfotericina B, o BA5 novamente demonstrou potencializar o efeito do fármaco de referência ($IC=0,15$; sinérgico).

Tabela 3. Reduções de concentração e índices de combinação por BA5 e anfotericina B

Compostos	CI ₅₀ ± DP (μM)*		IC**
	Droga isolada	Combinação	
BA5	4,50 ± 1,1	0,09 ± 0,01	0,15± 0,09
Anfotericina B	0,09± 0,02	0,012 ± 0,006	

*Os valores de CI₅₀ foram calculados usando concentrações em quadruplicatas e dois experimentos independentes foram realizados; ** Índice de combinação (IC). Corte: IC valor de 0,1–0,7, sinergismo; 0,7–0,85, sinergismo moderado; 0,85–0,9, ligeiro sinergismo; 0,9–1,1, aditividade; > 1,1, antagonismo. DP= Desvio Padrão.

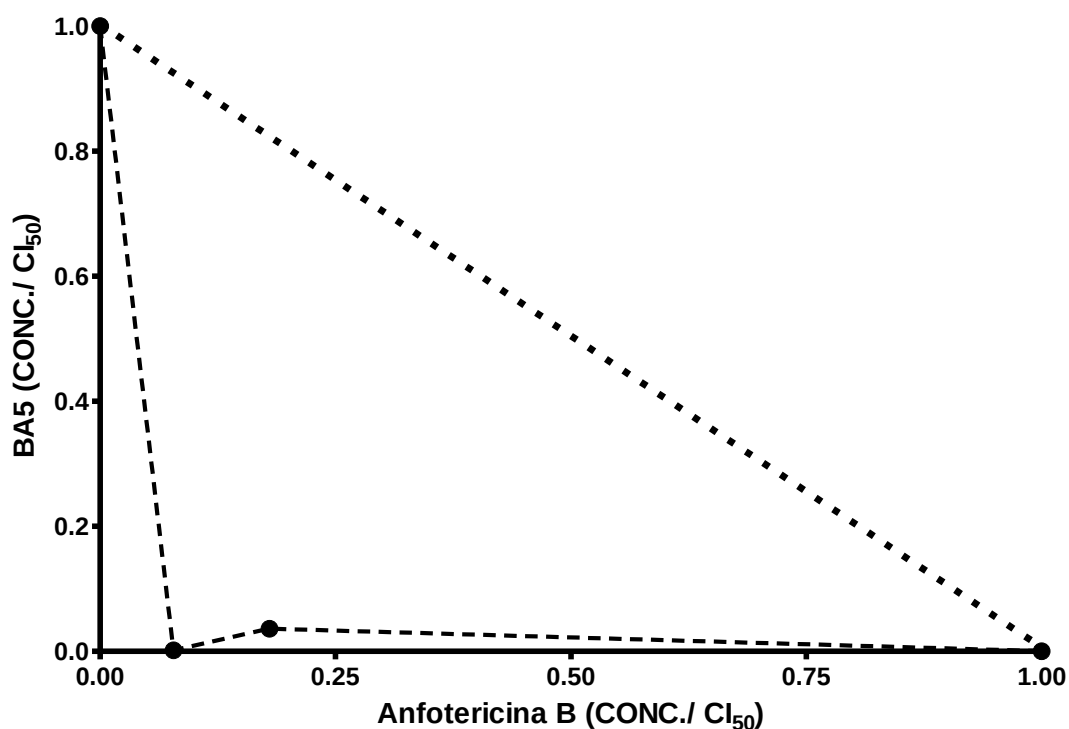


Figura 10. Isobolograma descrevendo os efeitos de sinergismo entre BA5 e anfotericina B sobre promastigotas de *L. amazonensis*. As linhas de pontilhadas correspondem as posições previstas dos pontos experimentais para efeitos aditivos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho demonstra uma importante atividade antileishmania *in vitro* do BA5. Esta molécula apresentou maior efetividade do que seu protótipo, baixa citotoxicidade, atividade frente proliferação parasitária e infecção de macrófagos. Além disso, o BA5 não causou indução da despolarização da membrana mitocondrial, sugerindo que o composto atue por outra via para induzir a morte da leishmania. Por fim, o BA5 em combinação com a anfotericina B foi capaz de potencializar seu efeito a partir de uma interação sinérgica com a droga de referência. Sugere-se, portanto, que o BA5 pode ser uma alternativa terapêutica promissora no tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- ALAKURTTI, S.; HEISKA, T.; KIRIAZIZ, A.; SACERDOTI-SIERRA, N.; JAFFE, C.L.; YLI-KAUHALUOMA, J. Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 1573-1582, 2010.
- ALI-SEYED, M., JANTAN, I., VIJAYARAGHAVAN, K., BUKHARI, S.N., 2016. Betulinic acid: recent advances in chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising anticancer therapy. *Chem. Biol. Drug Des.* 87 (4), 517–536, 2016.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v.86, n.3, 2011.
- ALVAR, J.; VELEZ, I.; BERN, C. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* v.7, p. 35671, 2012.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp pesquisa*, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.
- ASSILIAN, A. *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 81, n. 5, 2003.
- B., ARGIRO, L., EL KHEIR, M., BUCHETON, B., MARY, C., EL-SAFI, S. H., & BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W.O. *et al.* Upregulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*, v. 70, n. 12, p.6734-6740, 2002.
- BARBOSA-FILHO, J.; *et al.* Constituents of the stem-bark of *Zizyphus joazeiro*. *Journal of natural products*, v. 48, n. 1, p. 152-153, 1985.
- BARÉA, P.; BARBOSA, V.A.; BIDÓIA, D.L. *et al.* Synthesis, antileishmanial activity and mechanism of action studies of novel β -carboline-1, 3, 5-triazine hybrids. *European journal of medicinal chemistry* v.150, p. 579-590, 2018.
- BASTOS, M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. *et al.* Quimioterapia antileishmania: uma revisão da literatura. *Rev Virtual Quim*, v.8, p. 2072-2104, 2016.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International journal for parasitology*, v. 28, n. 1, p. 121-134, 1998.
- BOLARD, J.; JOLY, V.; YENI, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. *J. Liposome Res.*, v. 3, p. 409-427, 1993.
- BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2017.

BRITO, N.C; MACHADO DE ASSIS, T.S; RABELLO, A.; COTA, G. Intralesional infiltration versus parenteral use of meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis: A cost-effectiveness analysis. **PLoS Negl Trop Dis** 13(12):7856, 2019.

BRYCESON, A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. **Trop Med Int Health**. v.6, p. 874-82, 2001.

BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet** v.392, p. 951-970, 2018.

caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 8, CHANDRAMU, C.; MANOHAR, R.D.; KRUPADANAM, D.G. *et al.* Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. **Phytotherapy Research** v.17, p. 127-134, 2003.

CHEN, Z.; WU, Q.; CHEN, Y. *et al.* Effect of betulinic acid on proliferation and apoptosis in Jurkat cells and its mechanism. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi [Chinese journal of oncology]** v. 30, p. 588–592, 2008.

CICHEWICZ, H.; KOUZI, S.A. Chemistry, biological activity and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. **Med.Res.Rev.**v.24, p.90–114, 2004.

COSTA, J. M. L. *et al.* Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**. Salvador v.79, n.3, 2009.

CSUK, R. Betulinic acid and its derivatives: a patent review (2008-2013). **Expert opinion on therapeutic patents**, v.24, p.913–23, 2014.

DEHELEAN, C.A.; FEFLEA, S.; GANTA, S.; AMIJI, M. Anti-angiogenic effects of betulinic acid administered in nanoemulsion formulation using chorioallantoic membrane assay. **J. Biomed. Nanotechnol.** 7 (2), 317–324, 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases** v.27, p.305-318, 2004.

DESSEIN, A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar DOMINGUEZ-CARMONA, D. B.; ESCALANTE-EROSA, F.; RUIZ-PINELL, G.; GUTIERREZ-YAPU, D.; CHAN-BACAB, M.J.; GIMENEZ-TURBA, A.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. *Phytomedicine* 17, 379-382, 2010.

EHRlich, A., CASTILHO, T. M., GOLDSMITH-PESTANA, K., CHAE, W. J., BOTHWELL, A. L., SPARWASSER, T., & MCMAHON-PRATT, D. The immunotherapeutic role of regulatory T cells in *Leishmania (Viannia) panamensis* infection. **Journal of immunology**, Vol. 193, pag. 2961–2970, 2014.

EISCHEN, C. M. *et al.* Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. **Blood.**, v.90, p. 935-943, 1997.

ELBARIDI, N.; KAYE, A. D.; CHOI S.; URMAN, R. D. Current Concepts of Phenylpiperidine Derivatives Use in the Treatment of Acute and Chronic Pain. *Pain Physician: Opioid Special Issue* v.20 p.SE23-SE31, 2017.

FIDALGO, L. M., & GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical research**, Vol. 28, pag. 2758–2770, 2011.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobolograma method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 48, p. 4097-4102, 2004.

FUJIOKA T, KASHIWADA Y, KILKUSKIE R *et al*. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 243-247, 1994.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S., PESSOA-E-SILVA, R., TRAJANO-SILVA, L., DE GOES, T. C., DE MORAIS, R., DA C OLIVEIRA, C. N., DE LORENA, V., & DE PAIVA-CAVALCANTI, M. The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, Vol. 8, pag. 1437, 2017.

GONTIJO, B.; CARVALHO M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n. 1, 2003.

GOTO, H.; ANGELO, J.; LINDOSO, L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. Vol, 8, pag. 419-433, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infect Dis Clin N Am**. Vol. 26, pag. 293-307, 2012.

GUEDES, C.E.S.; DIAS, B.R.S.; PETERSEN, A.L.D.O.A., *et al*. *In vitro* evaluation of the anti-leishmanial activity and toxicity of PK11195. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 4, 2018.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR A. R. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. In: *Advances in applied microbiology*. **Academic Press**, p. 155-184, 2013.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L. & COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*. v.2, p.403-409, 2011.

HOLZMULLER, P., BRAS-GONÇALVES, R., LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, London, v. 132, p. S19-S32, 2006.

INNOCENTE, A.M.; SILVA, G.N.; CRUZ, L.N.; MORAES, M.S.; NAKABASHI, M.; SONNET, P.; GOSMANN, G.; GARCIA, C.R.; GNOATTO, S.C. Synthesis and

antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. *Molecules* 17, 12003-12014, 2012.

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

KIM JY, KOO HM, KIM DS. Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters** v. 11, p. 2405-2408, 2001.

KROGH R, KROTH R, BERTI C *et al.* Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomea pes-caprae* (L.) **R. Br. Pharmazie** v. 54, p. 464-466, 1999.

LI J, JING J, BAI Y *et al.* SH479, a betulinic acid derivative, ameliorates experimental auto immune encephalomyelitis by regulating the T helper 17/Regulatory T cell balance. **Mol. Pharmacol** v. 91, p. 464–474, 2017.

LIMA, E. B. *et al.* Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.82, n.2, 2007.

LOEUILLET, C.; BAÑULS, A.L.; HIDE, M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2016.

MARINHO, F.A.; GONÇALVES, K.C.S.; OLIVEIRA, S.S.C. *et al.* The Calpain Inhibitor MDL28170 Induces the Expression of Apoptotic Markers in *Leishmania amazonensis* Promastigotes. **PLoS ONE** v. 9, p. 87659, 2014.

MCGWIRE, B.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MEHRIZI TZ, ARDESTANI MS, HOSEINI MHM *et al.* Novel nanosized chitosan-betulinic acid against resistant *Leishmania major* and first clinical observation of such parasite in kidney. **Scientific reports** v. 8, p. 1-19, 2018.

MEIRA, C. S.; SANTOS, E. S.; SANTO, R. F. E. ; VASCONCELOS, J. F.; ORGE, I. D.; NONAKA, C. K. V.; BARRETO, B. C.; CARIA, A. C. I. ; SILVA, D. N.; FILHO, J. M. S.; MACAMBIRA, S. G.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P. Betulinic Acid Derivative BA5, Attenuates Inflammation and Fibrosis in Experimental Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy by Inducing IL-10 and M2 Polarization. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-9, 2019.

MEIRA, C.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; LANFREDI-RANGEL, A.; GUIMARÃES, E.T.; MOREIRA, D.R.M.; SOARES, M.B.P. Antiparasitic evaluation of betulinic acid derivatives reveals effective and selective anti-*Trypanosoma cruzi* inhibitors. **Exp Parasitol**, 2016.

MEIRA, C.S.; SANTO, R.F.E.; SANTOS, T.B.; ORGE, I.D.; SILVA, D.K.C.; GUIMARÃES, E.T.; SOARES, M.B.P. Betulinic acid derivative BA5, a dual NF- κ B/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity. **Eur J Pharmacol**, 2017.

MENEZES-SOUZA, D.; MENDES, T.A.; GOMES, M.D.E. S.; REIS-CUNHA, J.L.; NAGEM, R.A.; CARNEIRO, C.M.; COELHO, E.A.; GALVÃO, L.M.; FUJIWARA, R.T.; BARTHOLOMEU, D.C. Epitope mapping of the HSP83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol.**, p.949-59, 2014.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1889-1920, 2013.

MORAES LS, DONZA MR, RODRIGUES APD *et al.* Leishmanicidal activity of (+)-phyllanthidine and the phytochemical profile of *Margaritaria nobilis* (Phyllanthaceae). **Molecules** v. 20, p. 22157-22169, 2015.

MULLAUER FB, KESSLER JH, MEDEMA JP *et al.* Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects. **Anti-Cancer Drug** v. 21, p. 215-227, 2010.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R. *et al.* Advances in leishmaniasis. **The Lancet** v.366, p.1561, 2005.

NEWMAN, J.; CRAGG, G. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.** v. 79, p. 629–661, 2016.

OLIVEIRA, W. N. *et al.* The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127–132, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Controlo 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 28 de novembro de 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **FactSheet**. Organização Mundial da Saúde, 2017. Disponível em: Acesso em: 28 de novembro de 2019.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento. **Washington, D.C.**: OPS, 2017.

p. 2379–2387, 2009.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; NICO, D. The Delay in the Licensing of Protozoal Vaccines: A Comparative History. **Front. Immunol.** v.11, p.204, 2020.

PASSOS, C. L. A.; FERREIRA, C.; SOARES, D. C.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal effect of synthetic trans-resveratrol analogs. **PloS one**. Vol. 10, e0141778, 2015.

PINHEIRO, R.O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v.16, p. 7-8, 2004.

PIRES, A.M.S. *et al.* Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão. **Revista de Ciências da Saúde**, 2012.

PITTA, M. G., ROMANO, A., CABANTOUS, S., HENRI, S., HAMMAD, A., KOURIBA, RATH, S. *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p.550-555, 2003.

PRAYONG, P., BARUSRUX, S., & WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia**, Vol. 79, pag. 598-601, 2008.

REIS, L. C., *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

ROATT, B.; DE OLIVEIRA, J. DE BRITO, R. *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Appl Microbiol Biotechnol.**; v. 104, p. 8965-8977 n., 2020

ROCHA, Eleusa Maria Ferreira. **Mecanismo molecular envolvido na resistência aos derivados de acridina e ao antimicótico conazol em *Aspergillus nidulans***. 2002. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002. doi:10.11606/T.17.2002.tde-06032003-092850. Acesso em: 28 de nov de 2019.

ROMERO, A. H.; LOPEZ, S. E. *In silico* molecular docking studies of new potential 4-phthalazinylhydrazones on selected Trypanosoma cruzi and Leishmania enzyme targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 76, p. 313-329, 2017.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**, v. 133, p. 775-87, 2008.

SALAH, A. B. *et al.* WR279396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of Leishmania major cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 5, 2009.

SCHREIFER, A. L. F. *et al.* Papel do parasita e do hospedeiro na expressão clínica das leishmanioses. **Gazeta Médica da Bahia**. Salvador, v.75, n.1, 2005.

SHAHA, C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 233, 2006.

SILVA DKC, TEIXEIRA JS, MOREIRA DRM *et al.* *In Vitro*, *In Vivo* and *In Silico* Effectiveness of LASSBio-1386, an N-Acyl Hydrazone Derivative Phosphodiesterase-4 Inhibitor, Against Leishmania amazonensis. **Front. Pharmacol**, v. 11, p. 590544, 2020.

SILVEIRA, F.T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** V. 113: 505–516, 2019.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SOUSA, M.C.; VARANDAS, R.; SANTOS, R.C.; SANTOS-ROSA, M.; ALVEZ, V. Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: synergic effects with miltefosine. **PLoS One**, 2014.

STEFANELLO, T. F. *et al.* N-Butyl-[1-(4-methoxy) phenyl-9H- β -carboline]-3-carboxamide prevents cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7112-7120, 2014.

STROPPIA, P.H.F.; ANTINARELLI, L.M.R.; CARMO, A.M.L.; GAMEIRO, J.; COIMBRA, E.S.; DA SILVA, A.D. Effect of 1,2,3-Triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 17, p. 30096-2, 2017.

SUNDAR, S.; MEHTA, H.; SURESH, A.V. *et al.* Amphotericin B treatment for indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. **Clinical Infectious Diseases** v.38, p. 377, 2004.

TAKADA, Y.; AGGARWAL, B.B. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I Kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9. **J. Immunol.**17(6),3278–3286, 2003.

TEDESQUI, V. L. *et al.* Active surveillance of American tegumentary leishmaniasis in endemic areas in rural Bolivia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 45, n. 1, p. 30-34, 2012.

TEIXEIRA, C.; GOMES, R.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKY, C. Influência da Saliva de Flebotomíneos na Leishmaniose Experimental e Humana. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n.1, p. 18-23, 2005.

TEIXEIRA, R. Amebicidas. Tricomonocidas. Giardicidas. Tripanossomídeos. Leishmanicidas. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.1103-1110

TEMPONI, A. O. D. *et al.* Ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar americana: uma análise multivariada dos circuitos espaciais de produção, Minas Gerais, Brasil, 2007 a 2011. **Cad. Saúde Pública**, v. 34, n. 2, 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.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E., Visceral Leishmaniasis Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infect Dis Clin N Am** v.33, p. 79–99, 2019.

VANNIER-SANTOS, M.A., MARTINY, A. & DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania spp.*: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 297-318, 2002.

VASCONCELOS, J. M. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**.v.50(3), p. 221-7, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010) Control of the leishmaniases. World HealthOrgan Tech Rep Ser 949: 186.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual on case management and surveillance of the leishmaniases in the WHO EUROPEAN region. UN City, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected Diseases: Leishmaniasis**. Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. Acesso em 17 jan. 2021.

YANG, G., CHOI, G., & NO, J. H. Antileishmanial Mechanism of Diamidines Involves Targeting Kinetoplasts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, pag. 6828–6836, 2016.

YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties. **Current Medicinal Chemistry** v.12, p. 657–666, 2005.

YURDAKUL, P. Immunopathogenesis of Leishmania infections. **MikrobiyolBul.** v.39, n.3, 2005.

ANEXOS

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NA REVISTA

JOURNAL OF ANTIMICROBIALCHEMOTHERAPY

2021

[Home](#)[Author](#)[Review](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Manuscript ID

JAC-2021-0397

Title

BA5, A BETULINIC ACID DERIVATIVE, INDUCES G0/G1 CELL ARREST, APOPTOSIS LIKE-DEATH, AND MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN *Leishmania sp.*

Authors

Magalhães, Tatiana
Da Silva, Dahara
Teixeira, Jessica
De Lima, Juliana
Barbosa-filho, José
Moreira, Diogo
Soares, Milena
GUIMARAES, ELISALVA

Date Submitted

02-Mar-2021

[Author Dashboard](#)

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2021. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

 @ScholarOneNews |  System Requirements |  Privacy Statement |  Terms of Use

DRAFT PROOF DO ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA JOURNAL
ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY

BA5, A BETULINIC ACID DERIVATIVE, INDUCES G0/G1 CELL ARREST, APOPTOSIS LIKE-DEATH, AND MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN *Leishmania sp.*

Journal:	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Magalhães, Tatiana; Universidade do Estado da Bahia, Ciências da Vida; Fiocruz Bahia, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia Da Silva, Dahara; Universidade do Estado da Bahia, Ciências da Vida; Fiocruz Bahia, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia Teixeira, Jessica; Universidade do Estado da Bahia, Ciências da Vida; Fiocruz Bahia, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia De Lima, Juliana; Universidade do Estado da Bahia, Ciências da Vida; Fiocruz Bahia, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia Barbosa-filho, José; Universidade Federal da Paraíba Moreira, Diogo; Fiocruz Bahia, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia Soares, Milena; Fiocruz Bahia, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia GUIMARAES, ELISALVA; Universidade do Estado da Bahia, Ciências da Vida; Fiocruz Bahia, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
Keywords:	Leishmania spp, Betulinic acid, Mechanisms of action

SCHOLARONE™
 Manuscripts

**BA5, A BETULINIC ACID DERIVATIVE, INDUCES G0/G1 CELL
ARREST, APOPTOSIS LIKE-DEATH, AND MORPHOLOGICAL
ALTERATIONS IN *Leishmania* sp.**

MAGALHÃES, Tatiana Barbosa dos Santos^{1,2}; DA SILVA, Dahara Keyse Carvalho^{1,2};
TEIXEIRA, Jessica da Silva²; DE LIMA, Juliana Dizaira Teles^{1,2}; BARBOSA-FILHO,
José Maria³; MOREIRA, Diogo Rodrigo Magalhães²; SOARES, Milena Botelho
Pereira^{2,4}; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira^{1,2}.

¹ Laboratório de Histotécnica e Cultura Celular, Departamento de Ciências da Vida,
Universidade do Estado da Bahia (UNEB), CEP 41150-000, Salvador, BA, Brazil;

² Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Instituto Gonçalo Moniz,
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), CEP 40296-710, Salvador, BA, Brazil;

³ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-
900, João Pessoa, PB, Brazil;

⁴ Instituto Senai de Inovação em Sistemas Avançados em Saúde, SENAI/CIMATEC,
CEP 41650-010, Salvador, BA, Brazil.

Corresponding author
Elisalva Teixeira Guimarães (etguimaraes@uneb.br)
Universidade do Estado da Bahia - UNEB. Rua Silveira Martins, 2555, Cabula.
Salvador – BA, Brazil. CEP: 41.150-000.
Phone: 55-71-3177-2200

Abstract

Objectives: To investigate the *in vitro* activity of BA5- a betulinic acid derivative- against different species of *Leishmania* and their action mechanism.

Methods: The viability of axenic *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* and *L. infantum* promastigotes was evaluated after treatment with BA5 to determine IC₅₀ values. Infected macrophages were then treated with BA5 to determine the percentage of *L. amazonensis*-infected macrophages and the number of parasites per infected cell. To understand the mechanism of action underlying BA5 antileishmanial activity, we investigated ultrastructural changes by scanning electron microscopy and evaluated cell cycle, membrane mitochondrial potential, and cell death by flow cytometry

Results: BA5 exhibited low cytotoxicity against macrophages and inhibited the proliferation of promastigote forms of *L. amazonensis* (IC₅₀ = 4.5 ± 1.1 µM), *L. major* (IC₅₀ = 3.0 ± 0.8 µM), *L. braziliensis* (IC₅₀ = 0.9 ± 1.1 µM) and *L. infantum* (IC₅₀ = 0.15 ± 0.05 µM). Treatment with BA5 reduced the percentage of *L. amazonensis*-infected macrophages and the number of intracellular parasites (IC₅₀ = 4.1 ± 0.7 µM). Promastigotes incubated with BA5 presented membrane blebbing, flagella damage, increased size, and body deformation. Flow cytometry analysis showed that parasite death is mainly caused by apoptosis, arrested cell cycle in G0/G1 phase and did not induce alterations in membrane potential in *L. amazonensis* promastigotes. Surprisingly, the combination of BA5 and amphotericin B revealed synergistic effects on promastigotes forms of *L. amazonensis*.

Conclusions: BA5 may be a suitable candidate for antileishmanial drug development, alone or in combination with other drugs.

Introduction

Leishmaniasis are a complex of diseases caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania*. Despite being among the ten most relevant infectious diseases, leishmaniasis are part of a wide group of diseases worldwide neglected.¹ In 2021, WHO published that 54 countries are endemic to Visceral Leishmaniasis (VL) and 53 countries are endemic to Cutaneous Leishmaniasis (CL). Cases have been reported in about 98 countries and 12 million people approximately have their lives affected by the different clinical spectra of the disease.²

Clinical manifestations depend on factors inherent to the parasite, the natural resistance of the host and the magnitude of the immune response.³ After inoculation of promastigote forms through the bite of the insect vector, the parasite is internalized by host defense cells and differentiates into amastigote forms. In this way, the relationship between parasite and the host will determine the course of the disease. The host can be asymptomatic or develop classic skin and mucosal lesions, as well as atypical forms such as diffuse and disseminated, and the visceral manifestation.⁴ In the Americas, the main species that cause cutaneous leishmaniasis are *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*.⁵ On the other hand, visceral leishmaniasis is characterized by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. The variability of species and their clinical outcomes are a challenge for the effective treatment and prophylaxis of the disease.⁶

Although the knowledge of cell biology and immunology of leishmaniasis has advanced in recent decades, pharmacotherapy still lacks new alternatives. Pentavalent antimonial has been the first-line drugs since 1960, but they are not enough to control the disease. In addition, they present several limitations such as high toxicity and adverse effects, resistance, the need for hospitalization and treatment failure. The second-line drugs, such

as amphotericin B, pentamidine and miltefosine, also have several limitations, like high costs and teratogenicity.^{7,8}

In this regard, the search for new active compounds plays an important role in the development of new antileishmanial drugs. Betulinic acid is a molecule of the class of pentacyclic triterpenes widely distributed in the plant kingdom. This compound has caused interest in the scientific community due to its vast number of biological activities, such as antitumor, anti-inflammatory, immunomodulatory, antimicrobial and antiparasitic activities.⁹⁻¹¹ Strategic structural changes in the carboxyl groups of betulinic acid can generate more active molecules than its prototype.¹² Our research group previously tested a series of semi-synthetic molecules derived from betulinic acid. BA5, a synthetic derivative of betulinic acid, caused ultrastructural changes in *Trypanosoma cruzi*, such as loss of plasma membrane integrity and the appearance of atypical vacuoles, causing death of the parasite by necrosis.¹³ Additionally, the immunomodulatory activity of BA5 was evaluated on macrophages and lymphocytes, being able to inhibit both the NF- κ B and calcineurin pathways.¹⁴ Here we evaluated the activity of BA5 *in vitro* against different species of *Leishmania*, and their action mechanisms.

Materials and methods

Drugs

Betulinic acid is a molecule extracted from the bark of *Ziziphus joazeiro* Mart. from the family Rhamnaceae, a native brazilian tree. This method was described by Barbosa-Filho *et al.*, 1985. Semi-synthetic compounds were prepared from betulinic acid and BA5 derivative was used in antileishmanial assays (BA5; 94–98% purity by high performance liquid chromatography). Amphotericin B (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD) was

used as positive control in antileishmanial assay. Gentian violet (Synth, São Paulo, SP, Brazil) was used as positive control in the cytotoxicity to mammalian cell assays.

Animals

Male 4 to 6-weeks old BALB/c were used. All mice were raised and maintained at the animal facilities of the Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil in sterilized cages, under a controlled environment and receiving a balanced rodent diet and water *ad libitum*. All experiments were approved by the local Animal Ethics Committee (Approval number: 004/2019).

Parasites

L. amazonensis (MHOM/BR88/BA-125 Leila strain), *L. major* (MHOM/RI/WR173), *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) and *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262) promastigotes were cultivated in liver infusion tryptose (LIT) or Schneider (Sigma, St. Louis, MO, USA) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 50 µg mL⁻¹ gentamicin (Sigma), pH 7.2, at 26 °C until logarithmic phase. Log phase promastigotes were used to study the effects of the betulinic acid and BA5 derivative on parasites.

Viability assay

L. amazonensis, *L. major*, *L. braziliensis* and *L. infantum chagasi* promastigotes (1x10⁶ cells/well) were incubated into 96-well plates, cultivated in Schneider (Sigma) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and µg mL⁻¹ gentamicin (Sigma). Drugs were added at six concentrations ranging from 1.56 µM to 50 µM in triplicate, and the plate was incubated for 72 h at 26 °C. Promastigotes viability was

measured by twenty μL /well of AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) during 2 h or 24 h, metabolism and colorimetric readings were performed at 570 and 600 nm.

Cytotoxicity to mammalian cell

Peritoneal exudate macrophages were obtained by washing of the peritoneal cavity of BALB/c mice with cold Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Life Technologies, GIBCO-BRL), 5 days after injection of 3% thioglycolate in saline (1.5 mL per mice). Cells were added into 96-well plates at a density 1×10^5 cells/well containing DMEM medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS; Gibco) and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicin (Novafarma, Anapolis, Brazil) and incubated for 24 h at 37°C and 5% CO_2 . Drugs was added in triplicate at eight concentrations ranging from 0.04 to $100 \mu\text{M}$ and incubated for 72 h. Twenty μL /well of AlamarBlue (Invitrogen) was added to the plates during 10 h. Colorimetric readings were performed at 570 and 600 nm. IC_{50} values were calculated using data-points gathered from three independent experiments. Gentian violet (Synth, Sao Paulo, Brazil) was used as positive control, at concentrations ranging from 0.04 to $10 \mu\text{M}$.

In vitro macrophage infection with L. amazonensis

Peritoneal exudate macrophages (5×10^5 cells) were plated onto sterile coverslips in 24-well plates and kept for 24h. The macrophages were infected with stationary growth phase promastigotes of *L. amazonensis* at a ratio of 10:1 macrophage at 35°C during 4 h and 5% CO_2 . Infected macrophages were treated with different atoxic concentrations with values below the IC_{50} values of BA (9.4; 4.7; $2.3 \mu\text{M}$) and BA5 (15.5; 7.7; $3.8 \mu\text{M}$). After 24 h, the cells were fixed in methanol and stained by Giemsa (Sigma). The percentage of infected macrophages and the number of amastigotes/macrophages were determined by

counting 100 cells per slides, as previously described. Amphotericin B (Gibco) was used as a positive control in this assay.

Annexin V and propidium iodide staining

Promastigotes of *L. amazonensis* (10^6 cells/well) were incubated in 24-well plates and treated with BA and BA5 in different concentrations (IC_{50} or $2 \times IC_{50}$) for 24 h at 26 °C. Parasites were labeled with propidium iodide (PI) and annexin V using the annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis detection kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. The experiment was performed using a BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) by acquiring 10,000 events, and data were analyzed by BD software FlowJo v10 (Tree Star, Ashland, OR).

Cell cycle analysis

Promastigotes of *L. amazonensis* (1×10^7 /well) were incubated with BA5 (9.0 and 4.5 μ M) for 48 h. Parasites were washed with saline, centrifuged for 10 min at 1500 rpm and diluted in the lysis solution containing PI (0.1% Triton X-100 and 2 μ g ml⁻¹ propidium iodide in PBS) in the absence of light at 37 °C. After 30 min, the samples were acquired on a LSRFortessa flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed by FlowJo v.10 software (Tree Star).

Analysis of mitochondrial membrane potential

To determine the effect of the compound on mitochondrial membrane potential, *L. amazonensis* promastigotes were treated with 9.0 and 4.5 μ M of BA5 for 72 h. After the treatment, parasites were incubated with 10 μ g/mL of rhodamine 123 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) for 15 minutes. Methanol was used as negative control. Data acquisition was

performed using a LSRFortessa flow cytometer and the analysis was performed by FlowJo v.10 software.

Scanning microscopy electronic

L. amazonensis promastigotes (1×10^7) were treated with three concentrations from the IC_{50} values (2.25; 4.5 and 9.0 μM) of BA5 for 48h at 26°C. The parasites were fixed in a 2% glutaraldehyde solution and 0.1M sodium cacodylate buffer for 2 hours at room temperature. After fixation, the cells were post-fixed in osmium tetroxide (1%) for 1 hour at room temperature. The parasites were placed on glass cover slips with 0.01% poly-L-lysine, dehydrated in graded ethanol (30 to 100%) and submitted at critical point (replacement of ethanol by CO_2) LEICA CPD 030. Samples were metalized with gold and observed in the scanning electron microscope JEOL JSM-6390LV.

Drug combination assay

Isobolograms were constructed by the fixed ratio method. Serial double dilutions were performed in triplicate in ratios of 1:1 and 10:1, BA5 and amphotericin B, respectively, using *L. amazonensis* promastigotes. For each proportion, an IC_{50} value was calculated for each drug and combination. The fractional inhibitory concentrations (FIC) were calculated by [IC_{50} when combined / IC_{50} isolated drug]. The FIC values of different ratios were used to construct the isobologram in Graph Pad Prism version 5.01 program (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

Statistical Analysis

One-way analysis of variance and Newman-Keuls multiple comparison tests were employed by using Graph Pad Prism version 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA, United States). Differences were considered significant when the values were of $p < 0.05$.

Results

Cytotoxicity and activity of BA5 against promastigote forms

Betulinic acid and BA5 derivative presented CC_{50} values of 18.8 and 31.1 μM , respectively. Amphotericin B, the reference drug in the leishmaniasis treatment, presented CC_{50} value of 3.3 μM . These data indicate that betulinic acid and BA5 are less cytotoxic than amphotericin B and gentian violet ($CC_{50} = 0.5 \mu\text{M}$), a known cytotoxic drug (Table 1). The effect of BA5 on promastigote forms of leishmania was evaluated against different species of leishmania at six different concentrations, ranging from 1.56 to 50 μM . As show in the Table 1, BA5 was effective against all tested species. After 72 h of incubation, BA5 inhibited *L. amazonensis* promastigote proliferation with an IC_{50} of $4.5 \pm 1.1 \mu\text{M}$; *L. major* ($IC_{50} = 3.0 \pm 0.8 \mu\text{M}$), *L. braziliensis* ($IC_{50} = 0.9 \pm 1.1 \mu\text{M}$) and *L. infantum* ($IC_{50} 0.15 \pm 0.05 \mu\text{M}$). In addition, BA5 was 6.9 times more selective (IS) for *L. amazonensis* promastigotes, 10.4 times more selective for *L. major*, 34.5 more selective for *L. braziliensis* and 207 more selective for *L. infantum*. Furthermore, IC_{50} value and IS of BA5 was better for *L. braziliensis* than amphotericin B. Betulinic acid exhibited little or no activity against promastigote forms of different species of leishmania. This prototype was not selective for *L. amazonensis* (IS = 0.66) and *L. braziliensis* (IS = 1.1) (Table 1).

BA5 reduces the infection of macrophages by L. amazonensis

The BA5 demonstrated an important activity against intracellular parasites at early stages of infection. This molecule promoted a significant decrease in the percentage of infected cells and in the number of intracellular parasites 24 h after treatment (Figure 1A and B, respectively). As shown in Figure 2, BA5 decreased the number of infected cells and intracellular parasites by more than 99% and presented an IC_{50} value of $4.1 \pm 0.7 \mu M$ when compared to untreated control. Amphotericin B exhibits an IC_{50} value of $0.05 \pm 0.02 \mu M$. The prototype BA reduced the number of intracellular forms per macrophage (32.5%) only in the highest concentration tested (Figure 1).

Ultrastructural alterations in BA5-treated leishmania

After determining the activity against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania sp.*, assays were performed to elucidate a possible mechanism of action of the BA5. First, ultrastructural analysis by scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the morphology of *L. amazonensis* promastigotes treated or not with BA5. Untreated promastigotes had the typical elongated shape of the parasite without visible alterations in the plasma membrane or in cell volume (Figure 3A). However, parasites treated for 48 h with BA5 (2.2, 4.5 or 9.0 μM) presented membrane protrusions resembling surface blebs (Figure 3B), flagella damage, increase in size (Figure 3C), and body deformation (Figure 3D).

BA5 induces phosphatidylserine externalization in L amazonensis promastigotes

To understand the mechanism by which compound BA5 causes parasite death, promastigotes were double-stained with Annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) for flow cytometry analysis. Untreated cells were Annexin-V and PI-negative, demonstrating cell viability. The percentage of promastigotes positive only for annexin-V was 27.3%

after treatment with half IC_{50} value of BA5, 51.25% when cells were treated with the IC_{50} value of BA5 and 54.45% when cells were treated with two times the IC_{50} of BA5, which suggests that these cells were in the early stages of apoptosis-like death. No significant difference in the number of necrotic cells was observed (Figure 4).

BA5 acts independently of mitochondrial membrane depolarization

To better understand the pathways that lead to cell death of the parasite treated with BA5, the mitochondria potential was evaluated. The mitochondrial membrane potential of *L. amazonensis* promastigotes was measured by marking the parasites with rhodamine 123, after treatment with BA5. As shown in figure 5, the intensity of rhodamine 123 was not significantly altered by incubation with BA5 at IC_{50} values and two times the IC_{50} concentration of the drug.

BA5 induces cell cycle arrest in L. amazonensis promastigotes

Flow cytometric analysis after cell permeabilization and labelling with PI was used to quantification of nuclear DNA of parasites. Promastigotes of *L. amazonensis* treated with BA5 and amphotericin B with IC_{50} and 2x IC_{50} values were marked with PI and analyzed by flow cytometry. Figure 6 shows the distribution of cellular DNA through the cell cycle of the parasites in the absence and presence of the tested compounds. After 24 hours of incubation, the cell cycle arrest in the pre phase G0/G1, accompanied by an increase in G1 phase at both concentrations tested.

Synergistic effects of BA5 and amphotericin B

The antileishmanial effect of the combination of BA5 and amphotericin B was investigated on promastigote forms of *L. amazonensis*. The combination of the drugs

reduced the IC_{50} values of amphotericin B by seven times and decreased the IC_{50} values of BA5 by 50 times compared to each drug separately. The combination index values ($0.15 \pm 0.09 \mu M$) associated with a concave isobologram revealed that BA5 and amphotericin B have synergistic effects (Figure 7).

Discussion

The search for molecules of natural origin has intensified and played an important role in the development of new drugs.¹⁵ Betulinic acid is a molecule in the class of lupane-type pentacyclic triterpenes found in all parts of higher plants. This molecule has a vast number of activities described in the literature, such as antitumor, antimalarial, anti-HIV, analgesic, anti-inflammatory and bactericidal.¹⁶⁻¹⁹ Some studies show that structural substitution in the carboxyl group can generate more potent molecules than the prototype, aiming at different pharmacological targets.²⁰⁻²⁵

Recent work from our group reported that the insertion of amines at C-28 in BA increased the anti-*T. cruzi* activity by inducing ultrastructural changes in the parasite.¹³ Here, we investigated the activity of BA5 against promastigotes of different species of leishmania causative of cutaneous and visceral forms of the disease (*L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum chagasi*) and amastigotes of *L. amazonensis*, as well as the mechanisms of action against this specie of parasite.

Structural changes in betulinic acid prototype are associated with reduction in the cytotoxicity of the new compounds.^{13,26,27} Corroborating with these studies, we observed that the BA5 derivative is less cytotoxic ($CC_{50} = 31.1 \mu M$) than their prototype ($CC_{50} = 18.8 \mu M$). Furthermore, BA5 was less cytotoxic than amphotericin B ($CC_{50} = 3.3 \mu M$). These data reinforce the importance of structural chemical modifications in reducing

cytotoxicity and enhancing the practical applicability of the compounds in medicinal chemistry.

Few studies report the activity of betulinic acid derivatives against *Leishmania sp* promastigotes²⁸⁻³⁰. Heterocyclic derivatives of betulinic acid showed activity against *L. donovani* with IC₅₀ values of 8.9 to 30 μ M and carbamate derivatives against *L. infantum* with IC₅₀ values of 25.8 μ M.^{29,11} Dominguez-Carmona *et al.*, 2010, reported activities of an acetate derivative against *L. amazonensis* (IC₅₀ = 44.9 μ M).³⁰ In our study, the addition of amines in the C-28 of BA5 optimized the effects of the molecule in relation to the prototype and showed antileishmanial activity superior to the other triterpenes.

BA5 inhibited the macrophage infection and the number of intracellular forms of *L. amazonensis* with selectivity index (SI) values of 7.5. SI value is calculated by the ratio between CC₅₀ value of macrophages and IC₅₀ value of parasites. It is suggested that the higher SI, more effective and safer a drug would be during *in vivo* treatment.³¹ BA5 showed high selectivity for the parasite, however, the SI of amphotericin was higher. Amphotericin B has an elevated cost, is highly toxic and its use requires hospitalization of patients. Furthermore, amphotericin B is a drug with difficult structural changes in the molecule,³² whereas BA5 is a prototype whose selectivity can be increased with conformational alterations.³³

Treatment with alkaloid derivatives of the betulinic acid reduced in 83% the number of infected macrophages by *L. amazonensis*. However, the concentrations of the drug used in this assay were high, with an IC₅₀ value of 210 μ M.³² Other study related a reduction in the number of macrophages infected by *L. major* (81%) when treated with nanoparticle-loaded betulinic acid, improving its activity and reducing toxic effects.²⁶ Preliminary results from our research group demonstrate that BA5 reduced, in a concentration-dependent manner, not only the proliferation of *L. infantum* promastigotes,

but also the proportion of infected J774 macrophages and the number of parasites per infected macrophage 24 h after treatment ($IC_{50} = 2.6 \pm 4.4 \mu M$).

Apoptosis is an important event in the context of the host's immune response and in the successful establishment of infection by leishmania. The survival of these parasites within macrophages is a crucial issue in the pathogenesis of the disease in the mammalian host.³⁴

Despite being an event markedly of multicellular organisms, currently, there are studies in the literature that suggest a mechanism similar to apoptosis in single-celled eukaryotes.

In trypanosomatids, regulated cell death is shown to be advantageous to prevent the activation of the immune system and, therefore, the survival of intracellular parasites.³⁵

Flow cytometry analysis demonstrated that BA5 acts to induce cell death by apoptosis in parasites. These data were confirmed when we evaluated the morphology of the parasites treated with BA5. Similar morphological changes such as flagellar damage, appearance of blebs and increase in the size of the parasite have previously been associated with induced apoptotic death. Some changes were seen in the same species of parasites treated with a series of triazine hybrids and with a calpain inhibitor.^{35,36} In addition, the treatment of promastigotes of *L. amazonensis* with BA5 induce changes in the cell cycle of the parasites with arrested in the G0/G1 phase and a significant decrease in population of cells in G2/M. Together, these results suggest that BA5-induced apoptosis may have led to DNA degradation.

Mitochondria play an important role in cell death by apoptosis.³⁷ Rhodamine 123 is a cationic lipophilic dye that is readily sequestered by active mitochondria without cytotoxic effects. Additionally, this dye can be used to assay mitochondrial membrane potential in populations of apoptotic cells.^{38,39} Reports indicate that the mitochondria is a good indicator of structural changes in the kinetoplastid parasite.^{40,41} To elucidate the mechanism of cell death possibly induced by BA5, we evaluated the potential of

mitochondrial membrane. BA5 did not induce alterations in membrane potential in *L. amazonensis* promastigotes, suggesting that the action of the compound is independent of this pathway.

Drug combination is an alternative applied in the clinic for treatment of leishmaniasis that have advantages over current monotherapy. Amphotericin B is a second-choice drug for the treatment of leishmaniasis in many places around the world. Combined drug therapy can be an important tool for reducing toxic effects, as well as reducing the duration of treatment and improving treatment compliance by the patient.³⁴ In this regard, some studies were carried out with the aim to associating promising compounds to amphotericin B.³⁵⁻⁴¹ In this work, BA5 demonstrated to increase the activity of the reference drug (CI= 0.15; synergistic). Our research group also reported the activity of BA5 increasing the immunosuppressive effect of dexamethasone.⁴² In addition, a recent clinical trial evaluating the use of liposomal amphotericin B associated with miltefosine is in phase II, however, toxicity is still a challenge.^{43,44}

This work showed that BA5 has antileishmanial activity against different species responsible for cutaneous and visceral leishmaniasis. This is the first report demonstrating that BA5 presents low cytotoxicity, activity against parasitic proliferation and macrophage infection by leishmania *in vitro*. Although its mechanism of action still needs further evaluation, it was found that BA5 promotes cell death due to apoptosis and arrest the cell cycle progression, acting in a different way than mitochondrial membrane depolarization. Therefore, BA5 may be a suitable candidate for antileishmanial drug development, alone or in combination with other drugs.

References

- 1 Alvar J, Velez I, Bern C *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* 2012; **7**: 35671.
- 2 World Health Organization. Neglected Diseases: Leishmaniasis. http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/.
- 3 Schreifer A, Souza R, Guimarães L *et al.* Papel do parasita e do hospedeiro na expressão clínica das leishmanioses. *Gazeta Médica da Bahia* 2005; **1**:75.
- 4 Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. In: *Advances in Applied microbiology*. Academic Press 2013; 155-184.
- 5 BRASIL. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- 6 Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 2004; **27**: 305-318.
- 7 Romero AH, Lopez SE. In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalazinyl-hydrazones on selected *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* enzyme targets. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2017; **76**:313-329.
- 8 Tiwari N, Gedda M, Tiwari V *et al.* Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2018; **18**:26-41.
- 9 Chen Z, Wu Q, Chen Y *et al.* Effect of betulinic acid on proliferation and apoptosis in Jukart cells and its mechanism. *Zhonghua ZhongLiu ZaZhi [Chinese journal of oncology]* 2008; **30**:588-592.
- 10 Innocente A, Silva G, Cruz L *et al.* Synthesis and antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. *Molecules* 2012; **17**:12003-12014.
- 11 Sousa M, Varandas R, Santos R *et al.* Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: synergic effects with miltefosine. *PLoS One* 2014; **9**: e89939.
- 12 Yogeeswari P, Sriram D. Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties. *Current Medicinal Chemistry* 2005; **12**: 657-666.
- 13 Newman J, Cragg G. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod* 2016; **79**: 629-661.
- 14 Takada Y, Aggarwal BB. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I Kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9. *J. Immunol* 2003; **17**: 3278-3286.

- 408 **15** Dehelean C, Feflea S, Ganta S *et al.* Anti-angiogenic effects of betulinic acid
409 administered in nanoemulsion formulation using chorioallantoic membrane assay. *J.*
410 *Biomed. Nanotechnol* 2011; **7**: 317–324.
- 411 **16** Ali-Seyed M, Jantan I, Vijayaraghavan K *et al.* Betulinic acid: recent advances in
412 chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising
413 anticancer therapy. *Chem. Biol. Drug Des* 2016; **87**: 517–536.
- 414 **17** Li J, Jing J, Bai Y *et al.* SH479, a betulinic acid derivative, ameliorates experimental
415 autoimmune encephalomyelitis by regulating the T helper 17/Regulatory T cell balance.
416 *Mol. Pharmacol* 2017; **91**: 464–474.
- 417 **18** Kim JY, Koo HM, Kim DS. Development of C-20 modified betulinic acid
418 derivatives as antitumor agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2001; **11**:
419 2405–2408.
- 420 **19** Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie R *et al.* Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and
421 platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV
422 activity of structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products* 1994; **57**: 243–
423 247.
- 424 **20** Krogh R, Kroth R, Berti C *et al.* Isolation and identification of compounds with
425 antinociceptive action from *Ipomea pes-caprae* (L.) R. *Br. Pharmazie* 1999; **54**: 464–466.
- 426 **21** Barbosa Filho J, Lima C, Amorim E *et al.* Botanical study, phytochemistry and
427 antimicrobial activity of *Tabebuia aurea*. *Phyton* 2004; **53**: 221–8.
- 428 **22** Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP *et al.* Betulinic acid, a natural compound with
429 potent anticancer effects. *Anti-Cancer Drug* 2010; **21**: 215–227.
- 430 **23** Chandramu C, Manohar RD, Krupadanam DG *et al.* Isolation, characterization and
431 biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytotherapy*
432 *Research* 2003; **17**: 127–134.
- 433 **24** Mehrizi T, Ardestani M, Hoseini MHM *et al.* Novel nanosized chitosan-betulinic acid
434 against resistant *Leishmania major* and first clinical observation of such parasite in
435 kidney. *Scientific reports* 2018; **8**: 1–19.
- 436 **25** Halder A, Shukla D, Das S, *et al.* Lactoferrin-modified betulinic acid-loaded PLGA
437 nanoparticles are strong antileishmanials. *Cytokine* 2018; **110**: 412–415.
- 438 **26** Mehrizi T, Khamesipour A, Ardestani, M, *et al.* Comparative analysis between four
439 model nanoformulations of amphotericin B-chitosan, amphotericin B-dendrimer,
440 betulinic acid-chitosan and betulinic acid-dendrimer for treatment of *Leishmania major*:
441 real-time PCR assay plus. *International Journal of Nanomedicine* 2019; **14**: 7593–7607.
- 442 **27** Alakurtti S, Heiska T, Kiriaziz A *et al.* Synthesis and anti-leishmanial activity of
443 heterocyclic betulin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; **18**: 1573–1582.
- 444 **28** Dominguez-Carmona DB; Escalante-Erosa F, Ruiz-Pinell G *et al.* Antiprotozoal
445 activity of betulinic acid derivatives. *Phytomedicine* 2010; **17**: 379–382.

- 446 **29** Pritchett J, Naesens L, Montoya J. Treating HHV-6 Infections. Human herpes viruses
447 HHV-6A, HHV-6B & HHV-7. *Microbiology Spectrum* 2014; **4**: 311–331.
- 448 **30** Bastos M, Boechat N, Hoelz L *et al.* Quimioterapia antileishmania: uma revisão da
449 literatura. *Rev Virtual Química* 2016; **8**: 2072-2104.
- 450 **31** Meira C, Barbosa-Filho J, Lanfredi-Rangel A *et al.* Antiparasitic evaluation of
451 betulinic acid derivatives reveals effective and selective anti-*Trypanosoma cruzi*
452 inhibitors. *Experimental Parasitology* 2016; **166**: 108-115.
- 453 **32** Moraes LS, Donza MR, Rodrigues APD *et al.* Leishmanicidal activity of (+)-
454 phyllanthidine and the phytochemical profile of *Margaritarians nobilis* (Phyllanthaceae).
455 *Molecules* 2015; **20**: 22157-22169.
- 456 **33** Vannier-Santos MA, Martiny A, De Souza W. Cell biology of *Leishmania spp.*:
457 invading and evading. *Current Pharmaceutical Design* 2002; **8**: 297-318.
- 458 **34** Aliança ASS, Oliveira AR, Feitosa APS *et al.* *In vitro* evaluation of cytotoxicity and
459 leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. *European Journal of*
460 *Pharmaceutical Sciences* 2017; **105**: 1-10.
- 461 **35** Lecouer H, Langonné A, Baux L *et al.* Real-time flow cytometry analysis of
462 permeability transition in isolated mitochondria. *Exp. Cell Res.* 2004; **294**: 106-117.
- 463 **36** Baréa P, Barbosa VA, Bidóia DL *et al.* Synthesis, antileishmanial activity and
464 mechanism of action studies of novel β -carboline-1, 3, 5-triazine hybrids. *European*
465 *Journal of Medicinal Chemistry* 2018; **150**: 579-590.
- 466 **37** Koonin EV, Aravind L. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial
467 connection. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 394–404.
- 468 **38** Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response
469 to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine
470 cytotoxicity. *J Biol Chem* 2004; **279**: 11798–11813.
- 471 **39** Marinho FA, Gonçalves KCS, Oliveira SSC *et al.* The Calpain Inhibitor MDL28170
472 Induces the Expression of Apoptotic Markers in *Leishmania amazonensis* Promastigotes.
473 *PLoS ONE* 2014; **9**: 87659.
- 474 **40** Silva DKC, Teixeira JS, Moreira DRM *et al.* *In Vitro*, *In Vivo* and *In Silico*
475 Effectiveness of Lassbio-1386, an N-acylhydrazone derivative phosphodiesterase-4
476 inhibitor, against *Leishmania amazonensis*. *Front. Pharmacol* 2020; **11**: 590544.
- 477 **41** Eischen C. M. *et al.* Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells:
478 chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood*
479 1997; **90**: 935-943.
- 480 **42** Debatin K. M. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicol. Lett.*
481 2000; **113**: 41-48.
- 482 **43** Anazetti M, Melo P. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular.
483 *Metrocamp Pesquisa* 2007; **1**: 37-58.

484 **44** Murray HW, Berman JD, Davies CR *et al.* Advances in leishmaniasis. *The Lancet*
485 2005; **366**: 1561.

486 **45** Sundar S, Mehta H, Suresh AV *et al.* Amphotericin B treatment for indian visceral
487 leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clinical Infectious Diseases* 2004;
488 **38**: 377.

489 **46** Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of
490 Leishmaniasis. *Control of Human Parasitic Diseases* 2006; 223–274.

491 **47** Meira C, do Espirito Santo R, dos Santos T *et al.* Betulinic acid derivative BA5, a dual
492 NF- κ B/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity.
493 *European journal of pharmacology* 2017; **815**: 156-165.

494 **48** Roatt B, De Oliveira J, De Brito R *et al.* Recent advances and new strategies on
495 leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020; **104**: 8965-8977.

496 **49** DNDI. Drugs for Neglected Diseases Initiative. R&D portfolio in review:
497 Leishmaniasis. <https://dndi.org/news/2020/leishmaniasis-rnd-portfolio-update>.

499 **Transparency declarations**

500 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or
501 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

503 **Funding**

504 This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento
505 Científico e Tecnológico (CNPq); Programa de apoio a Núcleos de Excelência
506 (PRONEX); and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Tables

Table 1. Cytotoxicity evaluation, antileishmanial activity against promastigote forms of *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum* and selectivity index.

Compounds	Mammalian cells			Leishmania promastigotes					
	CC ₅₀ ± S.D. (μM)	IC ₅₀ ± S.D. (μM)	S.I.	IC ₅₀ ± S.D. (μM)	S.I.	IC ₅₀ ± S.D. (μM)	S.I.	IC ₅₀ ± S.D. (μM)	S.I.
	Macrophages	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. major</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. infantum</i>	
BA	18.8 ± 0.1	29.2 ± 0.9	<1	>100	<1	16.3 ± 1.3	1.1	>100	<1
BA5	31.1 ± 1.2	4.5 ± 1.1	6.9	3.0 ± 0.8	10.4	0.9 ± 1.1	34.5	0.15 ± 0.05	207
Amphotericin B	3.3 ± 0.50	0.09 ± 0.02	36.6	0.2 ± 0.005	16.5	1.3 ± 0.09	2.5	0.0002 ± 0.0001	>1000
Gentian violet	0.3 ± 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

CC₅₀: drug concentration that reduces cell viability by 50%; IC₅₀: drug concentration that reduces the number of parasites by 50%. IC₅₀ values for intracellular parasites were determined after 24 h. N.D.: Not determined; S.D.: Standard deviation.; S.I.: Selectivity Index. Values are means ± SD of three independent experiments performed in triplicate.

Table 2. Cytotoxicity evaluation, inhibitory concentration for 50% of intracellular parasites forms and selectivity index.

Compounds	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	S.I.
	Macrophages	<i>L. amazonensis</i> (intracellular parasites))	
BA	18.8 ± 0.1	> 200	<1
BA5	31.1 ± 1.2	4.1 ± 0.7	7.5
Amphotericin B	3.3 ± 0.50	0.05 ± 0.02	66.0
Gentian violet	0.3 ± 0.01	N.D.	N.D.

CC₅₀: drug concentration that reduces cell viability by 50%; IC₅₀: drug concentration that reduces the number of parasites by 50%. IC₅₀ values for intracellular parasites were determined after 24 h. N.D.: not determined; S.D.: Standard deviation.; S.I.: Selectivity Index. Values are means ± SD of three independent experiments performed in triplicate

Table 3. Concentration reductions and combination rates by BA5 and amphotericin B on *L. amazonensis* promastigotes.

Compounds	IC ₅₀ ± S.D. (μM)		CI**
	Drug alone	Combination	
BA5	4.50 ± 1.1	0.09 ± 0.01	0.15 ± 0.09
Amphotericin B	0.09 ± 0.02	0.012 ± 0.006	

*IC₅₀ values were calculated using quadruplicate concentrations and two independent experiments were performed; ** Combination index (CI). Cut: CI value of 0.1–0.7, synergism; 0.7–0.85, moderate synergism; 0.85–0.9, slight synergism; 0.9–1.1, additivity; > 1.1, antagonism. S.D. = Standard Deviation.

Figure Legends

Figure 1. *In vitro* effects of BA and BA5 against intracellular parasites of *L. amazonensis*. Peritoneal macrophages of BALB/c mice were infected with promastigotes of *L. amazonensis* at stationary phase (10:1) and were treated with BA or BA5 for 24 hours. The percentage of infection (a) and the number of intracellular parasites per 100 macrophages (b) were determined after 24 hours of treatment by count on optical microscope. Amphotericin B was used as positive control. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

Figure 2. Peritoneal macrophages infected by *L. amazonensis* and treated after 24 hours with BA5. (a) untreated control (b) Treatment with BA at 9.4 μM (c) BA5 at 15.5 μM (d) amphotericin B at 1.5 μM . 1000x magnification; Leica Microsystems.

Figure 3. Scanning electron microscopy (SEM) analysis of promastigotes of *L. amazonensis* incubated with BA5. (a) Untreated control cells with normal morphology, (b) parasites treated with $\text{IC}_{50}/2$ value of BA5 exhibited membrane protrusions resembling surface blebs, (c) parasites treated with IC_{50} value of BA5 presented flagella damage and edema, (d) parasites treated with twice the IC_{50} showing body deformation.

Figure 4. Cell death pattern by flow cytometry. *L. amazonensis* promastigotes were treated with BA5 and incubated with propidium iodide (PI) and annexin V after 48 h of incubation. (a) Untreated promastigotes (b) promastigotes treated with 2.2 μM of BA5 (c) promastigotes treated with 4.5 μM of BA5 (d) promastigotes treated with 9.0 μM of BA5 (E) Percentage of stained cells for annexin V after 48h of treatment with BA5. Values represent the means $\pm$ S.E.M. of three determinations obtained in one of two experiments performed. ** $P < 0.01$ compared to stimulated and untreated cells.

Figure 5. Mitochondrial membrane potential of *L. amazonensis* promastigotes incubated with BA5. Promastigotes were incubated or not with BA5 at concentrations of IC_{50} and $2x IC_{50}$ and amphotericin B (IC_{50}). Meth: Methanol, was used as positive control. After 72 h of incubation, parasites were marked with rhodamine123.

Figure 6. Analysis of cell cycle progression after treatment with BA5 using propidium iodide by flow cytometry. The distribution and percentage of parasites in pre-phase G0, G1, S and G2/M phase of the cell cycle are indicated. A significant increase in population of cells in pre-phase G0 and a significant decrease in population of cells in G2/M were observed in cells treated with IC_{50} value (b), and $2x IC_{50}$ value (c) concentrations of BA5, compared to untreated control (a). (e) A significant increase in population of cells in G0/G1 and a significant decrease in population of cells in G2/M. Values represent the means $\pm$ S.E.M. of three determinations obtained in one of two experiments performed. *** $P < 0.001$ compared to stimulated and untreated cells.

Figure 7. Isobologram describing the synergistic effects between BA5 and amphotericin B on *L. amazonensis* promastigotes. Broken lines correspond to the predicted positions of the experimental points for additive effects.

Figures

Figure 1

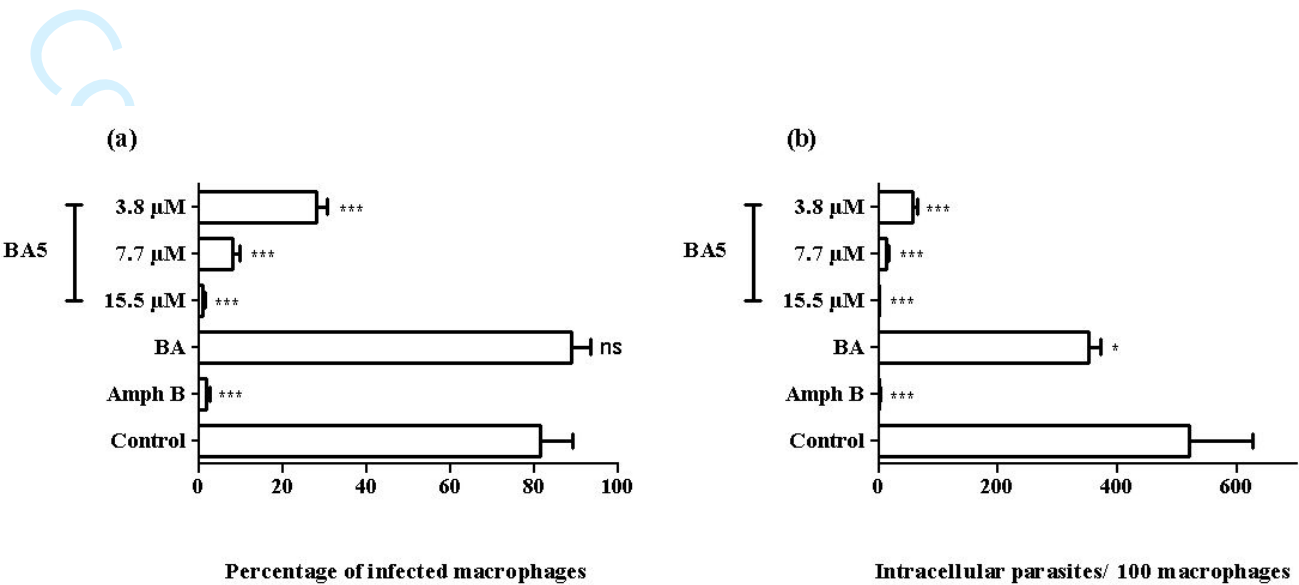


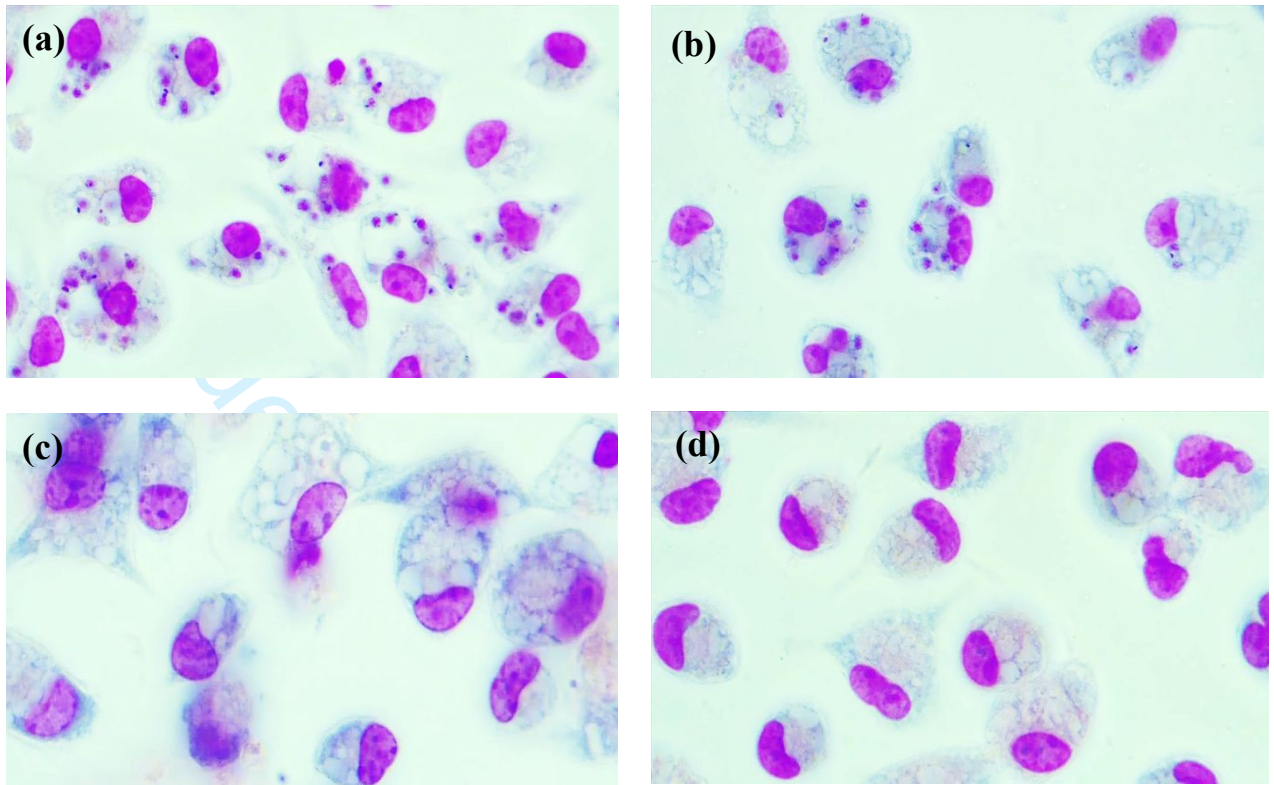
Figure 2

Figure 3

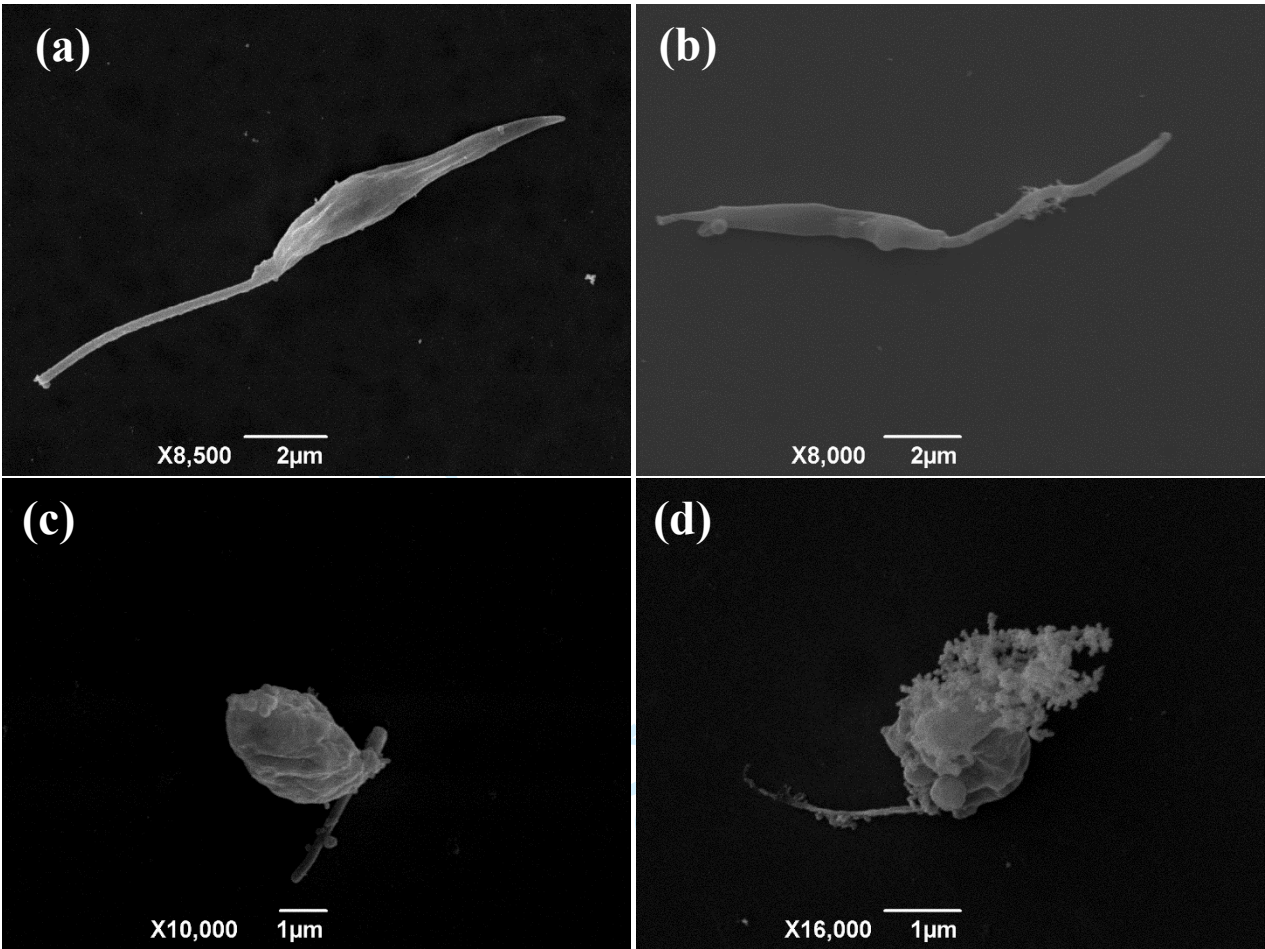


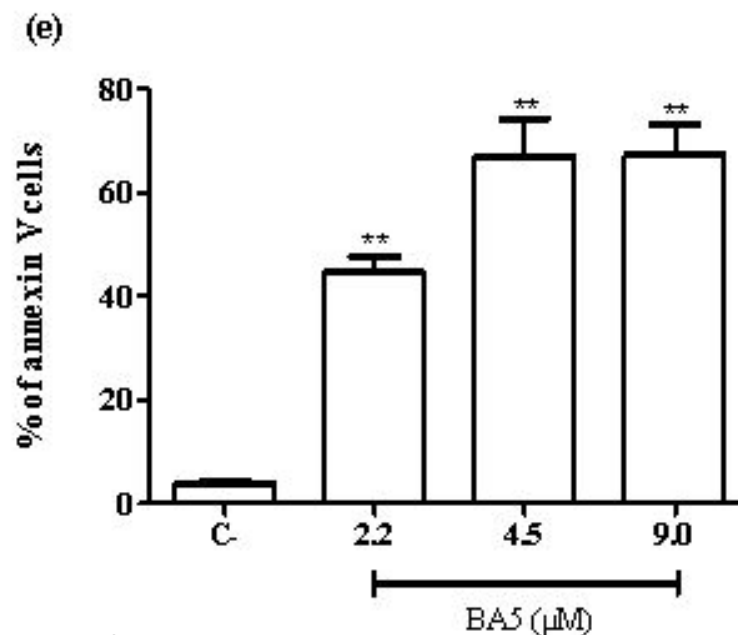
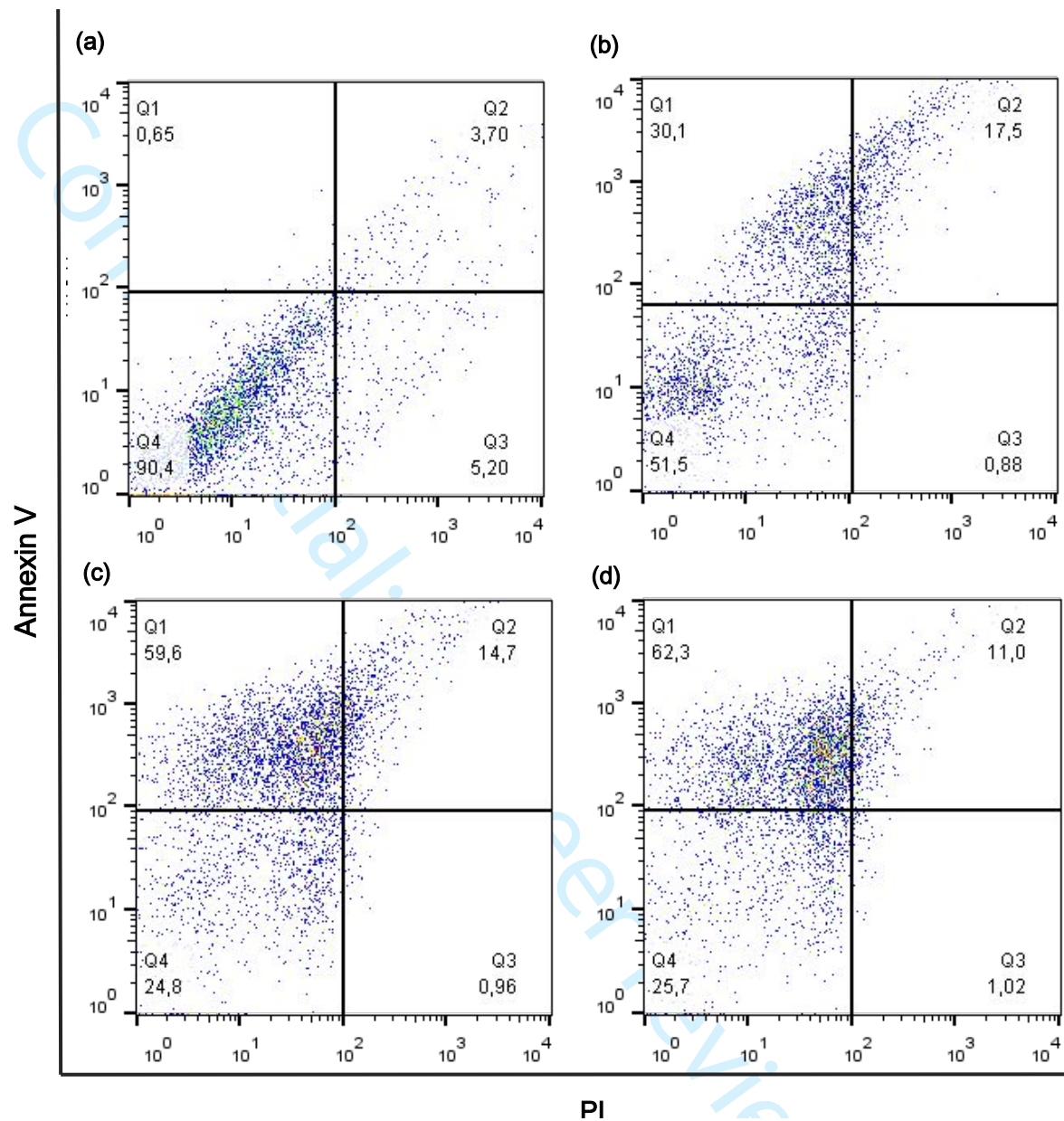
Figure 4

Figure 5

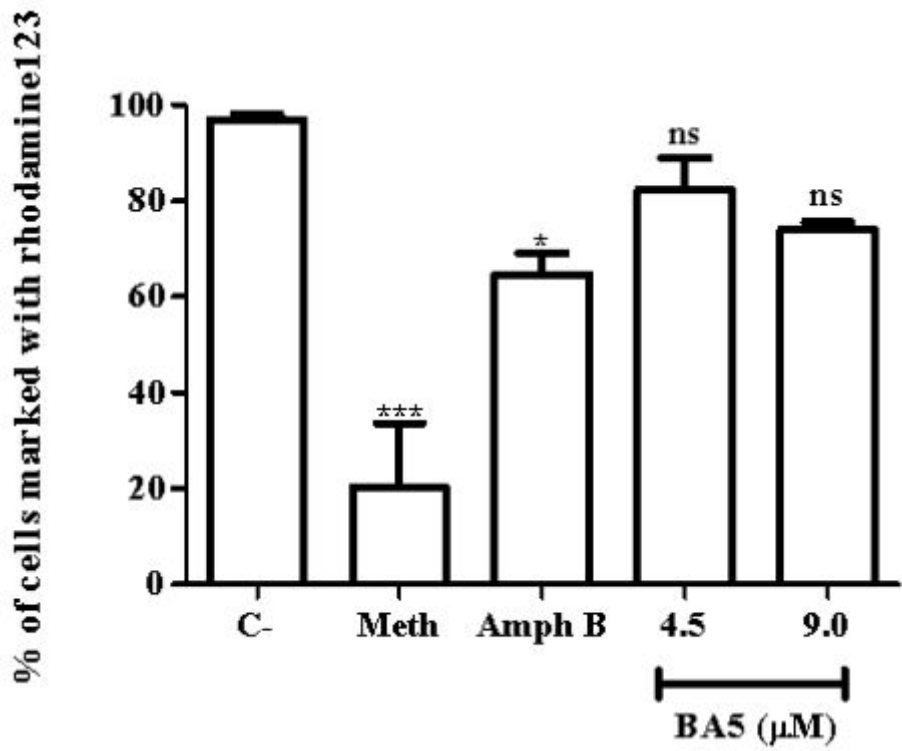


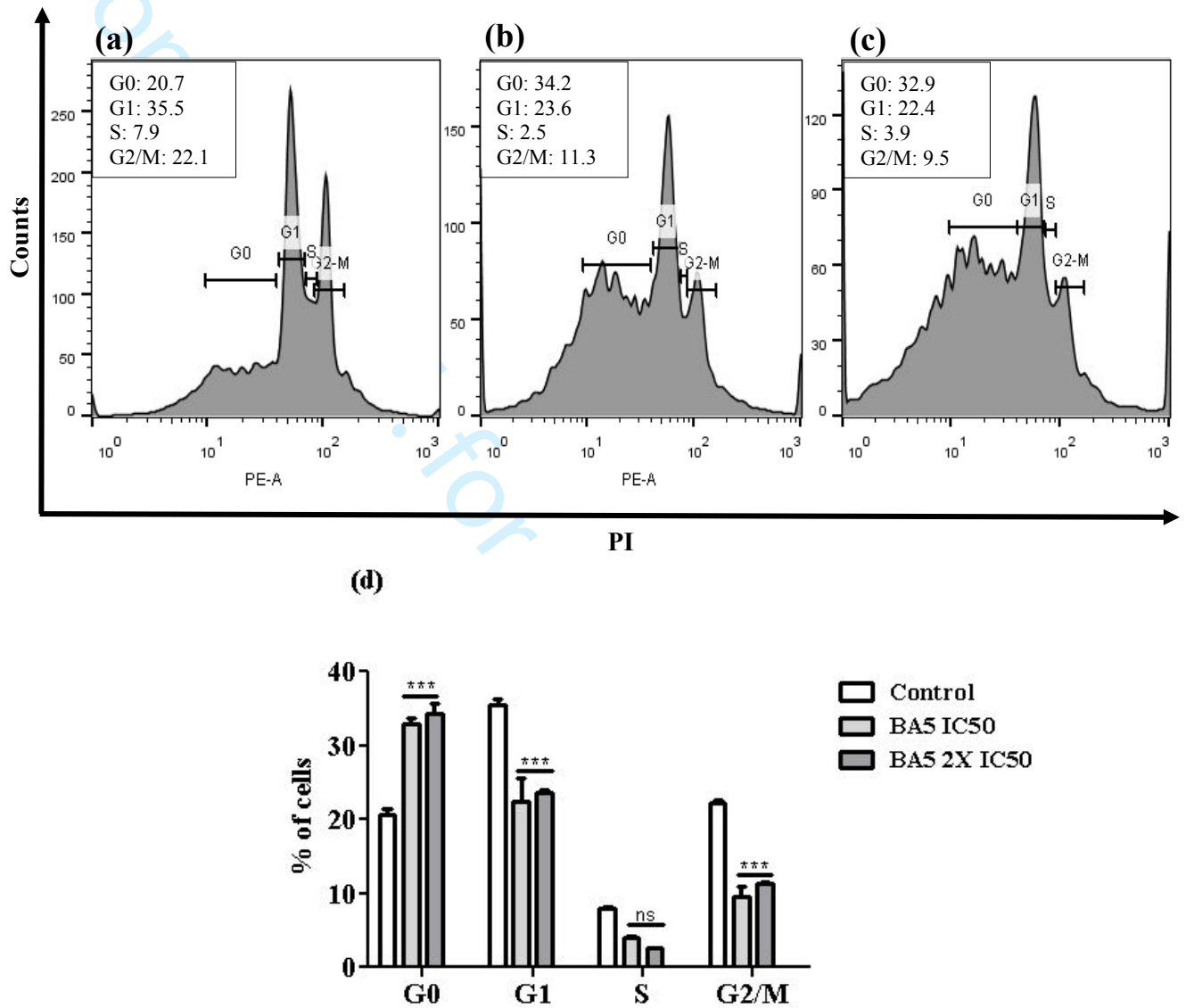
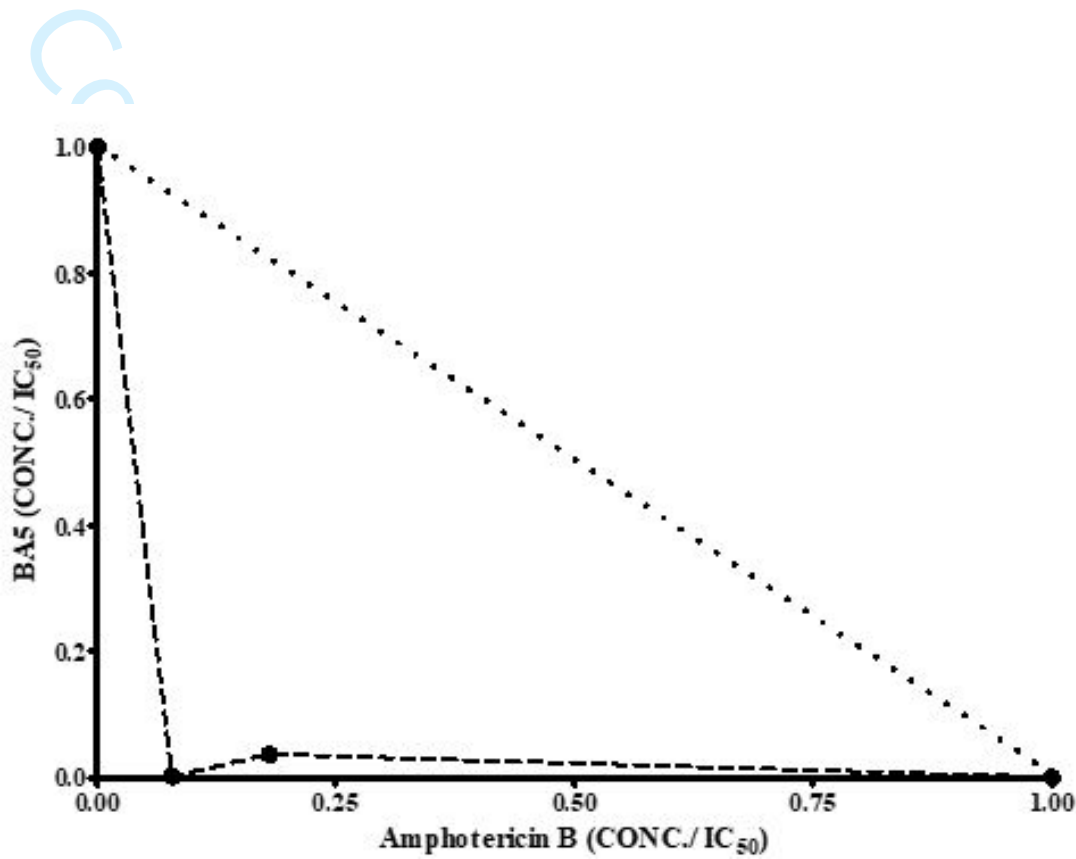
Figure 6

Figure 7



ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF THE BRAZILIAN
CHEMICAL SOCIETY



Phytochemical Analysis, Multi-Element Composition and Biological Activities of Extracts and Lupenone from *Albizia inundata* (Mart.) Barneby & J.W.Grimes

Eberson M. J. Andrade,^a Jéssica S. Teixeira,^{b,c} Dahara K. C. Silva,^{b,c} Tatiana B. dos Santos,^{b,c} Maria G. A. Korn,^d Hugo N. Brandão,^e Caline G. Ferraz,^f Cássio S. Meira,^e Milena B. P. Soares,^e Elisava T. Guimarães,^{b,c} Lourdes C. S. Neta^a and Aníbal F. S. Júnior^{*,a,b}

^aDepartamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade do Estado da Bahia, 41195-000 Salvador-BA, Brazil

^bDepartamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, 41195-000 Salvador-BA, Brazil

^cInstituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 40296-710 Salvador-BA, Brazil

^dInstituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 40170-115 Salvador-BA, Brazil

^eDepartamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana-BA, Brazil

^fCentro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 41195-001 Cruz das Almas-BA, Brazil

In this study, antimicrobial activity of extracts and lupenone from *A. inundata* (Fabaceae, Mimosoideae), were tested. In addition, the multi-element composition of the leaves, bark and stems (heartwood) of *A. inundata* was evaluated using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). Lupenone was isolated in the petroleum ether extract of leaves, for the first time. Biological assays were conducted to evaluate the antimicrobial (antibacterial, antifungal and antiparasitic) of extracts, their fractions and lupenone. The results showed antimicrobial and antileishmanial activity of these compounds, which may be useful for obtaining a chemical composition and biological activity database on *Albizia* species. For multi-element composition, we found the mean concentrations (minimum-maximum) of Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, V and Zn in the samples ranged between 0.06 and 265.41 $\mu\text{g g}^{-1}$. Concentration ranges of Cu, Fe, Mn and Zn are large, which makes these samples as additional sources of these macronutrients.

Keywords: *Albizia inundata*, lupenone, biological activity, multi-element composition

Introduction

The genus *Albizia* belongs to the Fabaceae family, subfamily Mimosoideae, includes about 140 species, mainly woody trees and shrubs native to tropical Asia, also found in South Africa and South America.¹⁻⁴ The genus *Albizia* includes several species including the native congeners *A. hassleri*, *A. niopoides*, *A. inundata*, *A. pedicellaris*, *A. polycephala* and *A. polyphylla*, distributed throughout Brazil, recommended for the reforestation of areas degraded by have characteristics of rapid botanical growth. Some species of this genus have been reported to produce a wide

range of secondary metabolites, as triterpenoid saponins, flavonoids, alkaloids, among others.⁵ Some studies about genus *Albizia* revealed potential cytotoxic activity *in vitro* against tumor cell lines.⁶⁻¹¹

Albizia inundata (Mart.) Barneby & J.W.Grimes, known by the popular names of “tímbo-branco,” “muscovado,” “biguazeiro,” “canafístula” and “muquém,” presents a wide geographic distribution in South America, occurring naturally in Argentina, Bolivia, Brazil, Paraguay and Uruguay.¹² In Brazil, the species are native to the Amazon Region, São Francisco Valley and Pantanal Matogrossense, in riparian forests and floodplain.¹³ Previous phytochemical studies reported the isolation of oleanane triterpenoid saponins from an extract of the

*e-mail: afjunior@uneb.br

aerial parts of *Albizia inundata*, and their bioactivity against human colon cells (HCT116) and melanoma cells (B16F10 and SKMEL28).^{14,15} In literature, there are no reports of antibacterial, antifungal, antitrypanocidal and antileishmanial activities for *A. inundata*.

Chemical aspects and biological activity of *A. inundata* have been poorly explored, despite the potential of this plant as a source of bioactive compounds. *In vitro* cellular cytotoxicity assays have as main parameter to provide information on the safety of the various drugs or compounds, being the first step to evaluate the biocompatibility of any substance for the biomedical use.¹⁶

Determination of inorganic components in medicinal plants is of great interest because chemical elements can be catalysts of biochemical reactions in plants and to influence in their therapeutic action on the human health.^{17,18} Most multi-element analysis, in biological samples, require pretreatment of the samples prior to quantification by analytical techniques, such as, inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES); inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS); atomic absorption spectrometry with graphite furnace (GF AAS), flame (FAAS) and hydride generation (HG AAS).¹⁹⁻²³ ICP OES is a sensitive multi-element technique, used in the analysis of biological samples due to its advantages, which consists of the quantification of elements through the emission of electromagnetic radiation, generated from the excitation of their atoms or ions.²⁴ In the literature, there are no reports of macro and micronutrient evaluation in species of the genus *Albizia*, which may contribute to the knowledge of their inorganic constituents.

In this study, lupenone was isolated in the petroleum ether extract of leaves from *Albizia inundata* (Mart.) Barneby & J.W.Grimes, for the first time, by chromatographic techniques and identified by one-dimensional nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C NMR). For evaluation of antimicrobial activities (antibacterial, antifungal and antiparasitic) of extracts and lupenone from *A. inundata*, biological assays and ultrastructural analysis were conducted. In addition, ICP OES was used for multi-element analysis in aerial parts of *A. inundata*. This work is relevant to expand the studies about chemical and biological potential of this species and to evaluate the multi-element composition of the leaves, bark and stems (heartwood) of *A. inundata*.

Experimental

Plant materials and preparation of plant extracts

The aerial parts of *Albizia inundata* (Mart.) Barneby & J.W.Grimes were collected near the Bahia State

University, Juazeiro, Bahia, 368 m above sea level, with geolocation: S 9°25'13.2"; W 40°29'10.1" (−9.420346, −40.486145), on 19 February 2016, during the period of plant harvesting. The plant material was identified and specimen voucher No. 61231 was deposited at the Herbarium Radambrasil GRN/Ba, Salvador, Bahia, Brazil. The activity of access to the genetic heritage was registered (Registration No. A624ED2) in the National General Heritage Management and Associated Traditional Knowledge Management System (SisGen), in Brazil.

Dried aerial parts, leaves (574.80 g); stems (405.28 g) and stem bark (1004.70 g) of *A. inundata* were ground and cut (stem/core) into small pieces, with a knife mill (Marconi-MA680; Macro Vertical Rotor Mill with fixed and mobile knives, Piracicaba, Brazil) and subjected to the successive extraction by the maceration process with petroleum ether, hexane and methanol (Vetec and Synth, analytical grade, São Paulo, Brazil), with three successive exchanges for each solvent, every 72 h. After, the solvents were removed using a rotary evaporator under reduced pressure (IKA® RV 10 digital, IKA® HB 10 Basic, Rio de Janeiro, Brazil), at a temperature of 30-55 °C, to obtain the respective crude methanolic extracts: leaves (EML), stem bark (SMSB), stem (SEM), and petroleum ether of the leaves (EPEL), with 12.0, 3.30, 2.09 and 3.14% yield, respectively.

General experimental procedures

Initially, the extracts were subjected to silica gel 60 chromatography (70-230 mesh, Merck and Vetec, São Paulo, Brazil) and comparative thin layer chromatography (TLC) techniques using aluminum chromate plates coated with silica gel, 0.20 mm, with fluorescent indicator UV254/365 (Macherey-Nagel®; Merck, São Paulo, Brazil), as well as preparative thin layer chromatography (CCDP) on glass plates of size 20 × 20 cm, prepared with silica gel 60 (PF254-366, Merck, São Paulo, Brazil). All the chemical reagents used were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and were of analytical grade. The water was purified using the Milli-Q purification system from Millipore (Bedford, MA, USA).

The petroleum ether extract from the leaves (initial mass 18.03 g) of *A. inundata* was selected for continuation of the fractionation studies. The NMR spectra were obtained in Agilent DD2 (Santa Clara, CA, USA) spectrometers operating at 500 MHz (¹H) and, 75 and 125 MHz (¹³C). The samples were solubilized in deuterated chloroform (CDCl₃), having the internal reference standard (δ = 0 ppm), tetramethylsilane (TMS) for ¹H NMR and CDCl₃ for ¹³C

NMR. Chemical shifts were expressed in ppm values (δ) given in relation to TMS. The coupling constants (J) were measured in hertz (Hz).

Lupenone isolation

EPEL from *A. inundata* (18.34 g) was fractionated on a silica gel chromatographic column (CC) and eluted with solvent mixture with gradual increase of polarity (petroleum ether/ethyl acetate (9:1); petroleum ether/ethyl acetate (8:2), petroleum ether/ethyl acetate (7:3); ethyl acetate (100%); methanol (100%)) resulting in 10 fractions (EPEL1-10). The fraction EPEL3 (1.779 g) was subjected to the silica gel CC, eluted with polarity gradient (petroleum ether (100%), petroleum ether/dichloromethane (9:1); dichloromethane (100%), dichloromethane/ethyl acetate (7:3), ethyl acetate (100%), ethyl acetate/methanol (1:1); methanol (100%)), resulting in 195 fractions, after monitoring by TLC. The subfractions: EPEL3.24 (42.7 mg), EPEL3.28 (58.3 mg) and EPEL3.29 (34.5 mg) were subjected to preparative TLC eluted with (hexane/chloroform/ethyl acetate (10: 0.5:0.4); hexane/dichloromethane/ethyl acetate (11:0.5:0.5) (2 $\times$)) and (hexane/chloroform/ethyl acetate (11: 0.5: 0.4) (3 $\times$)), respectively. The subfractions obtained F3.24.4 (5.2 mg), F3.28.3 (3.9 mg) and F3.29.3 (2.0 mg) resulted in lupenone.

Test microorganisms

Bacteria and fungi were obtained from André Tosello Tropical Research and Technology Foundation (Campinas, Brazil) and were as follows: Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538); Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 94863, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14028 and *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028) and fungus *Candida albicans* ATCC 18804. The fungi were cultivated in Malte Agar (for filamentous fungi) and yeast + Malt Agar (for non-filamentous fungi) medium for 72 h, at 26 °C and bacteria in Nutrient Agar medium for 24 h, at 36 °C.

L. amazonensis (MHOM/BR88/BA-125 Leila strain) promastigotes were cultivated in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium or Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco Invitrogen Co., Tastrup, Denmark), 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of gentamicin (Life, Carlsbad, CA, USA), pH 7.2, at 26 °C. The parasites were counted daily using Neubauer chamber, during five days. Upon reaching the stationary phase of growth, new *in vitro* passages of the parasites were performed. The infectivity of the parasites was maintained through passages in BALB/c mice. All

animal experiments and procedures were approved by the institution's committee on the ethical handling of laboratory animals (approved No. L-IGM-004/2019).

Bloodstream trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Y strain) were obtained from supernatants of LLC-MK2 cells previously infected and maintained in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% FBS, and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicin at 37 °C and 5% CO₂.

Antibiotic and antifungal tests

Broth microdilution method was used for determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) according to the technical standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute, with modifications.^{25,26} This broth microdilution assay was performed under aseptic conditions using a sterile 96 well plate. Stock solutions of the extracts in petroleum ether, fraction EPEL10, and methanol from the leaves, stems and stem bark were prepared in the dimethyl sulfoxide (DMSO) in the concentration of 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (lupenone of 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The final concentrations of the extracts and fraction EPEL10 were tested in the range of 500 to 3.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the lupenone in the 100 to 0.78 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The positive controls used were, respectively: benzylpenicillin (1 mg mL⁻¹) for Gram-positive bacteria, geramycin (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for Gram-negative bacteria and ciclopirox olamine (400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for fungus. The inoculum preparation was performed based on turbidity (0.5 on the McFarland scale, approximately 1.5 $\times 10^8$ colony-forming unit (CFU) mL⁻¹). The fungi were incubated for 72 h at 26 °C and bacteria in 24 h at 36 °C. The MIC was determined as the lowest concentration capable of visually inhibiting the growth of the microorganisms. The experiment was performed in triplicate. The assay to obtain the minimal microbicidal concentrations (MBC, for bacteria and MFC, for fungus) were conducted according to Souza-Neta and co-workers,²⁶ without modifications.

Viability assay against promastigotes forms of *L. amazonensis*

Promastigotes of *L. amazonensis* (1 $\times 10^6$ per well) were cultivated in a 96-well plate containing Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% FBS (Gibco Invitrogen Co., Tastrup, Denmark) and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicin (Life, Carlsbad, CA, USA). Promastigotes were treated with six concentrations of lupenone diluted 1/3 (20-0.625 μM) for 72 h at 26 °C. Subsequently, 20 μL per well of AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added for 2 h. The readings were performed using a spectrophotometer at 570 and

600 nm wavelengths. The percent inhibition of the axenic culture was determined based on the untreated control. The inhibitory concentration for 50% (IC₅₀) was calculated based on the percent inhibition of parasite growth, related to negative controls, and accessed through concentration logarithm values followed by nonlinear regression curve fit.

In vitro macrophage infection and treatment

To evaluate the effect of the lupenone in the intracellular amastigote form, J774 macrophages (mouse macrophage-like cell line) were cultured in 24-well plates (2×10^5 *per* well) and infected with stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis* at a ratio of 10:1, for 4 h. Infected macrophages were treated with different concentrations of lupenone for 24 h, in triplicate. Amphotericin B was used as a positive control. The cells were fixed in methanol and stained by Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The percentage of infected macrophages and the number of amastigotes by macrophages were determined by counting 100 cells *per* slides, as previously described.²⁷

Ultrastructural analysis

J774 macrophages infected with *L. amazonensis* were treated with lupenone for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After incubation, the parasites were fixed for 1 h at room temperature with 2% formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2). After fixation, the parasites were washed 4 times with 0.1 mM sodium cacodylate buffer, pH 7.2, and post-fixed with a 1% solution of osmium tetroxide (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Cells were subsequently dehydrated in increasing concentrations of acetone (30, 50, 70, 90 and 100%) for 10 min at each step and embedded in Polybed resin (PolyScience family, Warrington, PA, USA). Ultrafine sections prepared using a Leica UC7 ultramicrotome, were collected, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed under a JEOL TEM-1320 (JEOL, Tokyo, Japan) transmission electron microscope.

Trypanocidal activity

Trypomastigotes collected from the supernatants of LLC-MK2 cells were dispensed into 96-well plates at a cell density of 4×10^5 cells *per* well. Screening was performed with all the compounds in a single concentration of 25 µg mL⁻¹. The plate was incubated for 24 h at 37 °C and 5% of CO₂. Aliquots of each well were collected and the number of viable parasites, based on parasite motility,

was assessed in a Neubauer chamber. The percentage of inhibition was calculated in relation to untreated cultures. This experiment was repeated once, and benznidazole was used as the positive control.

Cytotoxicity evaluation

To determine the cytotoxicity of the extracts and lupenone, J774 cells were seeded into 96-well plates at a cell density of 1×10^4 cells *per* well in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% FBS (Gibco Invitrogen Co., Tastrup, Denmark), and 50 µg mL⁻¹ of gentamycin (Novafarma, Anápolis, GO, Brazil) and incubated for 24 h at 37° C and 5% CO₂. After that time, each test inhibitors were added at least in five concentrations, in triplicate, and incubated for 72 h. Twenty µL *per* well of AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were added to the plates during 4 h. Colorimetric readings were performed at 570 and 600 nm using a spectrophotometer. CC₅₀ values (cytotoxicity concentration at 50%) were calculated using data-points gathered from two independent experiments.

Preparation and multi-element analysis

The acid digestion of *A. inundata* samples-leaves, bark and stems (heartwood)-was performed using a commercial high-pressure laboratory microwave oven (Milestone Ethos 1600 Microwave Labstation, Sorisole, Italy) operating at a frequency of 2450 Hz, with an energy output of 900 W. This microwave digestion system was equipped with ten 100-mL tetrafluoromethoxy vessels and a ceramic vessel jacket. The maximum operating temperature and pressure were 180 °C, 1000 W and 35 bar, respectively, in 30 min. The method used to determine the mineral composition of *A. inundata* samples was quick and simple, according to Santos Jr. *et al.*:²⁸ approximately 0.25 g of each sample was inserted directly into a microwave-closed vessel and 7 mL of 65% (m m⁻¹) HNO₃ were added for 12 h in a pre-digestion at room temperature (25 °C). Then, 0.5 mL of 30% (m m⁻¹) H₂O₂ were added to each vessel and subjected to digestion. After cooling, the samples were then diluted to 10 mL. Metal contents of the final solution were determined by ICP OES.

An inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP OES, VISTA PRO, Varian-Mulgrave, Australia) with axial viewing and a solid state detector was used for the simultaneous determination of the analytes of interest (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Se, V and Zn). The optical system

was calibrated using a multi-element stock solution for ICP OES, whereas a 5.0 mg L⁻¹ Mn standard solution was used for optical alignment. The spectral lines were selected according to the absence of spectral interference and appropriate sensitivity for determining elements at high and low concentrations, by studying the emission lines of the elements to be investigated. The lines that exhibited low interference, high analytical signal and background ratios were selected. The optimized parameters of ICP OES were: radio frequency power (RF) generator power (1300 W); plasma gas rate (1.5 mL min⁻¹); auxiliary gas rate (1.5 mL min⁻¹); nebulizer gas rate (0.7 mL min⁻¹); sample uptake rate (0.8 mL min⁻¹); injector tube diameter (2.4 mm) and signal integration time (1 s). The analytical wavelengths (nm) used for multi-elemental analysis were: Al (396.152); As (188.970); Ba (493.408); Ca (317.933); Cd (228.802); Co (228.616); Cr (284.325); Cu (324.754); Fe (259.939); Hg (253.652); K (404.721); Mg (280.217); Mn (257.610); Mo (202.032); Ni (221.648); P (213.617); Pb (217.000); Se (196.026); V (290.880); Zn (213.857).

Validation studies

The method was validated by performance parameters: stability, linearity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification and matrix effect.²⁹ Samples and multi-element solution stability were evaluated for 24 h at room temperature and kept at 37 °C for 2 h in 0.01 and 0.1 mol L⁻¹ HCl by checking changes in the analytical signal after analyzed by ICP OES. Linearity was evaluated by linear regression of analytical curves (1.0 to 200.0 µg mL⁻¹ for macro- and 1.0 to 50.0 µg mL⁻¹ for microelements). Precision was evaluated through relative standard deviation (RSD) from the obtained data by analyzing solutions of macro- and microelements with a working concentration of 5 and 25 µg mL⁻¹, in six replicates.

The accuracy of the measurements was assessed using apple leaves certified reference material 1515 (CRM/NIST 1515) from the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA). In addition, a recovery study was conducted by adding known amounts (5 µg) of each mineral in samples, for evaluation of accuracy. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated using the concentration equivalent to three times the standard deviation (3σ) of the signal (n = 10) of the analytical blank solution, and the LOQ was calculated using 10σ criterion (n = 10), respectively. The matrix effect was evaluated by comparing the slopes of curves obtained by external calibration with standard solutions in acid medium (2 mol L⁻¹ HNO₃), from solutions of the digested samples by ICP OES.

Statistical analysis

The IC₅₀ of leishmania growth and CC₅₀ were calculated based in a nonlinear regression (curve fit) and the statistical analyses were made by one-way analysis of variance (ANOVA) and Newman-Keuls multiple comparison test using Prism 5.02 GraphPad Software.³⁰ The critical level of significance was established for *p* < 0.05. All experiments were done at least twice.

Results and Discussion

Identification structural of the lupenone

The structural identification of lupenone in the subfractions F3.24.4, F3.28.3 and F3.29.3 was performed analyzing their ¹H and ¹³C NMR data (Supplementary Information (SI) section) and comparing it with those available in the literature.³¹⁻³⁵ The ¹H NMR spectrum of the compound (Figure S1a, SI section) showed characteristic triterpenoid signals between δ_H 0.67-1.92, in addition to two broad singlets at δ_H 4.58 and 4.70, typical for double bond reference to geminal olefinic hydrogens in C-29 and it can be concluded that it is a lupane skeleton.³¹ Further, the spectrum indicated the presence of seven methyl singlets at δ_H 0.76, 0.81, 0.89, 0.94, 0.95, 1.03 and 1.69 (Figure S1b, SI section). These signals are in accordance with those of the literature for lupenone.³² The ¹³C NMR spectrum displayed the signal at δ_C 218.2 (Figure S2a, SI section) characteristic of carbonyl, and the signals in δ_C 109.4 and 150.9 for olefinic carbons.³³ It was also possible to identify chemical shifts of the following primary carbons: δ_C 26.6; 21.0; 15.8; 16.0; 14.5; 18.0 and 19.7, representing the carbons C23, C24, C25, C26, C27, C28 and C30, respectively (Figure S2b, SI section). After analyzing these spectral data and comparing them with the literature (Table 1) it was possible to identify that fractions F3.24.4, F3.28.3 and F3.29.3 are constituted by lupenone (Figure 1).^{34,35} Although lupenone has already been found in other species of *Albizia* (*A. versicolor*, *A. schimperana* and *Albizia gummifera*)³⁶ and *A. lebbeck*,³⁷ its isolation in *A. inundata* is being reported for the first time, in this study.

The ¹H NMR spectra of the methanol extracts of the stem bark and leaves (Figures S3 and S4, SI section) showed signals for protons of the structural skeleton of derivatives triterpenes and steroids, among other metabolites, at δ_H 3.06-3.51 (carbinolic protons); at δ_H 4.98-5.56 (olefinic protons); δ_H 1.98-0.76 and δ_H 1.07-3.5 (methyl and methylenic protons, respectively). Other signals at δ_H 4.40-5.50 suggest presence of the anomeric protons. In addition to these, aromatic protons at δ_H 6.87-8.0, mainly

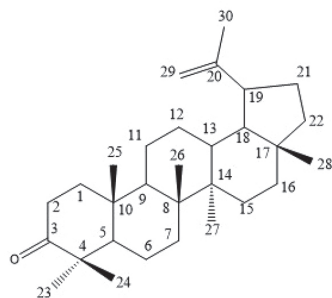


Figure 1. Chemical structure of lupenone.

Table 1. Lupenone ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) chemical shifts, compared to the values reported in the literature (50 and 75 MHz, CDCl_3)

Carbon (C)	δ_{C} (lupenone, 125 MHz, CDCl_3) / ppm	δ_{C} (Olea and Roque, ³⁴ 50 MHz, CDCl_3) / ppm	δ_{C} (Ahmad and Atta-Ur-Rahman, ³⁵ 75 MHz, CDCl_3) / ppm
1	39.6	39.7	39.6
2	34.1	34.0	34.1
3	218.2	217.0	217.9
4	47.9	47.3	47.3
5	54.9	55.0	55.0
6	19.7	19.8	19.6
7	33.5	33.6	33.6
8	40.8	40.9	40.9
9	49.8	49.8	49.8
10	36.9	37.0	36.9
11	21.5	21.4	21.5
12	25.1	25.1	25.2
13	38.2	38.3	38.2
14	43.0	43.0	42.9
15	27.4	27.4	27.4
16	35.5	35.6	35.6
17	42.9	43.0	42.9
18	48.2	48.2	48.3
19	47.9	47.9	47.9
20	150.9	150.5	150.7
21	29.8	29.9	29.9
22	40.0	40.0	40.0
23	26.6	26.7	26.6
24	21.0	21.1	21.0
25	15.8	15.8	15.8
26	16.0	16.0	15.9
27	14.5	14.6	14.4
28	18.0	18.1	18.0
29	109.4	109.6	109.2
30	19.7	19.4	19.3

NMR: nuclear magnetic resonance; δ_{C} : carbon displacement; ppm: parts per million.

the ^1H NMR spectrum of the stem bark extract, which was most active, indicate the presence of the classes of the aromatic secondary metabolites (Figure S4, SI section).

A. inundata is still an unexplored species. In the literature, only Zhang *et al.*¹⁴ identified pentacyclic saponins isolated from the methanolic extract of *A. inundata* bark. Chemical investigations related to other *Albizia* species have led to the isolation of lignans, flavonoids, alkaloids, saponins, diterpenes, and others. Some species have been reported producing a wide range of triterpenoid saponins by Liu *et al.*⁴

Cao *et al.*⁶ isolated three new oleanane triterpenoid saponins from the root of *A. gummifera*. Ikeda *et al.*⁸ isolated and elucidated the structures of three new saponins, julibrosidas from *A. julibrissin*. In the first report of saponin esters in dicotyledonous plants, Krief *et al.*⁷ isolated three new oleanane triterpenoid saponins, called A-C grandibracteosides, from the methanol extract from leaves of *A. grandibracteata*, a species widely consumed by primates in the Kibale/Uganda National Park.

Cytotoxicity assessment

In the *Albizia* genus, plants are known for their traditional medicinal uses for the treatment of mental disorders, insomnia, tumors, among other diseases.^{38,39} The plant extract and lupenone were evaluated against mammalian cells to determine the cytotoxicity. The petroleum ether extracts did not demonstrate cytotoxicity (CC_{50} values $> 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Lupenone exhibited $\text{CC}_{50} = 31.95 \mu\text{g mL}^{-1}$, being several times less cytotoxic in comparison with gentian violet ($\text{CC}_{50} = 1.16 \pm 0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$), the reference drug in this assay. In contrast, for the methanolic extracts of the bark, stem and leaves were obtained CC_{50} values of $10.26 (\pm 0.6)$, $12.52 (\pm 0.7)$ and $1.567 (\pm 0.9) \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These results show potential cytotoxic of these compounds. In a previous report¹⁴ was demonstrated that two triterpenic saponins isolated from *A. inundata* presented activity against tumor cells, with IC_{50} of $1.0\text{--}3.8 \mu\text{g mL}^{-1}$. These data suggest a possible antitumor activity of the methanolic extracts and lupenone isolated from *A. inundata*.

In this study, antitumor activity of extracts and lupenone was not evaluated. In literature, Zhang *et al.*¹⁴ carried out studies on the pharmacological potential of *A. inundata* against tumor melanoma cells (B16F10 and SKMEL28), from two triterpenic saponins isolated from the methanolic extract from the aerial parts, obtaining the IC_{50} value of $1.0\text{--}3.8 \mu\text{g mL}^{-1}$, with satisfactory results regarding the other substances analyzed in the research against the same tumor cell lines. In addition, Wei *et al.*¹⁵ evaluated the cytotoxic activity of oleanane triterpenoid saponins against human colon cells (HCT116). Therefore, there are perspectives

for evaluation of extracts and lupenone isolated from *A. inundata*, in other cancer cell lines.

In literature, few studies have demonstrated the tumor activity of the genus *Albizia*. Cao *et al.*⁶ studied the ethanolic extract of the root of *A. gummifera* and of three triterpenoid saponins of the oleanane type isolated, two compounds presented cytotoxicity against the human ovarian cancer cell line (A2780). Krief *et al.*⁷ evaluated the crude extract and the pure compounds of *A. grandibracteata*, which demonstrated significant *in vitro* inhibitory activity against tumor cell lines (KB and MCF7). Ikeda *et al.*⁸ reported crude fraction cytotoxicity of *A. julibrissin*. Lenta *et al.*⁹ evaluated the methanolic extract of *Albizia zygia* (DC) J. F. Macbr. bark and showed significant results related to cytotoxic activity in cells of the L-6 line (mouse skeletal muscle myoblasts) with IC_{50} value of $4.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Melek *et al.*¹⁰ performed a phytochemical and biological study of the *A. procera* species and highlighted cytotoxicity against HEPG2 cells with IC_{50} values of 9.3 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Lacroix *et al.*¹¹ reported cytotoxicity against human tumor cells from squamous cell carcinoma of the mouth (KB), obtaining IC_{50} value of $21 \mu\text{g mL}^{-1}$, from extracts from the leaves of *A. grandibracteata*.

Antibacterial and antifungal activities

The results for antibacterial and antifungal activities of *A. inundata* (petroleum ether extract from leaves; extracts in methanol from the leaves, stems and stem bark and of lupenone, isolated of the petroleum ether extract from leaves) was evaluated against three Gram positive, three Gram negative strains and *Candida albicans*. Minimum bactericidal concentration (CBM) and minimum fungicidal concentration (CFM) are presented in Table 2.

Among the samples tested, the methanolic extract of the stem bark (SMSB) was the most active against all the microorganisms tested, with MICs values in the range of $3.9\text{--}125 \mu\text{g mL}^{-1}$. Although this extract had low bacteriostatic selectivity, its bactericidal effect on Gram-negative bacteria *S. choleraesuis* and *P. aeruginosa* was elevated with values of MMCs of 62.5 and $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These antibacterial effect of the extracts can probably be inferred by the presence of triterpenic saponins, among other metabolites, according to a preliminary phytochemical study of aerial parts of a specimen of *A. inundata*.¹⁵ The antimicrobial assay demonstrated that the methanol extract from the leaves (EML) showed activity against *S. choleraesuis*, *B. subtilis*, *M. luteus* and *C. albicans* with MICs of 250, 125, 15.63 and $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

The petroleum ether extract from the leaves showed no antibacterial effect, however, lupenone, which was isolated from this extract, showed selective bacteriostatic effect for *M. luteus* with MIC of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. The synergism of the compound mixture masked the antimicrobial effect of this extract. Lupenone has been known to have anti-inflammatory, anti-diabetic, antitumor and, antiviral activity,⁴⁰ but the bacteriostatic effect on *M. luteus* has not been reported.

Antileishmanial activity

Non-cytotoxic concentrations of compounds were tested for antiparasitic activity. The leishmanicidal effect of lupenone and extracts was evaluated against promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*. This triterpene significantly reduced promastigotes proliferation, with an IC_{50} value of $20 \mu\text{M}$, being less potent than amphotericin B, a reference drug for leishmaniasis treatment, which presented an IC_{50} of $0.09 \mu\text{M}$. However,

Table 2. Screening for the antifungal and antibacterial activities of the extracts and lupenone of *A. inundata*

Sample	Microorganisms MICs (MMCs) / ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
	Gram-positive bacteria			Gram-negative bacteria			Fungi
	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
EML	> 500	15.63 (125)	125 (500)	250 (500)	> 500	> 500	250 (> 500)
SMSB	15.63 (31.25)	3.91 (3.91)	31.25 (31.25)	31.25 (62.5)	125 (125)	125 (> 125)	62.5 (> 500)
SEM	125.0 (250)	7.81 (31.25)	125 (250)	125 (> 125)	500 (> 500)	> 500	125 (> 500)
EPEL	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Lupenone	> 100	50 (> 50)	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Benzylpenicilin	0.008	0.031	0.008				
Geramycin				0.39	0.39	0.39	
Loprox (ciclopirox olamine)							6.25

MIC: minimum inhibitory concentration; MMC: minimum microbicidal concentration; concentrations tested of the extracts and fractions (500 to $3.91 \mu\text{g mL}^{-1}$), lupenone (100 to $0.78 \mu\text{g mL}^{-1}$), antibiotics: benzylpenicillin ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) for Gram-positive bacteria; geramycin ($50\text{--}0.39 \mu\text{g mL}^{-1}$) for Gram-negative bacteria and ciclopirox olamine ($100\text{--}0.78 \mu\text{g mL}^{-1}$) for fungus. EML: crude methanolic extracts of leaves; SMSB: crude methanolic extracts of stem bark; SEM: crude methanolic extracts of stem; EPEL: petroleum ether of the leaves.

lupenone was several times less cytotoxic in comparison with amphotericin B (Table 3). The extracts did not show antileishmanial activity. In literature, there are no reports on antileishmanial activities of *A. inundata* and there are few data on the effects of terpenes against different species of leishmania.⁴¹⁻⁴³ Monoterpenes isolated from essential oils and aromatic plants presented IC_{50} for promastigotes higher than those found in the present work (48–65 μM).⁴⁴ α -Amyrin, 11-oxo- α -amyrone and 11-oxo- α -amyrin, triterpenes obtained from *Cola nitida*, presented an IC_{50} values against promastigotes of *L. amazonensis* of 19.42 and 11.6 $\mu g mL^{-1}$, respectively. The lipophilicity of triterpenes might facilitate penetration through lipid bilayer of cellular membranes, increasing the toxicity against leishmania species.⁴⁵

To evaluate the effects of lupenone against amastigotes, J774 macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigotes and treated at different concentrations (5, 10 and 20 μM) of the compound for 24 h. Although there was no significant reduction in the percentage of infected macrophages at all concentrations tested, treatment with lupenone significantly reduced the number of amastigotes *per* macrophage at a concentration of 20 μM (Figure 2). Lupenone presented an IC_{50} value of 20.6 μM against amastigotes. The lupenone was more effective than lupeol,

isolated from aerial parts of *Vernonia scorpioides*, which showed an IC_{50} of 40.73 $\mu g mL^{-1}$ against amastigotes of *L. amazonensis*.⁴⁶ In another study, α -bisabolol terpene showed an IC_{50} of 10.70 $\mu g mL^{-1}$ against amastigotes of *L. amazonensis*, with higher IC_{50} values than lupenone.⁴⁷ Lupenone and extracts were tested in initial screening against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes, and no activity was observed (data not shown).

To evaluate the effects of lupenone on the parasite structures, J774 macrophages were infected with *L. amazonensis* and treated with lupenone at 20 μM . After 24 h of treatment, ultrastructural changes were evaluated by the transmission electron microscopy. Untreated parasites showed normal morphology, without alterations (Figures 3a and 3b). The presence of lipid inclusions was observed in the cytoplasm of amastigotes treated with lupenone, suggesting an accumulation of abnormal lipids and precursors in the parasite (Figures 3c and 3d).⁴⁷ Interestingly, similar alterations were found in promastigotes of *L. amazonensis* treated with an essential oil from *Vanillosmopsis arborea* and (–) α -bisabolol, an alcohol sesquiterpene.^{48,49} The appearance of lipids inclusions indicates that lupenone might affect the lipid biosynthesis pathways, a promise target in the leishmania drug discovery field.^{50,51}

Table 3. Cytotoxic concentration for 50% of cells (CC_{50}), inhibitory concentration for 50% of parasites (IC_{50}) and selectivity index

Compound	CC_{50} Mφ J774 / μM	IC_{50} promastigotes of <i>L. amazonensis</i> / μM	Selectivity index (promastigotes)	IC_{50} amastigotes of <i>L. amazonensis</i> / μM	Selectivity index (amastigotes)
Lupenone	37.5 ± 9.0	20.0 ± 0.5	1.8	20.6 ± 2.4	1.8
Amphotericin B	3.3 ± 0.5	0.09 ± 0.02	36.6	0.05 ± 0.01	66
Gentian violet	0.8 ± 0.1	–	–	–	–

CC_{50} : cytotoxic concentration for 50% of cells; Mφ J774: J774 macrophages; IC_{50} : inhibitory concentration for 50% of parasites.

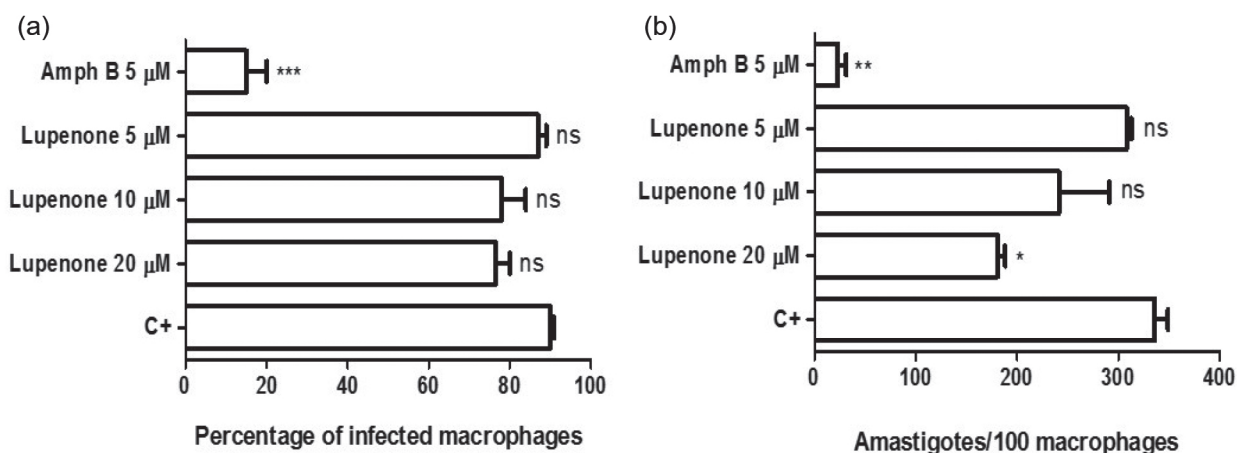


Figure 2. Effect of lupenone against *L. amazonensis* infected macrophages. J774 macrophages were infected with *L. amazonensis* (at a ratio of 10:1) and treated with lupenone (5, 10 and 20 μM) after 4 h of infection. The percentage of infected macrophages (a) and number of intracellular amastigotes (b) were determined after 24 h of treatment. Amphotericin B (Amph B; 5 μM) was used as a reference drug. * $P < 0.05$ compared to C+ group; ** $P < 0.01$ compared to C+ group; *** $P < 0.001$ compared to C+ group; ns: not significant.

Multi-element analysis

The method was validated for stability and, samples and multi-element solutions were stable within 24 h. Linearity was evaluated and a good linearity was obtained for all observed lines, with determination coefficients (R^2) in the range from 0.9994 to 0.9998. Precision was assessed and the relative standard deviation (RSD) values were lower than 10%, indicating the high precision of this method.

A recovery test of the analytical procedure was carried out for the elements under study in leaves of *A. inundata* by spiking (5 μ g of each analyte) the analyzed samples with aliquots of metal standards and then reanalyzing the samples. This sample was chosen for this test due to its available mass. The obtained recovery values, in the range of 90–107%, showed that there are no signs of systematic errors due to operation effects of the added analyte, such as losses during the process. The results showed good

agreement with the reference values of the CRM/NIST 1515-apple leaves (Table 4). The obtained recovery values, in the range of 90 to 110%, showed good accuracy of the method. It was possible to verify similarities in the amount of macro and microelements when comparing the values obtained in the CRM 1515 with the leaves sample of *A. inundata*, mainly for the elements Al, K, Mg and V. It is suggested that this similarity can be attributed to the same part of the plant, of both materials. When analyzing the bark and the stem it was possible to establish similarities for the micronutrients Cr, K, P and Zn, present in the studied plant.

The LODs and LOQs obtained for Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Se, V and Zn determined by ICP OES are shown in Table 4. The residual acidity of the digests was $< 3.0 \text{ mol L}^{-1}$. The slopes of the calibration curves for each element do not show significant variations, at 95% confidence. These results showed that

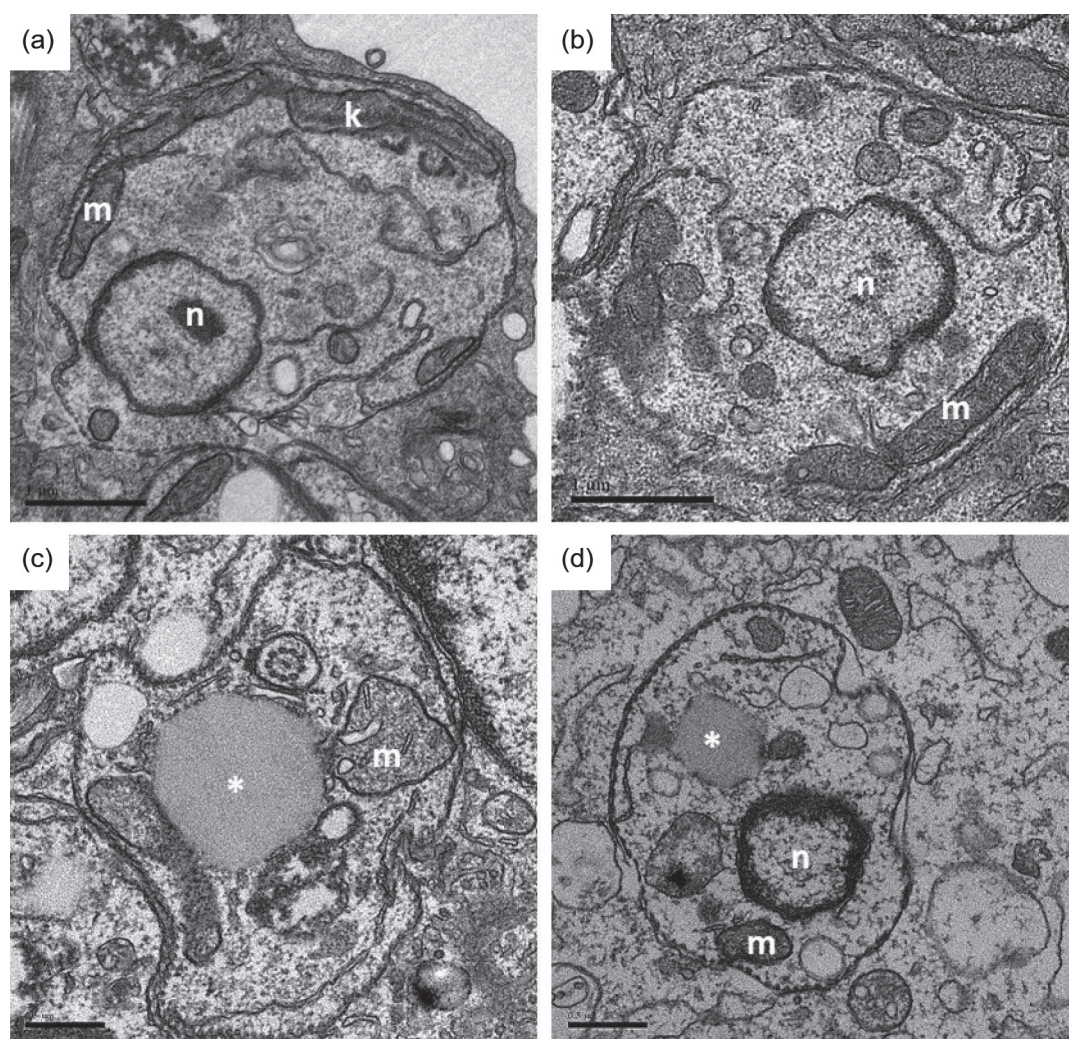


Figure 3. Transmission electron microscopy of intracellular amastigotes of *L. amazonensis* after treatment with lupenone (20 μ M). Untreated intracellular parasites presenting organized cytoplasm and organelles with normal morphology (a, b). Parasites treated with lupenone at concentration of 20 μ M exhibiting unchanged cytoplasm and organelles, but with lipid inclusions (c, d). n: nucleus; m: mitochondria; k: kinetoplast; *: lipid inclusion.

the matrix effect is not significant for the measures in ICP OES under the selected operating conditions.

The content ($\mu\text{g g}^{-1}$ or mg g^{-1}) of 19 elements (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, V and Zn) in the areas (leaf, bark and stem/heartwood) of the *Albizia inundata* plant was determined. As, Ba, Cd, Co, Hg, Mo e Pb, in all the investigated samples, were found to be below the LOD value of ICP OES.

No data were found in the literature for *Albizia* species, regarding elemental composition. The results indicated that the aerial parts of *A. inundata* contain amounts of Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, V and Zn (Table 4). Concentrations of Al, Cr, Cu, Fe and Mn varied widely in the samples studied. The results obtained for the macro (K and P) and micronutrients (Al, Cr, Cu, Fe and Zn), present in the aerial parts of *A. inundata*, showed that leaves presented the highest values of these elements, when compared to the other parts of the plant. These variations of concentration may have occurred due to variations in the distribution of these elements in the biological cycle in the plant, their incorporation into the aerial structures of *A. inundata*, changes in soil and other geoclimatic conditions, among other variables.⁵² Especially for Cr, it is suggested that some type of soil or sample contamination may have occurred during collection, transport, packaging and/or preparation. Elci *et al.*⁵³ proposed a selective extraction of chromium(VI) using a leaching procedure with sodium carbonate from some plant leaves, soil and sediment samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS), after

acid digestion with mixture of $\text{HClO}_4 + \text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ of plants (tomato and fig leaves). The authors quantified a high Cr^{VI} and total chromium content in growing tomato and fig leaves, in soil of land close to the leather tanning industry region. Altundag *et al.*,⁵⁴ in Sakarya, Turkey, studied the influence of selected soil and plant properties and their potential impacts on human health in urban environments by two artificial digestion models (stomach and intestinal). Soil and plants samples were dissolved by an acid mixture of HNO_3 (65%)/ HCl (37%). The authors concluded that trace element levels transmitted from soil and plants (parsley and lettuce) to humans were low, in range of 0 and 68% for Al and Cd, respectively.

Establishing the multi-element composition of plants with therapeutic potential is necessary to contribute to the health organs because the plants may be used as sources of nutrients to animal and human health. In literature, studies have determined multi-element in plants and others biological samples by spectroscopic techniques. Marques and Nóbrega⁵⁵ developed a fast and simple flow-batch extraction procedure for screening of macro and micronutrients in dried plant leaves by ICP OES. Barin *et al.*⁵⁶ determined Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Mg, Mn, Ni, Sr, V and Zn by ICP OES in foliar tissues: oregano (*Origanum majorana* sp.), salsa (*Petroselinum crispum*), basil (*Ocimum basilicum*), coriander (*Coriandrum sativum*) and chives (*Allium schoenoprasum*). Pytlakowska *et al.*⁵⁷ determined 13 trace elements by ICP OES (Al, B, Ba, Fe, Zn, Mn, Mg, K, Na, P, Cu, Sr and Ca) in herbs and their infusions:

Table 4. Concentrations of Ca, K, Mg, P, Al, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V and Zn in leaves, bark and stem (heartwood) from *A. inundata* and CRM/NIST 1515-apple leaves, after digestion in microwave oven. Values obtained for LOD and LOQ, by digestion in a microwave oven (mean $\pm$ standard deviation, n = 3, 95% confidence level)

Sample/ elements	Concentration											
	Al	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ni	P	V	Zn
	396.153 nm / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	317.933 nm / (mg g^{-1})	284.325 nm / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	324.752 nm / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	259.939 nm / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	404.21 nm / (mg g^{-1})	280.271 nm / (mg g^{-1})	257.610 nm / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	221.648 nm / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	213.617 nm / (mg g^{-1})	290.880 nm / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	213.857 nm / ($\mu\text{g g}^{-1}$)
CRM/NIST 1515 (certified value) / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	286.0 $\pm$ 9.0	1.5 $\pm$ 0.1	—	5.6 $\pm$ 0.2	—	1.6 $\pm$ 0.1	0.27 $\pm$ 0.01	54.0 $\pm$ 3.0	0.91 $\pm$ 0.12	—	0.26 $\pm$ 0.03	12.3 $\pm$ 0.1
CRM/NIST 1515 (determined value) / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	271.0 $\pm$ 0.1 (94.7) ^a	1.5 $\pm$ 0.2 (99.3) ^a	5.8 $\pm$ 0.8	5.2 $\pm$ 1.3 (92.7) ^a	8.4 $\pm$ 2.1	1.5 $\pm$ 0.3 (90.1) ^a	0.25 $\pm$ 0.01 (92.6) ^a	59.2 $\pm$ 9.9 (109.6) ^a	0.82 $\pm$ 0.03 (90.1) ^a	0.24 $\pm$ 0.05	0.27 $\pm$ 0.02 (103.8) ^a	12.1 $\pm$ 1.0 (98.7) ^a
<i>A. inundata</i> (leaves)	212.7 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 0.1	20.3 $\pm$ 1.3	11.6 $\pm$ 0.8	32.1 $\pm$ 6.2	1.5 $\pm$ 0.3	0.24 $\pm$ 0.03	243.1 $\pm$ 15.4	0.29 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.05	26.9 $\pm$ 2.9
<i>A. inundata</i> (bark)	96.2 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.1	11.9 $\pm$ 0.8	9.1 $\pm$ 1.4	9.2 $\pm$ 1.1	1.2 $\pm$ 0.5	0.69 $\pm$ 0.02	265.4 $\pm$ 34.3	0.38 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.04	13.1 $\pm$ 1.2
<i>A. inundata</i> (stems- heartwood)	10.7 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.3	11.8 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 1.7	33.0 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.1	0.31 $\pm$ 0.01	21.0 $\pm$ 7.1	0.16 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	14.3 $\pm$ 0.9
LOD / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.002	0.009	0.017	0.0001	0.003	0.034	0.011	0.001	0.002	0.101	0.004	0.009
LOQ / ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.007	0.029	0.058	0.0008	0.011	0.115	0.040	0.005	0.008	0.336	0.017	0.030

^aRecovery in percentage. LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification.

chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), peppermint (*Mentha x piperita*), melissa (*Melissa officinalis*), sage (*Salvia officinalis*), nettle (*Urtica dioica*), linden tree (*Tilia vulgaris*) and St. John's wort (*Hypericum calycinum*) consumed for medicinal purposes in Poland. Santos Jr. *et al.*²⁸ determined the elemental composition of nine medicinal plants and phytomedicines: *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss ("espinheira santa"), *Piper methysticum* G. Foster (kawa-kawa), *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Brazilian ginseng), *Uncaria tomentosa* (cat's claw), *Rhamnus purshiana* (sacred bark), *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort), *Ptychopetalum olacoides* Benth (marapuama)/potency wood), *Anemopaegma arvense* Vell. ("catuaba") and *Euterpe oleracea* Mart. (açai) by ICP OES, after microwave digestion.

Conclusions

This study made possible the identification, for the first time, of a pentacyclic triterpene (lupenone) isolated from the petroleum ether extract from leaves and its fractions from *Albizia inundata* (Mart.) Barneby & J.W.Grimes species, being an inedited contribution to the specie, showing a chemotaxonomic importance for *Albizia* genus.

In addition, natural products from *A. inundata* revealed antimicrobial activity against bacteria, fungi and *Leishmania amazonensis*. Methanol extract (leaves) showed activity against *S. choleraesuis*, *B. subtilis*, *M. luteus* and *C. albicans*. Lupenone demonstrated antibacterial activity against *M. luteus*. Interestingly, leishmanial activity might be related to interference in the lipid biosynthesis pathways. No activity was observed when lupenone was tested against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Therefore, based on the results obtained, potential biological activity of *A. inundata* was observed.

The determination of the element composition of *A. inundata* samples-leaves, bark and stems (heartwood) using ICP OES with axial viewing required a simple pretreatment procedure of the sample, featuring simple and reproducible method results. Lastly, using ICP OES, we found large concentrations of Cu, Fe, Mn and Zn which makes these samples as additional sources of these macronutrients. These results may be useful for obtaining further information and for the formation of a mineral composition database on *Albizia* species.

Supplementary Information

Supplementary data associated with this article can be found, free of charge, at <http://jbcs.sbq.org.br> as a PDF file.

Acknowledgments

The authors are grateful to the following Brazilian agencies: Bahia State Research Support Foundation (FAPESB), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)" for research fellowships and, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) and State University of Bahia (UNEB) for financial support in laboratories and infrastructure.

Author Contributions

E. M. J. A. performed the experimental work of phytochemical analysis, multi-element composition and antimicrobial activity, wrote and reviewed the manuscript. J. S. T., D. K. C. S., T. B. S., C. S. M., M. B. P. S. and E. T. G. performed the cytotoxicity assays and antiparasitic activity, analyzed the results and wrote part of this manuscript. M. G. A. K., H. N. B. and C. G. F. analyzed the general results and wrote part of this manuscript, L. C. S. N. and A. F. S. J. headed the investigation and conceived the experimental plan.

References

1. Imededdine, N.; *Ind. Crops Prod.* **2011**, *33*, 30.
2. Dutra, A. S.; Medeiros Filho, S.; Oliveira, D. F.; *Rev. Caatinga* **2008**, *21*, 75.
3. Viana, E. O. R.; Cruz, M. F. S. J.; Silva, M. J.; Pereira, G. M.; Silva, B. P.; Tinoco, L. W.; Parente, J. P.; *Carbohydr. Res.* **2019**, *471*, 105.
4. Liu, R.; Ma, S. G.; Liu, Y. X.; Yu, S. S.; Chen, X. G.; Zhang, J. J.; *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 1877.
5. Sobeh, M.; Rezaq, S.; Sabry, O. M.; Abdelfattah, M. A. O.; El Raey, M. A.; El-Kashak, W. A.; El-Shazly, A. M.; Mahmoud, M. F.; Wink, M.; *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *115*, 108882.
6. Cao, S.; Norris, A.; Miller, J. S.; Ratovoson, F.; Razafitsalama, J.; Andriantsiferana, A.; Rasamison, V. E.; Tendyke, K.; Suh, T.; Kingston, D. G. I.; *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 361.
7. Krief, S.; Thoison, O.; Sevenet, T.; Wrangham, R. W.; Lavaud, C.; *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 897.
8. Ikeda, T.; Fujiwara, S.; Araki, K.; Kinjo, J.; Nohara, T.; Miyoshi, T.; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 102.
9. Lenta, B. N.; Vonthron-Sénécheau, C.; Soh, R. F.; Tantangmo, F.; Ngouela, S.; Kaiser, M.; Tsamo, E.; Anton, R.; Weniger, B.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 8.
10. Melek, F. R.; Miyase, T.; Ghaly, N. S.; Nabil, M.; *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1261.
11. Lacroix, D.; Prado, S.; Kamoga, D.; Kasenene, J.; Namukobe, J.; Krief, S.; Dumontet, V.; Mouray, E.; Bodo, B.; Brunois, F.; *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 850.

12. Baldin, T.; Marchiori, J. N. C.; *Balduinia* **2014**, *46*, 25.
13. Marchiori, J. N. C.; Alves, F. S.; *Balduinia* **2012**, *33*, 21.
14. Zhang, H.; Samadi, A. K.; Rao, K. V.; Cohen, M. S.; Timmermann, B. N.; *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 477.
15. Wei, G.; Cui, S.; Luan, W.; Wang, S.; Hou, Z.; Liu, Y.; Liu, Y.; Cheng, M.; *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *113*, 92.
16. Rogero, S. O.; Lugão, A. B.; Ikeda, T. I.; Cruz, A. S.; *Mat. Res.* **2003**, *6*, 317.
17. Fayad, J. A.; Fontes, P. C. R.; Cardoso, A. A.; Finger, F. L.; Ferreira, F. A.; *Hortic. Bras.* **2002**, *20*, 90.
18. Souza, S. O.; Costa, S. S. L.; Santos, D. M.; Pinto, J. S.; Garcia, C. A. B.; Alves, J. P. H.; Araujo, R. G. O.; *Spectrochim. Acta, Part B* **2014**, *96*, 1.
19. Qing-Hua, Y.; Li, Y.; Qing, W.; Xiao-Qin, M.; *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 287.
20. Razic, S.; Onjia, A.; Dogo, S.; Slavkovic, L.; Popovic, A.; *Talanta* **2005**, *67*, 233.
21. Kalny, P.; Fijałek, Z.; Daszczyk, A.; Ostapczuk, P.; *Sci. Total Environ.* **2007**, *381*, 99.
22. Sá, R. R.; Caldas, J. C.; Santana, D. A.; Lopes, M. V.; Santos, W. N. L.; Korn, M. G. A.; Santos Jr., A. F.; *Food Chem.* **2019**, *273*, 15.
23. Gentshev, G. D.; Stafilov, T.; Ivanov, E. H.; *Eurasian J. Anal. Chem.* **2010**, *5*, 104.
24. Marin, S.; Lacrimioara, S.; Cecilia, R.; *J. Plant Dev.* **2011**, *18*, 87.
25. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI); *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, available at https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf, accessed in March 2020.
26. Araújo, F. M.; Dantas, M. C. S. M.; Silva, L. S.; Aona, L. Y. S.; Tavares, I. F.; Souza-Neta, L. C.; *Ind. Crops Prod.* **2017**, *105*, 203.
27. Guimarães, E. T.; Lima, M. S.; Santos, L. A.; Ribeiro, I. M.; Tomassini, T. B.; Ribeiro dos Santos, R.; Teixeira, M. M.; dos Santos, W. L. C.; Soares, M. B. P.; *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *64*, 84.
28. Santos Jr., A. F.; Matos, R. A.; Andrade, E. M. J.; Santos, W. N. L.; Magalhães, H. I. F.; Costa, F. N.; Korn, M. G. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, *28*, 376.
29. International Conference on Harmonisation (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, available at <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2-r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology>, accessed in March 2020.
30. *GraphPad Prism*, version 5.02; GraphPad Software Inc., San Diego, USA, 2008.
31. Costa, D. A.; Chaves, M. H.; Silva, W. C. S.; Costa, C. L. S.; *Acta Amazonica* **2010**, *40*, 207.
32. Prakash, C. V. S.; Prakash, I.; *Res. J. Pharm. Sci.* **2012**, *1*, 23.
33. Mutai, C.; Abatis, D.; Vagias, C.; Moreau, D.; Roussakis, C.; Roussis, V.; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1159.
34. Olea, R. S. G.; Roque, N. F.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 278.
35. Ahmad, V. U.; Atta-Ur-Rahman; *Pentacyclic Triterpenoids (Handbook of Natural Products Data)*; Elsevier Science: Amsterdam, 1994, p. 1029.
36. Rukunga, G. M.; Waterman, P. G.; *Fitoterapia* **2001**, *72*, 188.
37. Gupta, R. S.; Kachhawa, J. B. S.; Chaudhary, R.; *Phytomedicine* **2006**, *13*, 277.
38. Cheng, Z. Q.; Yang, D. A. N.; Liu, Y. Q.; Hu, J. M.; Jiang, H. Z.; Wang, P. C.; Li, N.; Zhou, J.; Zhao, Y. X.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1766.
39. Meirelles, M. N.; Araújo Jorge, T. C.; Souza, W.; *Z. Parasitenkd.* **1982**, *68*, 6.
40. Xu, F.; Huang, X.; Wu, H.; Wang, X.; *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *103*, 198.
41. Yaluff, G.; Vega, C.; Alvarenga, N.; *Acta Trop.* **2017**, *168*, 41.
42. Oliveira, C.; Moura, M.; Lopes, A.; de Andrade, P.; da Silva, H.; Figueiredo, C.; *Parasitol. Res.* **2009**, *104*, 1053.
43. de Medeiros, M.; da Silva, A.; Citó, A.; Borges, A.; de Lima, S.; Lopes, A.; Figueiredo, R.; *Parasitol. Int.* **2011**, *60*, 237.
44. Youssefi, R. M.; Moghaddas, E.; Tabari, M. A.; Moghadamnia, A. A.; Hosseini, M. S.; Farash, H. R. B.; Ebrahimi, A. M.; Mousavi, N. N.; Fata, A.; Maggi, F.; Petrelli, R.; Dall'Acqua, S.; Benelli, G.; Sut, S.; *Molecules* **2019**, *24*, e2072.
45. Frankenberger, L.; Mora, T.; de Siqueira, C. D.; Filippin-Monteiro, F. B.; de Moraes, M. H.; Biavatti, M. W.; Sandjo, L. P.; *Phytochem. Anal.* **2018**, *29*, 577.
46. Machado, V. R.; Sandjo, L. P.; Pinheiro, G. L.; Moraes, M. H.; Steindel, M.; Pizzolatti, M. G.; Biavatti, M. W.; *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 275.
47. Vannier-Santos, M. A.; de Castro, S. L.; *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 246.
48. Colares, A. V.; Almeida-Souza, F.; Taniwaki, N. N.; Souza, C. D. S. F.; da Costa, J. G. M.; Calabrese, K. D. S.; Abreu-Silva, A. L.; *J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.* **2013**, *2013*, 727042.
49. Rottini, M. M.; Amaral, A. C.; Ferreira, J. L.; Silva, J. R.; Taniwaki, N. N.; Souza, C. S. F.; d'Escoffier, L. N.; Almeida-Souza, F.; Hardoim, D. J.; Gonçalves-da-Costa, S. C.; Calabrese, K. S.; *Exp. Parasitol.* **2015**, *148*, 66.
50. Emami, S.; Tavangar, P.; Keighobadi, M.; *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 241.
51. Yamamoto, E. S.; Jesus, J. A.; Bezerra-Souza, A.; Laurenti, M. D.; Ribeiro, S. P.; Passero, L. F. D.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18*, 2338.
52. Maiga, A.; Diallo, D.; Bye, R.; Paulsen, B. S.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2316.
53. Elci, L.; Divrikli, U.; Akdogan, A.; Hol, A.; Cetin, A.; Soylyak, M.; *J. Hazard. Mater.* **2010**, *173*, 778.

54. Altundag, H.; Albayrak, S.; Dundar, M. S.; Tuzen, M.; Soylak, M.; *Biol. Trace Elem. Res.* **2015**, *168*, 276.
55. Marques, T. L.; Nóbrega, J. A.; *Microchem. J.* **2017**, *134*, 27.
56. Barin, J. S.; Pereira, J. S. F.; Mello, P. A.; Knorr, C. L.; Moraes, D. P.; Mesko, M. F.; Nóbrega, J. A.; Korn, M. G. A.; Flores, E. M. M.; *Talanta* **2012**, *94*, 308.
57. Pytlakowska, K.; Kita, A.; Janoska, P.; Połowniak, M.; Kozik, V.; *Food Chem.* **2012**, *135*, 494.

Submitted: December 22, 2019

Published online: April 14, 2020

