

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANA CLARA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ALTERAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À PENTAMIDINA E
COMPOSTOS HÍBRIDOS DE EUGENOL E METRONIDAZOL EM *Leishmania (L.)
amazonensis* FRENTE A ALTERAÇÃO NA FORMA DE VIDA**

ALFENAS/MG

2025

ANA CLARA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ALTERAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À PENTAMIDINA E
COMPOSTOS HÍBRIDOS DE EUGENOL E METRONIDAZOL EM *Leishmania (L.)
amazonensis* FRENTE A ALTERAÇÃO NA FORMA DE VIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Figueiredo Peloso.

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Silva, Ana Clara .

Avaliação da alteração da susceptibilidade à pentamidina e compostos híbridos de eugenol e metronidazol em *Leishmania (L.) amazonensis* frente a alteração na forma de vida / Ana Clara Silva. - Alfenas, MG, 2025.

43 f. : il. -

Orientador(a): Eduardo de Figueiredo Peloso.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Leishmaniose. 2. Amastigotas axênicas. 3. Promastigotas. 4. Susceptibilidade. I. Peloso, Eduardo de Figueiredo, orient. II. Título.

ANA CLARA SILVA


**AVALIAÇÃO DA ALTERAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À PENTAMIDINA E
COMPOSTOS HÍBRIDOS DE EUGENOL E METRONIDAZOL EM *Leishmania (L.)
amazonensis* FRENTE A ALTERAÇÃO NA FORMA DE VIDA**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Parasitologia.

Aprovada em: 04 de dezembro de 2025.

Prof. Dr. Eduardo de Figueiredo Peloso
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

 Documento assinado digitalmente
EDUARDO DE FIGUEIREDO PELOSO
Data: 09/12/2025 17:32:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Rosymar Coutinho de Lucas
Universidade Federal de Alfenas

Prof.^a Dr.^a Patrícia Ferreira Espuri Sepini
Universidade Professor Edson Antônio Velano

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada de ampla distribuição global, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que no Brasil apresenta alta incidência nas formas tegumentar e visceral, sobretudo em regiões de baixa renda. O tratamento atual envolve fármacos com elevada toxicidade, difícil administração e crescente resistência parasitária, o que compromete a eficácia terapêutica. Dentre as alternativas, a pentamidina apresenta ação multifatorial, sendo uma opção promissora, ainda que também limitada por seus efeitos adversos, enquanto outros compostos bioativos, como híbridos metronidazol-eugenol, demonstram potencial leishmanicida em ensaios experimentais e podem ampliar o leque de candidatos terapêuticos. Ensaios laboratoriais geralmente utilizam a forma promastigota do parasita, entretanto, essa forma não representa com precisão a biologia das amastigotas intracelulares, mais relevantes clinicamente, e, nesse contexto, o uso de amastigotas axênicas surge como alternativa viável para triagens *in vitro*. Este trabalho tem como objetivo avaliar a susceptibilidade de *Leishmania (L.) amazonensis* à pentamidina e a compostos derivados de eugenol e metronidazol após a diferenciação entre formas promastigotas e amastigotas axênicas, por meio da utilização de culturas do parasita submetidas a protocolos de diferenciação, com posterior exposição ao fármaco e análise de viabilidade celular. Os resultados demonstraram que os híbridos apresentaram perfis semelhantes de suscetibilidade entre si. Observou-se aumento dos valores de EC_{50} após a exposição prévia dos promastigotas aos compostos, indicando tolerância transitória. Em contraste, a diferenciação para amastigotas axênicas resultou em redução do EC_{50} , tornando os parasitas mais suscetíveis, efeito ainda mais pronunciado quando a diferenciação foi precedida pelo tratamento, sugerindo que o processo pode atenuar mecanismos adaptativos de tolerância. A pentamidina manteve EC_{50} inferiores aos dos híbridos em todas as condições, embora tenha seguido o mesmo padrão de variação, com aumento inicial após o tratamento e queda durante a axenização. Esses achados evidenciam que a susceptibilidade de *L. amazonensis* varia conforme o estágio biológico e o histórico de exposição, reforçando a importância da inclusão de amastigotas axênicas em triagens farmacológicas e indicando o potencial dos híbridos como candidatos terapêuticos.

Palavras-chave: Leishmaniose; Amastigotas axênicas; Promastigotas; Susceptibilidade.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease with wide global distribution, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, and in Brazil it shows high incidence in both cutaneous and visceral forms, particularly in low-income regions. Current treatment relies on drugs with high toxicity, difficult administration, and increasing parasitic resistance, which compromises therapeutic effectiveness. Among the available alternatives, pentamidine exhibits a multifactorial mechanism of action and is considered a promising option, although still limited by its adverse effects, while other bioactive compounds, such as metronidazole–eugenol hybrids, have demonstrated leishmanicidal potential in experimental assays and may expand the range of therapeutic candidates. Laboratory assays commonly use the promastigote form of the parasite; however, this stage does not accurately represent the biology of intracellular amastigotes, which are clinically more relevant. In this context, axenic amastigotes emerge as a viable alternative for *in vitro* drug screening. This study aimed to evaluate the susceptibility of *Leishmania (L.) amazonensis* to pentamidine and to eugenol–metronidazole-derived compounds after differentiation between promastigote and axenic amastigote forms, using parasite cultures subjected to differentiation protocols, followed by drug exposure and cell viability analysis. The results demonstrated that the hybrid compounds showed similar susceptibility profiles. An increase in EC₅₀ values was observed after prior exposure of promastigotes to the compounds, indicating transient tolerance. In contrast, differentiation into axenic amastigotes resulted in reduced EC₅₀ values, making the parasites more susceptible—an effect even more pronounced when differentiation was preceded by treatment, suggesting that the process may attenuate adaptive tolerance mechanisms. Pentamidine maintained lower EC₅₀ values compared to the hybrids under all conditions, although it followed the same variation pattern, with an initial increase after treatment and a decrease during axenization. These findings show that the susceptibility of *L. amazonensis* varies according to the biological stage and exposure history, reinforcing the importance of including axenic amastigotes in pharmacological screening and highlighting the potential of the evaluated hybrids as therapeutic candidates.

Keywords: Leishmaniasis; Axenic amastigotes; Promastigotes; Susceptibility.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Padrões de localização de <i>Leishmania</i> no trato digestório de flebotomíneos: hipopíaria, supralária e peripilária.	15
Figura 2 - Formas promastigota e amastigota de <i>Leishmania spp.</i> , destacando estruturas internas e organelas.	16
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	17
Figura 4 - Estrutura do fármaco Pentamidina.	20
Figura 5 - Estrutura do Metronidazol.....	22
Figura 6 - Estrutura do Eugenol.	23
Figura 7 - Estrutura química dos compostos híbridos do eugenol e metronidazol.	25
Figura 8 - Esquema representativo das condições e parâmetros utilizados no ensaio de susceptibilidade.	28
Figura 9 - Curva de Crescimento de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> amastigotas axênicas.	29
Figura 10 - Promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , cepa M2269, em fase estacionária da curva de crescimento.....	30
Figura 11 - Amastigotas axênicos de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , cepa M2269, em diferentes estágios de diferenciação.	30
Figura 12 - Susceptibilidade de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> frente ao tratamento e a alteração na forma de vida.....	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Média dos valores da concentração efetiva de 50% contra promastigotas (EC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$) dos compostos analisados, antes de serem expostos ao tratamento de promastigotas *Leishmania (L.) amazonensis*. 31
- Tabela 2** - Média dos valores da concentração necessária para produzir 50% do efeito máximo esperado (EC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$) dos híbridos AD06, AD07 e AD08 e do fármaco de referência (pentamidina) em diferentes condições experimentais (Controle, tratamento, Axenização e tratamento + Axenização). 32

LISTA DE SIGLAS

AA	Amastigota Axênico
ATP	Adenosina Trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC ₅₀	Concentração efetiva que causa 50% de inibição
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
kDNA	DNA do Cinetoplasto
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LIT	Liver Infusion-Tryptose
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LQFar	Laboratório em Química Farmacêutica
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
SBF	Soro Fetal Bovino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS.....	12
1.1.1 Objetivo geral.....	12
1.1.2 Objetivo específico	12
2. DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 JUSTIFICATIVA.....	13
2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.2.1 <i>Leishmania spp.</i>	14
2.2.2 Ciclo de vida.....	15
2.2.3 Epidemiologia	18
2.2.4 Tratamentos	19
2.2.5 Metronidazol.....	20
2.2.6 Eugenol.....	22
2.2.7 Híbridos e terapia combinada	24
2.3 METODOLOGIA.....	25
2.3.1 Compostos	25
2.3.2 Culturas de <i>Leishmania</i>	26
2.3.3 Curva de proliferação de amastigotas axênicos.....	26
2.3.4 Diferenciação de amastigotas axênicos	26
2.3.5 Teste anti-promastigota	27
2.3.6 Alteração da susceptibilidade.....	27
2.3.7 Análise estatística.....	28
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
2.4.1 Curva de proliferação	28
2.4.2 Ensaio de susceptibilidade	31
3 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae. O parasito, que infecta células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros, é transmitido pela picada de flebotomíneos, pertencente ao gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (WHO, 2025). A transmissão ocorre pela inoculação do parasito durante a picada da fêmea infectada do flebotomíneo (OMS, 2023; CDC, 2024) — protozoários do gênero *Leishmania*, que mantêm ciclo de vida heteróximo, alternando entre o vetor invertebrado (flebotomíneo) e o hospedeiro vertebrado/mamífero (CDC, 2024). Nesse processo, destacam-se duas formas evolutivas principais: a promastigota, flagelada e adaptada à sobrevivência no trato digestivo do flebotomíneo, e a amastigota, forma intracelular que prolifera no interior de células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado e é responsável pela manutenção da infecção (Teixeira *et al.*, 2013; CDC, 2024). Essa alternância entre formas permite ao parasita adaptar-se a ambientes distintos e constitui um dos pontos-chave para a compreensão da patogênese e das estratégias de controle da doença.

Com larga distribuição global, mais de um bilhão de pessoas encontram-se atualmente em áreas endêmicas da doença e sob risco de transmissão, de modo que essa se faz uma presente e preocupante questão de saúde pública no mundo, em especial, devido às populações serem majoritariamente de países subdesenvolvidos e de baixa renda social (WHO, 2023; CDC, 2020).

A leishmaniose manifesta-se em duas formas clínicas principais: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV). A LT pode ocorrer como leishmaniose cutânea localizada (LC), caracterizada por úlceras únicas ou múltiplas; como leishmaniose cutânea difusa (LCD), marcada pela disseminação das lesões e pela resposta imune inadequada; ou como leishmaniose mucocutânea (LMC), forma de maior relevância pela capacidade desfigurante, especialmente em regiões como boca, nariz e garganta. Já a LV constitui a forma mais grave da doença, pois compromete órgãos internos, incluindo fígado, baço e medula óssea, podendo levar ao óbito quando não tratada (Silva Santos *et al.*, 2021). A ocorrência dessas variações está relacionada à espécie do parasito, à resposta imunológica do hospedeiro e a fatores idiopáticos (WHO, 2023; KAYE; SCOTT, 2011; BURZA *et al.*, 2018). Do ponto de vista epidemiológico, todas apresentam relevância, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 1 bilhão de pessoas vivam em áreas endêmicas da doença, com

uma média anual de 1 milhão de novos casos de LT e 30 mil de LV (WHO, 2025).

Nesse contexto, o Brasil concentra a maior parte dos casos de leishmaniose visceral nas Américas ($\approx 94\%$) (OPAS, 2024) e figura entre os países com maior número de registros de leishmaniose tegumentar, sobretudo nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2025; BRASIL, [s.d.]). A espécie *Leishmania (L.) amazonensis* destaca-se por estar frequentemente relacionada a quadros crônicos e por representar um dos principais agentes das formas clínicas atípicas, como a LCD. Esta condição se caracteriza pela presença de lesões nodulares, não ulceradas, persistentes e de difícil resposta terapêutica, apresentando elevada resistência ao tratamento (FERREIRA *et al.*, 2024, p. 1; MARTINEZ; PETERSEN, 2014).

No Brasil, o tratamento da leishmaniose tegumentar continua baseado nos antimoniais pentavalentes, especialmente o antimonato de meglumina (Glucantime®), usados por via sistêmica ou intralesional. Embora eficazes, esses fármacos apresentam alta toxicidade, resposta clínica variável e registro de cepas resistentes (OPAS, 2022). Como alternativas, utilizam-se a anfotericina B e a pentamidina, cujo mecanismo envolve múltiplos alvos intracelulares. A pentamidina interfere no balanço de cálcio mitocondrial e no DNA do cinetoplasto, levando à desorganização da organela, além de retardar a transição de amastigotas para promastigotas e provocar perda do potencial de membrana e inibição da síntese de poliaminas (Fidalgo; Gille, 2011; Piccica *et al.*, 2021; Pramanik *et al.*, 2019; Chakravarty; Sundar, 2010). Outras opções incluem a miltefosina e a paromomicina, ambas eficazes, porém limitadas por efeitos adversos importantes, vias de administração complexas, surgimento de resistência e dependência da resposta imune do hospedeiro (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2017; MANN *et al.*, 2021).

Frente aos desafios associados ao tratamento da leishmaniose — como a toxicidade dos fármacos, dificuldade de administração e aumento da resistência parasitária —, destaca-se a importância de modelos experimentais que se aproximem da realidade biológica do parasita em seu hospedeiro, como amastigotas axênicas. Ainda que as promastigotas sejam amplamente utilizadas em ensaios laboratoriais, essa forma de vida não reflete tão fielmente o comportamento da amastigota intracelular, que é clinicamente mais relevante.

Dessa forma, o estudo avaliou se a diferenciação entre formas de *Leishmania (L.) amazonensis* influencia a resposta ao tratamento, analisando a ação da pentamidina e de compostos híbridos de eugenol e metronidazol sobre promastigotas e amastigotas axênicas (AA), bem como possíveis alterações no perfil de susceptibilidade *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral:

Determinar a mudança na susceptibilidade de *Leishmania (L.) amazonensis*, ao tratamento com pentamidina — droga de referência — e de compostos candidatos derivados de eugenol e metronidazol após mudança da forma de vida do parasita.

1.1.2 Objetivo específico:

- a) Determinar a curva de proliferação da cepa MHOM/BR/1973/M2269 de amastigotas axênicos de *Leishmania (L.) amazonensis*.
- b) Avaliar a atividade leishmanicida da pentamidina e de compostos candidatos derivados de eugenol e metronidazol contra promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, considerando parasitas tratados ou não, e que passaram, ou não, pela diferenciação entre as formas promastigota e AA.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma doença de grande impacto em saúde pública, classificada pela OMS como uma das enfermidades mais negligenciadas, colocando mais de 1 bilhão de pessoas em risco de infecção em todo o mundo. Diante desse cenário, torna-se urgente o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e realistas. Os ensaios farmacológicos convencionais utilizam predominantemente a forma promastigota de *Leishmania*, por sua facilidade de cultivo *in vitro*; contudo, essa forma não representa de maneira fidedigna a amastigota intracelular, responsável pela infecção em mamíferos e, portanto, clinicamente mais relevante. Nesse sentido, o uso de AA surge como uma alternativa promissora, permitindo estudos controlados sobre a fase amastigota sem a necessidade de modelos celulares complexos, embora ainda haja controvérsias quanto à sua real representatividade em relação às amastigotas intracelulares. Considerando esse contexto, investigar a susceptibilidade de *Leishmania (L.) amazonensis* à pentamidina e a compostos bioativos derivados do metronidazol e do eugenol, após a diferenciação entre promastigotas e amastigotas axênicas, torna-se essencial para compreender a plasticidade fenotípica do parasita, validar os modelos experimentais utilizados e padronizar ensaios *in vitro*. Esse conhecimento pode fornecer subsídios importantes para a triagem de novos fármacos e contribuir para a construção de estratégias terapêuticas mais eficazes e seguras no enfrentamento da leishmaniose.

2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

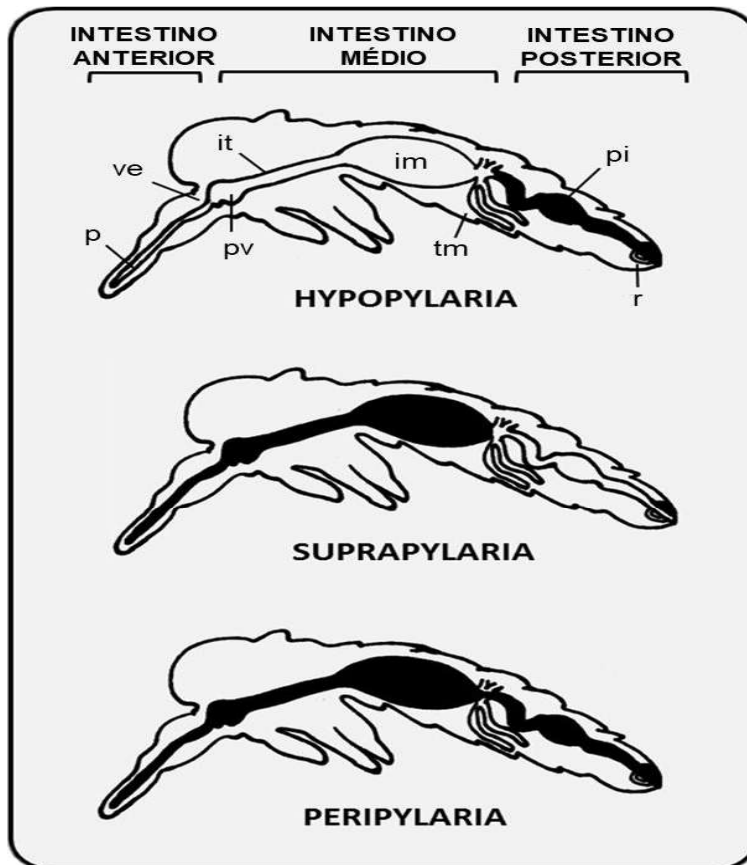
2.2.1 *Leishmania* spp.

O gênero *Leishmania* compreende protozoários flagelados que apresentam ciclo de vida heteroxeno, alternando entre hospedeiros vertebrados e flebotomíneos. Nos vertebrados, o parasita ocupa os fagolisossomos de células do sistema mononuclear fagocitário, enquanto nos insetos desenvolve-se no trato intestinal (SALLÂUM; TOKAJIAN; HIRT, 2021). Atualmente, o gênero *Leishmania* inclui pouco mais de 50 espécies distribuídas por regiões tropicais e subtropicais — Américas, bacia do Mediterrâneo, partes da Europa, Oriente Médio, Ásia e África (SANTARÉM; CARDOSO; CORDEIRO-DA-SILVA, 2023; OMS, 2023). Aproximadamente 30 espécies infectam mamíferos e cerca de 20 são patogênicas para humanos (CDC, 2025).

A classificação interna do grupo considera o local de desenvolvimento no intestino dos vetores, permitindo distinguir três subgêneros principais: *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Sauroleishmania*). Este último é restrito a répteis, como indica sua etimologia derivada de *saurus* (“lagarto”) (RAMÍREZ *et al.*, 2016, p. 2). Essa diferenciação não é meramente taxonômica, mas reflete adaptações moleculares e fisiológicas essenciais para que o parasita se estabeleça em ambientes intestinais distintos (KAUFER *et al.*, 2017, p. 8–10).

No caso das espécies do gênero *Sauroleishmania*, a colonização ocorre no intestino posterior do flebotomíneo, onde o parasita interage com receptores específicos e enfrenta condições particulares de acidez, disponibilidade de nutrientes e atividade enzimática. Já as espécies pertencentes a *Leishmania* e *Viannia* se desenvolvem predominantemente no intestino médio e anterior. A diferença entre elas é que o subgênero *Viannia* inicia o desenvolvimento nas paredes do piloro e íleo, enquanto as espécies de *Leishmania* permanecem restritas ao intestino médio (AKHOUNDI *et al.*, 2016, p. 18; KAUFER *et al.*, 2017, p. 8; SACKS, 2001, p. 2–3).

Figura 1 - Padrões de localização de *Leishmania* no trato digestório de flebotomíneos: hipopiária, supralária e peripilária.



Fonte: Adaptado de Kaufer *et al.*, 2017, p. 8. Nota – Abreviações: p - probóscide; pv - proventrículo; ve - ventrículo; it - intestino torácico; im - intestino médio; tm - túbulo de Malpighi; pi - piloro; r - reto.

Essas particularidades demandam alterações na estrutura da membrana lipídica, na produção de lectinas expostas na superfície e na ativação de estratégias de defesa contra o estresse oxidativo. Tais adaptações limitam tanto a variedade de vetores compatíveis quanto a possibilidade de infecção em hospedeiros que não sejam répteis (SACKS, 2001, p. 2–3).

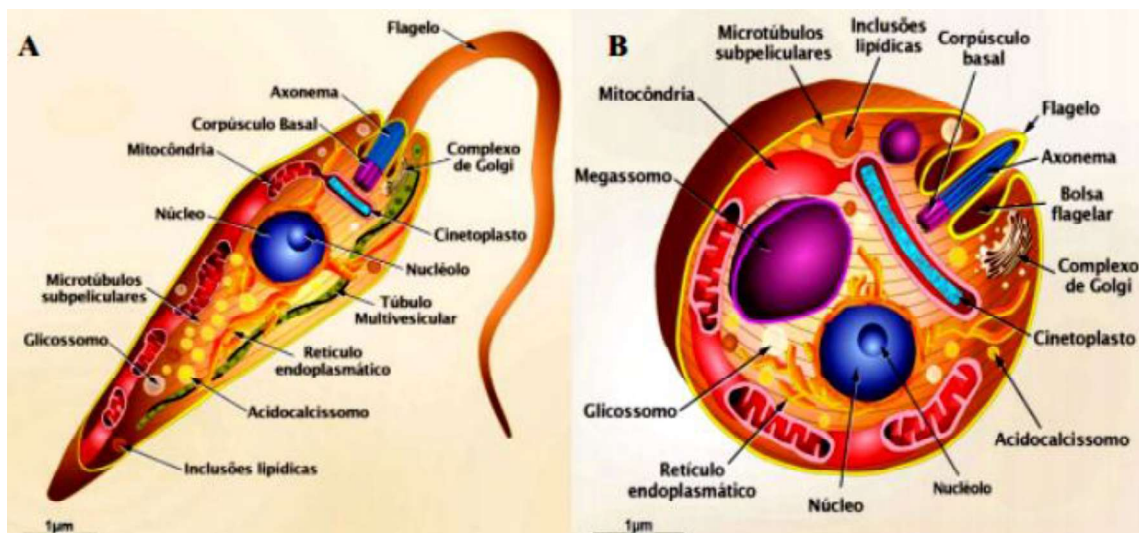
2.2.2 Ciclo de vida

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que possuem um ciclo de vida complexo e adaptado à alternância entre hospedeiros invertebrados e vertebrados. Esse ciclo é essencial para a compreensão da patogênese da doença e das estratégias de controle.

O protozoário do gênero *Leishmania* apresenta um ciclo de vida heteroxeno, no qual o parasito alterna entre duas formas de vida (Figura 2), uma para cada hospedeiro específico. Quando presente no interior do hospedeiro invertebrado da família *Psychodidae* (mosquito-palha), faz-se presente a forma móvel, promastigota do protozoário. Durante a inoculação do

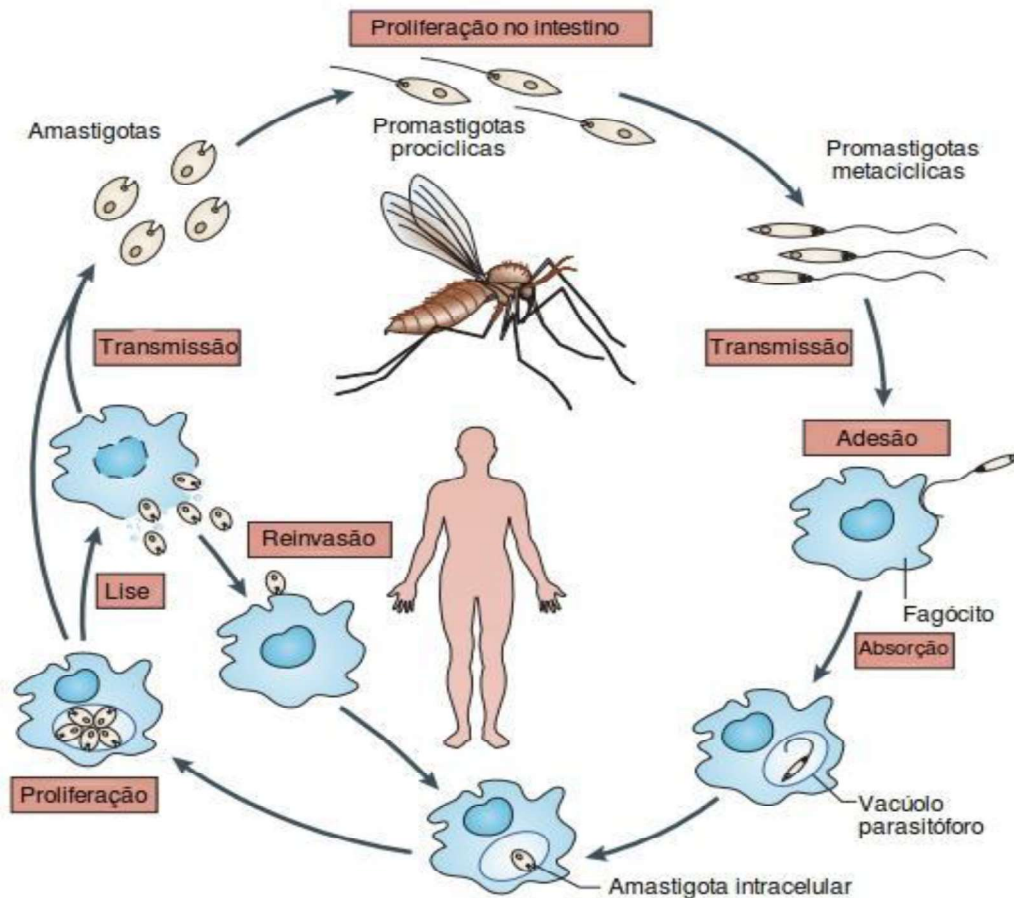
agente patógeno no hospedeiro mamífero, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema imune, este que tem sua resposta modulada pela picada do mosquito. Após a endocitose do parasito por macrófagos do hospedeiro, ocorre então uma diferenciação do primeiro para sua forma amastigota. Nesta forma celular, o protozoário inicia sua forma parasitária exclusivamente intracelular, residindo e se multiplicando no interior de vacúolos fagolisossomais. O ciclo de vida (Figura 3) se reinicia quando um novo repasto sanguíneo é realizado por outro flebotomíneo (CLOS *et al.*, 2022).

Figura 2 - Formas promastigota e amastigota de *Leishmania spp.*, destacando estruturas internas e organelas.



Fonte: Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013.

Figura 3 - Ciclo de vida de *Leishmania spp.*



Fonte: Adaptado de Kaye, 2011.

A transmissão da leishmaniose ocorre quando fêmeas de flebotomíneos infectadas realizam o repasto sanguíneo e inoculam no hospedeiro as formas promastigotas do parasita. Uma vez no organismo, esses promastigotas são englobados por macrófagos e outras células do sistema fagocítico mononuclear, onde sofrem diferenciação para a forma amastigota, responsável pela multiplicação intracelular e disseminação da infecção. A evolução clínica depende de características do protozoário, da resposta imune do hospedeiro e de fatores ambientais, podendo resultar em apresentações cutâneas ou viscerais. O inseto vetor, por sua vez, adquire o parasita ao ingerir células infectadas durante a alimentação; nesse ambiente, os amastigotas retornam à forma promastigota, proliferam no intestino do flebotomíneo — médio ou posterior, conforme o subgênero — e posteriormente migram para a probóscide, tornando o inseto novamente capaz de transmitir a doença (CDC, 2024).

Nesse contexto, é fundamental destacar os impactos da forma intracelular parasitária do protozoário causador da leishmaniose visceral nos hospedeiros mamíferos. A infecção compromete diretamente o sistema fagocítico mononuclear, o que pode levar, em alguns casos,

ao desenvolvimento de imunodepressão. Esse estado favorece o surgimento de infecções oportunistas por outros patógenos. Estudos recentes indicam que, durante a infecção por *Leishmania donovani*, células T CD4⁺ ativadas expressando o receptor CD200R são importantes fontes de IL-10, uma citocina anti-inflamatória que suprime a resposta imune e permite a persistência do parasita (SINGH *et al.*, 2024). Além disso, observou-se que a infecção crônica promove exaustão funcional das células T CD4⁺, evidenciada pela expressão de receptores inibitórios como PD-1, LAG-3 e TIM-3, o que prejudica sua atividade efetora (JAYAKUMAR *et al.*, 2018; SAKTHIANANDAVEL *et al.*, 2022).

2.2.3 Epidemiologia

De acordo com o Ministério da Saúde, o Brasil registra, em média, cerca de 2.000 casos de LV por ano, sendo esta responsável por considerável morbimortalidade, especialmente nas regiões norte e nordeste (BRASIL, 2024a). Já a LT apresenta uma média anual de aproximadamente 21.000 casos, com maior concentração na região norte e distribuição endêmica em diversas áreas do país (BRASIL, 2024b).

Tendo em vista tais aspectos, a razão pelo elevado número de infecções da leishmaniose se dá em virtude desta se tratar de uma doença endêmica de regiões úmidas e tropicais, com foco especial para regiões pobres, densamente povoadas ou com más condições de saúde e moradia (WHO, 2023).

Além disso, o parasito se apresenta em mais de 20 espécies diferentes, com variadas formas de manifestação clínica e tratamentos, somados ao grande número de vetores possíveis (pelo menos cinco gêneros diferentes do mosquito são capazes de transmitir o protozoário para o ser humano) (ALEMAYEHU, 2017).

No Brasil, em 2023 foram registrados 1.556 casos de leishmaniose visceral (LV), com predomínio no sexo masculino e maior frequência em crianças (especialmente <10 anos), além de maior concentração no Nordeste (FIOCRUZ, 2024). A coinfeção LV-HIV permanece relevante e associada a piores desfechos, com proporções observadas em estudos brasileiros variando de 3% a 6% (SOUSA-GOMES *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2024). Esses achados recaem, em grande parte, sobre populações vulneráveis; a região Nordeste reúne, historicamente, os menores valores de IDHM do país (PNUD, 2021).

2.2.4 Tratamentos

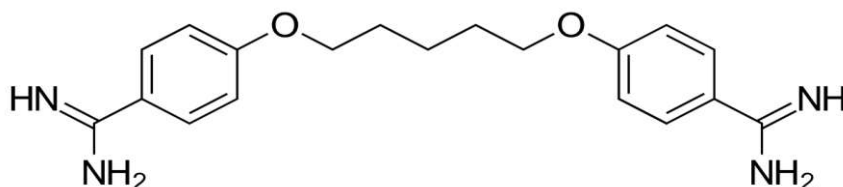
No Brasil, os medicamentos mais utilizados no tratamento da leishmaniose cutânea são os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B lipossomal, cuja eficácia já foi amplamente demonstrada. No entanto, ambos os fármacos apresentam limitações significativas relacionadas ao perfil de toxicidade e às condições de administração (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2017). Os antimoniais pentavalentes, comercializados sob o nome Glucantime® ou Glucantim®, ainda não têm seu mecanismo de ação completamente esclarecido, sendo considerada uma atuação multifatorial. Atuam, como pró-fármacos: para exercerem efeito, precisam ser reduzidos de Sb^{5+} para Sb^{3+} por vias enzimáticas do próprio parasita (Pramanik *et al.*, 2019, p. 3). O Sb^{3+} , em concentrações elevadas, bloqueia etapas do metabolismo energético, inibindo tanto o catabolismo da glicose quanto a oxidação de ácidos graxos, o que culmina em queda na produção de ATP. Além disso, o fármaco altera a função mitocondrial, promovendo aumento de EROs (espécies reativas de oxigênio) e comprometendo o sistema antioxidante tiol-dependente do parasito — com efluxo e a inibição de tióis, em especial da tripanotiona (Aït-Oudhia *et al.*, 2011, p. 2; Goto; Lindoso, 2010). O regime terapêutico envolve aplicações injetáveis diárias, com duração entre 10 a 30 dias, frequentemente associado a tratamentos tópicos ou orais (BRASIL, 2017). Durante esse período, são comuns reações adversas, exigindo monitoramento clínico rigoroso, principalmente em função do aumento das enzimas hepáticas e pancreáticas, indicativo de citotoxicidade, além de alterações cardíacas como arritmias decorrentes do prolongamento do intervalo QT no eletrocardiograma (FRÉZARD *et al.*, 2017).

De forma semelhante, a anfotericina B, empregada como opção terapêutica nos casos de resistência ou intolerância aos antimoniais, também apresenta desafios importantes, tanto pela complexidade de administração quanto pelo alto custo e notável toxicidade. É frequente a necessidade de interrupção do tratamento em virtude de efeitos adversos, sendo a nefrotoxicidade um dos principais, com potencial risco de falência renal (MANN *et al.*, 2021; MCGWIRE e SATOSKAR, 2014). O mecanismo de ação da anfotericina B está associado à ligação com o ergosterol presente na membrana do parasita, promovendo a formação de poros e subsequente extravasamento do conteúdo citoplasmático, o que culmina na morte celular (LANIADO-LABORÍN e CABRALES-VARGAS, 2009).

Uma alternativa farmacológica é a pentamidina (Figura 4), cuja ação também é considerada multifatorial dentro do parasita. Há evidências que a droga interage com o balanço de cálcio mitocondrial e com o DNA do cinetoplasto (kDNA), — em regiões ricas em adenina e timina —, resultando em desestruturação da organela (Fidalgo; Gille, 2011, p. 8). Estudos

experimentais também indicam que o fármaco interfere no ciclo de vida de *Leishmania (L.) amazonensis*, retardando a transição de amastigotas para promastigotas (Piccica *et al.*, 2021, p. 8; Pramanik *et al.*, 2019, p. 4). Além disso, a pentamidina altera de forma marcante a estrutura mitocondrial, promovendo a perda do potencial de membrana e inibindo a síntese de poliaminas — processos indispensáveis à viabilidade do parasita (Chakravarty; Sundar, 2010, p. 9). Apesar da eficácia, o uso de pentamidina é restrito pelo perfil de segurança: reações imediatas como hipotensão e náuseas são descritas, além de toxicidade pancreática com hipoglicemia (inclusive tardia) e, menos frequentemente, hiperglicemia; há ainda relatos de nefrotoxicidade, arritmias e pancreatite, o que exige monitorização glicêmica, hemodinâmica e eletrocardiográfica durante e após as aplicações. Revisões e diretrizes clínicas recentes reforçam que a droga deve ser empregada com cautela e com acompanhamento laboratorial devido à frequência de eventos adversos. (HAFIZ; KYRIAKOPOULOS, 2025; ZHANG *et al.*, 2025; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Diante desse cenário, torna-se evidente a necessidade de desenvolvimento de novas terapias mais seguras e eficazes, especialmente voltadas para populações vulneráveis afetadas pela leishmaniose no Brasil.

Figura 4 - Estrutura do fármaco Pentamidina.



Fonte: Software ACD/ChemSketch.

2.2.5 Metronidazol

O metronidazol (1-(β -hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol) é um antibiótico e antiparasitário sintético derivado do nitroimidazol azomicina (produzida pelas bactérias dos filos Actinobacteria e Proteobacteria), que foi sintetizado e descrito pela primeira vez no ano de 1959. Foi usado inicialmente no tratamento de tricomoníase, infecção causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis*. Além disso, é referência no tratamento contra os protozoários *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. Novas propriedades terapêuticas do metronidazol foram descobertas posteriormente, sendo usado atualmente no tratamento de infecções causadas por Bacteroides, Fusobacteria e Clostridia, rosácea, e em infecções orais,

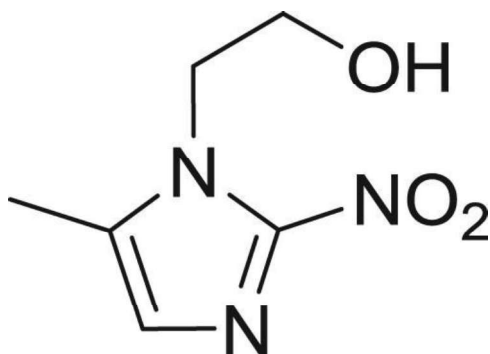
dentais, ginecológicas, do trato respiratório, de ossos e articulações, endocardite e septicemia. Também pode ser usado como profilaxia antes ou depois de cirurgias e no tratamento de doença de Crohn (CERUELOS *et al.*, 2019).

Os 5-nitroimidazóis utilizados na terapêutica humana são substâncias que possuem ações antiparasitárias e antimicrobianas, tendo sido o metronidazol o primeiro fármaco deste grupo a ser introduzido no tratamento de humanos, e mesmo após tantas décadas, ainda é considerado um dos principais representantes do grupo (TAVARES, 2014).

Metronidazol é um medicamento de baixo custo, possui uma boa penetração nos tecidos e apresenta efeitos colaterais relativamente leves. As reações adversas mais comuns são: dores abdominais, náuseas, diarreia, neutropenia reversível, urticária, urina escura e ardor vaginal e uretral. As principais reações no sistema nervoso central são: vertigem, neuropatia periférica, dor de cabeça e ataxia. Em casos raros, neuropatia periférica, neuropatia óptica e encefalopatia foram relatados. Atualmente, o uso terapêutico de metronidazol tem sido associado a neurotoxicidade e genotoxicidade, entretanto, seus efeitos colaterais ainda precisam ser bem estabelecidos (CERUELOS *et al.*, 2019).

O mecanismo de ação do metronidazol resulta da ligação de produtos intermediários (que são originários de sua redução intracelular) com o DNA, formando assim, complexos que inativam o DNA e inibem sua replicação, o que impede as sínteses enzimáticas e causa morte celular. Este fármaco possui ação seletiva sobre microrganismos e parasitas anaeróbios, devido a presença de um sistema de proteínas de baixo potencial de oxirredução nestes agentes infecciosos (semelhante à ferredoxina), que reduz o metronidazol a produtos intermediários que possuem ação tóxica e são os responsáveis pela atividade antimicrobiana. Os germes aeróbios possuem insensibilidade ao metronidazol, já que não são capazes de reduzir o fármaco. O uso isolado do fármaco metronidazol se mostrou ineficaz no tratamento da Doença de Chagas em humanos (TAVARES, 2014). Entretanto, faltam experimentos que demonstrem sua eficácia após hibridização molecular e em terapias combinadas.

Figura 5 - Estrutura do Metronidazol.



Fonte: TURSYNBOLAT, 2018.

2.2.6 Eugenol

O eugenol (2-metoxi-4-prop-2-enilfenol) é um composto fenólico natural, com fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$, amplamente presente nos óleos essenciais de diversas plantas, sendo o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) a sua principal fonte. Também pode ser encontrado em especiarias como canela, noz-moscada, manjeriço e louro. Estruturalmente, apresenta um anel aromático com grupos hidroxila e metoxi, além de uma cadeia lateral alílica, características que lhe conferem propriedades químicas e farmacológicas marcantes (NISAR *et al.*, 2021).

Inicialmente, o eugenol foi incorporado principalmente na odontologia, como componente dos cimentos de óxido de zinco-eugenol, em virtude de sua ação analgésica e antimicrobiana. Com o tempo, seu uso se expandiu para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, sendo empregado como flavorizante, conservante e agente terapêutico (NISAR *et al.*, 2021). Em práticas tradicionais, também está associado ao alívio de distúrbios gastrointestinais, como náuseas, indigestão e diarreia (RAJA, 2017).

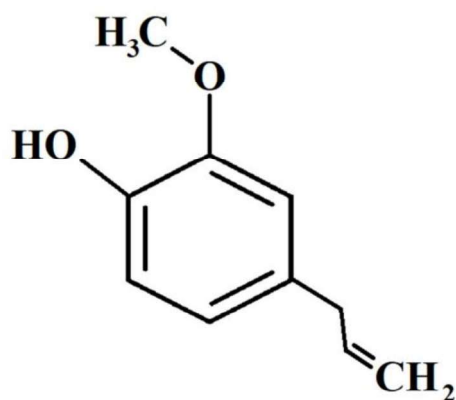
Do ponto de vista farmacológico, o eugenol apresenta um amplo espectro de atividades, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, antiparasitários, analgésicos e antitumorais (ULANOWSKA *et al.*, 2021). Os mecanismos de ação propostos são multifatoriais: o composto pode promover alterações na permeabilidade das membranas celulares, levando ao extravasamento de íons e conteúdos intracelulares; pode inibir enzimas de membrana, como as ATPases; além de induzir estresse oxidativo, que resulta em apoptose em células-alvo (NISAR *et al.*, 2021).

Em relação à atividade antiparasitária, estudos recentes confirmam a eficácia do eugenol contra diferentes espécies de *Leishmania*. Ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que emulsões

à base de eugenol apresentam forte efeito leishmanicida frente a *Leishmania (L.) donovani*, promovendo redução da carga parasitária e estimulando a resposta imune do hospedeiro, com aumento da produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (ISLAMUDDIN *et al.*, 2016). Além disso, investigações com derivados sintéticos evidenciaram resultados superiores aos obtidos com o Glucantime®, fármaco de referência no tratamento da leishmaniose (TEIXEIRA *et al.*, 2018). Pesquisas também apontam que o óleo essencial rico em eugenol de *Ocimum gratissimum* apresentou atividade contra *Leishmania (L.) amazonensis*, afetando tanto formas promastigotas quanto amastigotas, com alterações estruturais significativas no protozoário (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006). De forma semelhante, derivados como o eugenol oleato, em associação com anfotericina B ou miltefosina, demonstraram efeito sinérgico, aumentando a eficácia terapêutica em modelos experimentais de LV (KAR *et al.*, 2021; MOHAMADI *et al.*, 2025).

Apesar de geralmente classificado como seguro em baixas doses, o eugenol pode causar toxicidade hepática, irritação de mucosas e efeitos neurológicos quando utilizado em concentrações elevadas ou por tempo prolongado. Por isso, embora apresente grande potencial farmacológico, é necessária cautela quanto ao seu uso em terapias prolongadas e em combinação com outros fármacos, reforçando a importância de estudos toxicológicos adicionais (NISAR *et al.*, 2021; ULANOWSKA *et al.*, 2021).

Figura 6 - Estrutura do Eugenol.



Fonte: adaptado de ULANOWSKA; OLAS (2021).

2.2.7 Híbridos e terapia combinada

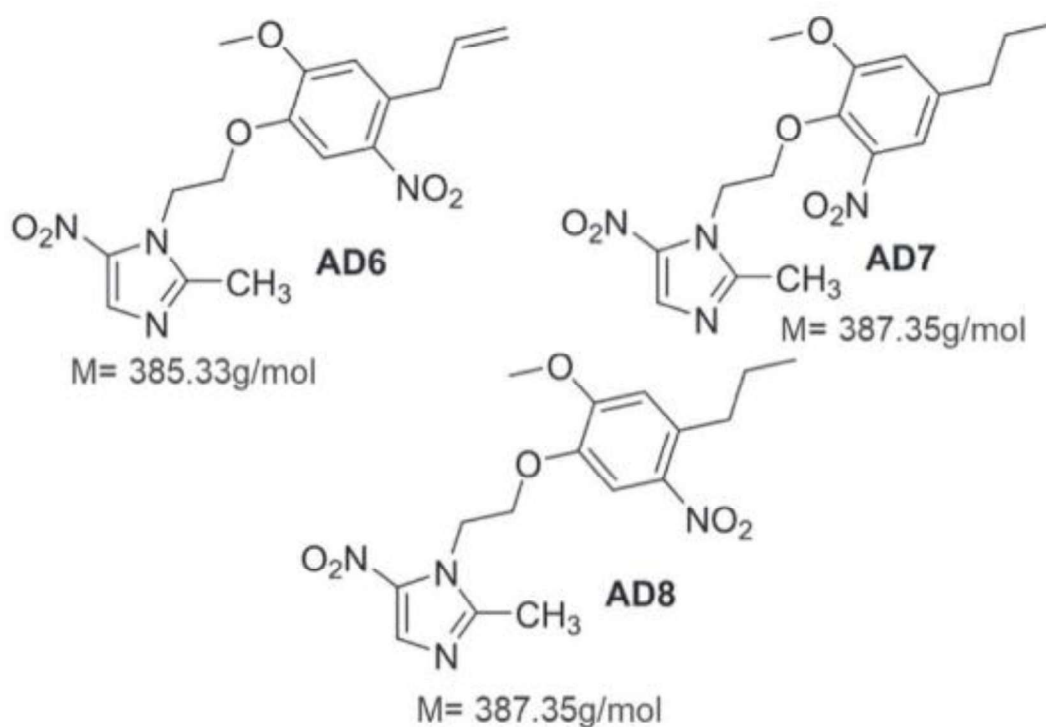
Uma abordagem promissora no desenvolvimento de novos agentes contra doenças negligenciadas, como a leishmaniose, é a hibridização molecular, na qual fragmentos farmacofóricos de diferentes compostos são combinados em uma única molécula híbrida. Essa técnica é especialmente relevante em protozooses, pois pode gerar compostos com múltiplos alvos de ação, maior eficácia e seletividade, além de reduzir os efeitos adversos em comparação aos fármacos originais isolados (VIEGAS-JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2007). Por exemplo, Pelozo *et al.* (2024) uniram metronidazol a análogos do eugenol por meio de química de clique baseada em triazóis, originando híbridos com eficácia antiparasitária aumentada e perfil toxicológico favorável. Resultados semelhantes também têm sido observados em outros derivados triazólicos aplicados contra parasitas do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, indicando que esse tipo de estratégia pode ser amplamente explorado (Pelozo *et al.*, 2024). Paralelamente, a terapia combinada — administração de múltiplos compostos bioativos — vem se consolidando como uma alternativa eficaz na LV. Ensaio clínicos e revisões recentes destacam que combinações de diferentes classes de fármacos podem resultar em regimes terapêuticos mais curtos, seguros e com menor risco de resistência parasitária (VAN GRIENSVEN *et al.*, 2024). Além disso, análises anteriores já reconheciam essa abordagem como uma das últimas opções úteis diante da crescente resistência aos fármacos convencionais (ASM, 2014). Nesse cenário, a combinação ou hibridização entre o metronidazol, que apresenta ação frente a protozoários anaeróbios, e o eugenol, um composto fenólico com comprovada atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e leishmanicida, representa uma linha de investigação altamente relevante para o desenvolvimento de terapias inovadoras, seguras e eficazes contra a leishmaniose.

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Compostos

Os compostos testados neste trabalho, híbridos do metronidazol e eugenol (AD06, AD07, AD08), foram sintetizados pela doutoranda Ana Laura Marques Trinca e o Prof. Lucas Lopardi Franco, do Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. A síntese foi feita a partir do acoplamento direto por eterificação entre as subunidades do metronidazol e eugenol, sendo os produtos fornecidos para a realização dos testes.

Figura 7 - Estrutura química dos compostos híbridos do eugenol e metronidazol.



Fonte: Pelozo *et al.*, 2024

A pentamidina foi utilizada como fármaco de referência nos ensaios desta pesquisa, composto 4-[5-(4-carbamimidofenoxi) pentoxi] benzenocarboximidamida (nomenclatura IUPAC), de fórmula molecular $C_{19}H_{24}N_4O_2$. Sua escolha se justifica por ser uma das principais alternativas terapêuticas para a leishmaniose cutânea, com eficácia reconhecida, embora limitada pela ocorrência de efeitos tóxicos. Conforme relatado por Piccica *et al.* (2021), o

fármaco apresenta atividade contra diversas espécies de *Leishmania*, incluindo *L. (L.) amazonensis*, o que sustenta seu emprego como padrão comparativo nos testes de atividade leishmanicida.

2.3.2 Culturas de *Leishmania*

Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269 e IFLA/BR/1967/PH8) foram cultivados em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) pH 7.4 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco), 0.1% de hemina bovina e 4% de urina masculina humana estéril. As culturas foram mantidas a 26°C em garrafas de 25cm² e 4mL de meio de cultura. Passagens foram feitas regularmente a cada 7 dias. Nenhuma cultura com mais de 10 passagens foi utilizada nos experimentos. Para AA foi utilizado o meio 199, em pH 7.2 e 4.8, suplementado com 15% de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina, 10mM de adenina, 0.1% de hemina bovina e 4% de urina masculina humana estéril. (VICTOR *et al.*, 2025).

2.3.3 Curva de proliferação de amastigotas axênicos

A curva de proliferação foi feita a partir de um inóculo inicial de $1,7 \cdot 10^6$ céls/mL de culturas de 7 dias em uma placa de 24 poços. O número de células foi contado diariamente a partir de poços diferentes, utilizando uma câmara de Neubauer, até o 10º dia em meio à cultura 199. (Miguel *et al.*, 2013).

2.3.4 Diferenciação de amastigotas axênicos

Promastigotas em fase estacionária de crescimento (7 dias) em meio 199 pH 7.2 tiveram metade do volume das culturas foi substituído por fração igual de meio 199 pH 4.8 e incubadas *overnight* a 26°C. Após incubação, 80% do volume foi substituído por meio 199 pH 4.8 e culturas foram então incubadas a 32.8°C. 4 dias após a incubação, os AA foram lavados em PBS (3000 rpm e 4°C) e contados em uma câmara de Neubauer para confirmação da morfologia característica (Miguel *et al.*, 2013, p. 2).

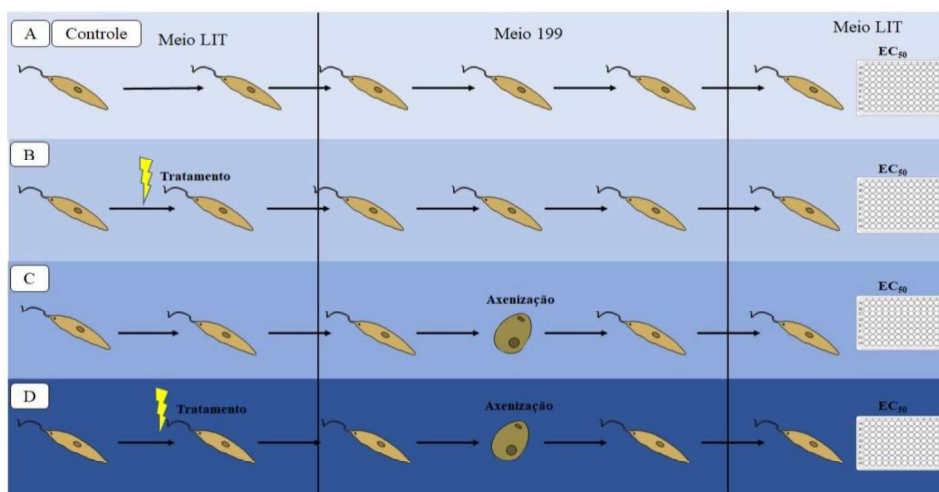
2.3.5 Teste anti-promastigota

A fim de determinar a concentração necessária para produzir 50% do efeito máximo esperado (EC_{50}) dos compostos avaliados, promastigotas em fase *log* de crescimento foram lavados em PBS (3000 rpm e 4°C), ressuspensos em 4mL de meio LIT e contados em uma câmara de Neubauer. Células foram então tratadas (1×10^6 céls/poço) em uma placa de 96 poços com compostos (100 a 0,7 ug/mL), solubilizados em DMSO estéril e incubadas por 72h a 26°C. A viabilidade celular foi avaliada pelo método da resazurina. Após a incubação, 20uL de resazurina na concentração de 3mM foi adicionado aos poços e a placa foi incubada novamente por 5 horas. Em seguida, a absorbância foi quantificada a 570 e 600 nm, em um espectrofotômetro (Modelo: Epoch – Biotek). (ALVES *et al.*, 2024)

2.3.6 Alteração da susceptibilidade

Para investigar a alteração da susceptibilidade, promastigotas em fase *log* de crescimento foram tratados ou não com compostos e incubados por 72h a 26°C. Em seguida, os promastigotas foram lavados em PBS (3000 rpm a 4°C) e transferidos para o meio 199 pH 7.2, a partir disso, quatro grupos experimentais foram delineados (Figura 8), com dois diferentes parâmetros, o pré-tratamento e a axenização. Obtiveram-se então os grupos: controle duplo negativo (A), grupo tratado (B), grupo axenizado (C), grupo tratado e axenizado (D). Amastigotas diferenciadas foram mantidas por 7 dias a 32.8°C, enquanto as promastigotas permaneceram a 26°C. Após o período, todas as células foram lavadas e transferidas novamente para o meio LIT. Finalmente, as células foram novamente tratadas com os compostos e a viabilidade celular avaliada pelo método da resazurina.

Figura 8 - Esquema representativo das condições e parâmetros utilizados no ensaio de susceptibilidade.



Fonte: Do autor (2025).

2.3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando regressão não linear para obter os valores de EC_{50pro}, seguida pelos testes de Tukey e análises de variância. As diferenças nos valores de EC_{50pro} e entre o fármaco padrão e os compostos foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

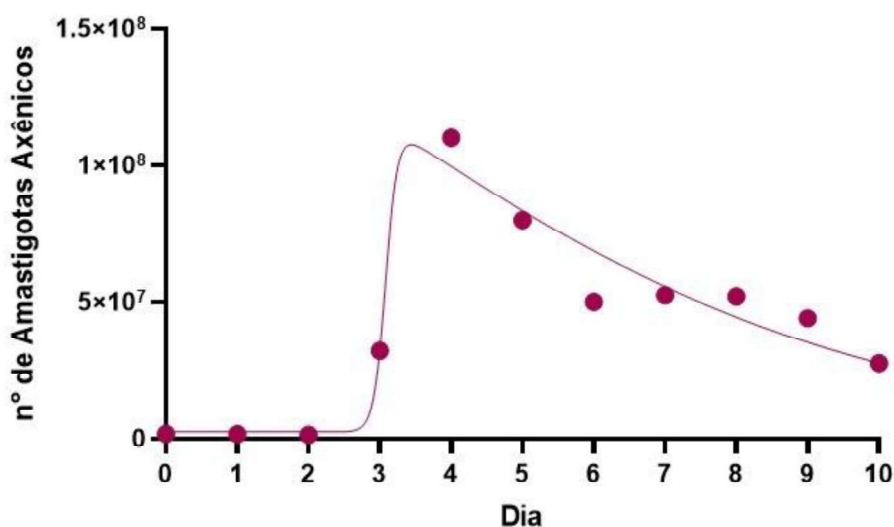
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Curva de proliferação

A curva de proliferação obtida para as AA de *Leishmania (L.) amazonensis* (Figura 9) evidencia um padrão de crescimento compatível com o modelo experimental. Observa-se uma fase de latência (*lag*) até aproximadamente o terceiro dia, período correspondente à transformação morfológica e metabólica de promastigotas (sinais nítidos de metaciclogênese, células alongadas, com corpo fusiforme, flagelo livre proeminente e alta motilidade) (Figura 10), para AA (Figura 11). Nessa etapa, os parasitos gradualmente assumem morfologia ovalada, com flagelo reduzido ou ausente, núcleo central e cinetoplasto deslocado lateralmente, acompanhados de uma reorganização mitocondrial e metabólica que favorece o catabolismo oxidativo.

Ao término dessa transição, as células entram em fase logarítmica de multiplicação ativa, atingindo o pico de crescimento entre o terceiro e o quarto dia, momento em que a população é mais homogênea e metabolicamente estável. A partir do quinto dia, observa-se uma queda acentuada na densidade celular, mas que se mantém estável até o nono dia, marcando o início da fase estacionária e subsequente declínio, o que reflete a limitação intrínseca do sistema axênico.

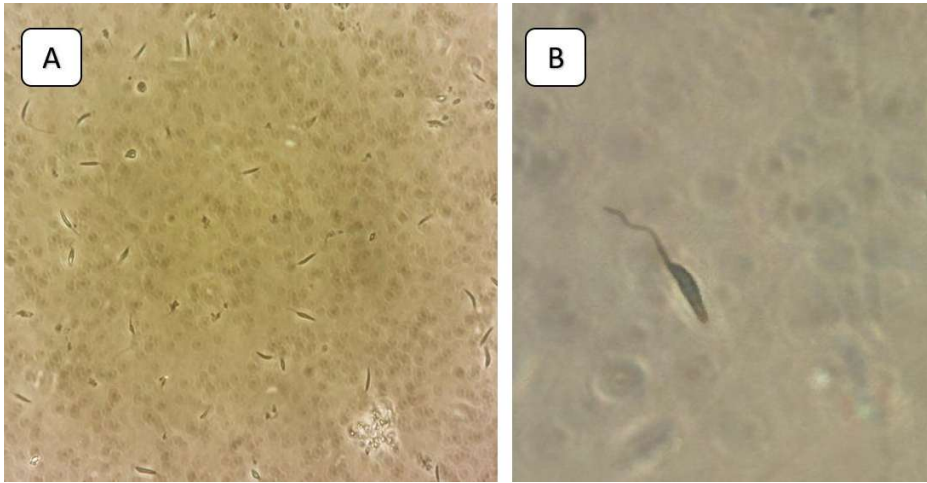
Figura 9 - Curva de Crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis* amastigotas axênicas.



Fonte - Do autor (2025).

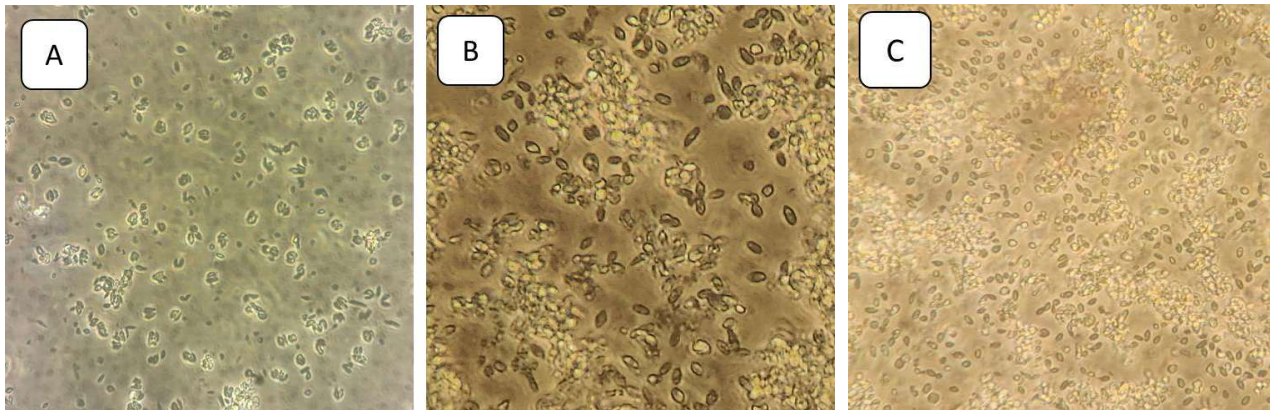
Essa queda abrupta é amplamente relatada na literatura (Dias-Lopes *et al.*, 2021; Pacakova *et al.*, 2022) e decorre do fato de que o meio axênico não reproduz as condições microambientais do vacúolo parasitóforo, com interação contínua com o metabolismo do macrófago. Essa discrepância impõe restrição natural à longevidade da cultura, o que tornou inviável a manutenção prolongada ou repiques sucessivos sem perda de características amastigotas. Por outro lado, tal limitação define com precisão a janela experimental ideal — entre o terceiro e o quinto dia —, quando as amastigotas se encontram viáveis, metabolicamente ativas e mais fenotipicamente similares à forma intracelular, justificando seu uso em ensaios de susceptibilidade e triagem de compostos.

Figura 10 - Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, em fase estacionária da curva de crescimento.



Fonte: Do autor (2025). Nota – A: Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269 em fase estacionária, observadas com sinais de metaciclôgênese; B – Amplificação da imagem de Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269 em fase estacionária, observadas com sinais de metaciclôgênese.

Figura 11 - Amastigotas axênicos de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, em diferentes estágios de diferenciação.



Fonte: Do autor (2025). Nota - A: Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, no primeiro dia de diferenciação; B - Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, no terceiro dia de diferenciação; C - Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa M2269, no quinto dia de diferenciação.

Para *Leishmania*, a fase *lag* representa o período de adaptação das promastigotas ao meio, durante o qual há intensa atividade metabólica, mas pouca divisão celular. Na fase logarítmica (ou exponencial), observa-se a máxima taxa de multiplicação, associada à alta disponibilidade de nutrientes e estabilidade físico-química do meio (Arjmand *et al.*, 2016, p. 1; Jara *et al.*, 2022, p. 6). Já a fase estacionária se caracteriza pela redução da taxa de divisão, reflexo do esgotamento parcial dos nutrientes e do acúmulo de metabólitos ácidos, enquanto o número total de células se mantém relativamente constante. Por fim, a fase de declínio indica a perda de viabilidade celular, reflete a limitação intrínseca do sistema axênico. (Howell *et al.*,

2024, p. 2; Jara *et al.*, 2022, p. 1). Assim, o reconhecimento dessas fases é essencial para a padronização de ensaios biológicos, uma vez que a resposta a fármacos e a capacidade de diferenciação do parasito variam de forma significativa entre elas (Arjmand *et al.*, 2016, p. 2).

2.4.2 Ensaio de susceptibilidade

Com o objetivo de verificar se o histórico de exposição ou o processo de diferenciação interferiam na resposta aos compostos, foram realizados ensaios comparativos de susceptibilidade. Para isso, as promastigotas foram distribuídas em quatro grupos experimentais: (A) Controle – promastigotas sem manipulação prévia, mantidas no mesmo meio de cultura que os demais grupos, com passagens a cada 7 dias, utilizadas em ensaio de EC₅₀; (B) Tratamento – promastigotas previamente expostas ao EC₅₀ dos compostos (Tabela 1), e posteriormente reavaliadas; (C) Axenização – promastigotas submetidas à diferenciação em AA e reconvertidas para promastigotas antes da avaliação; (D) Tratamento + axenização – combinação dos dois fatores anteriores. Após cada condição, a susceptibilidade foi avaliada por meio da determinação dos valores de EC₅₀ (Tabela 2).

Nos ensaios realizados, observou-se que os híbridos AD06, AD07 e AD08 apresentaram perfis semelhantes de susceptibilidade em todas as condições experimentais, embora com pequenas variações entre eles. O grupo controle, que representou os promastigotas não expostos previamente ao composto, apresentou valores basais de EC₅₀ intermediários, refletindo a susceptibilidade dos parasitas a esses híbridos. Esse perfil basal serviu de referência para as comparações subsequentes.

Tabela 1 - Média dos valores da concentração efetiva de 50% contra promastigotas (EC₅₀) (µg/mL) dos compostos analisados, antes de serem expostos ao tratamento de promastigotas *Leishmania (L.) amazonensis*.

	AD06	AD07	AD08	PENTAMIDINA
EC ₅₀	9.320ug/mL	8.780ug/mL	8.580ug/mL	1.030ug/mL

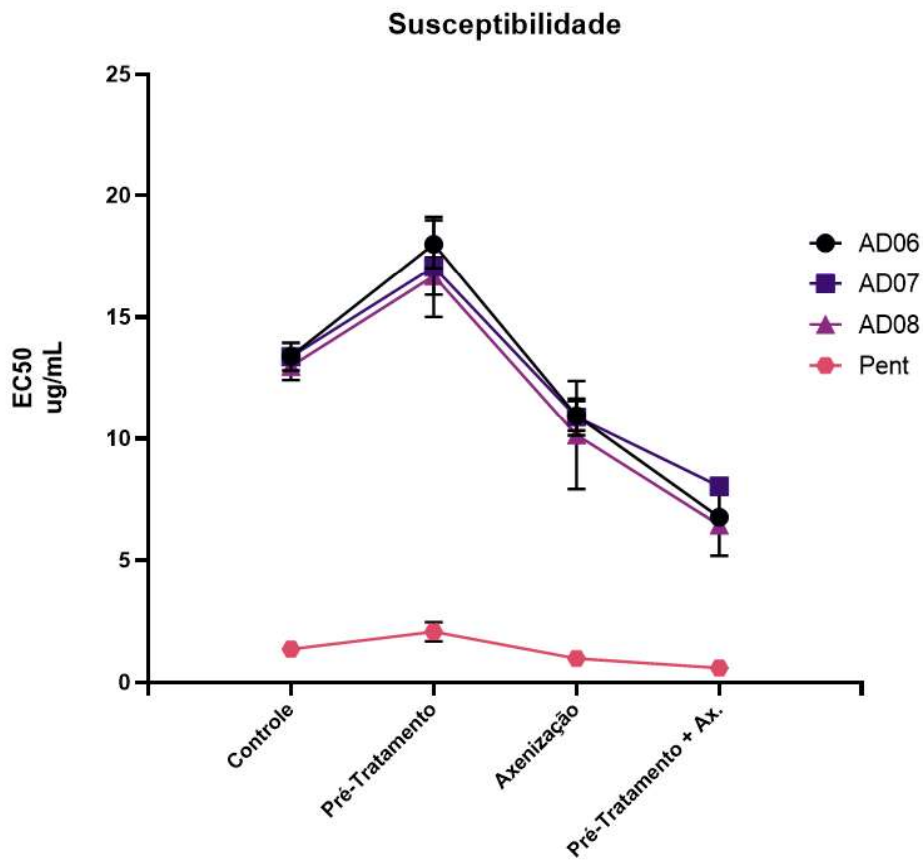
Fonte: Do autor (2025).

Tabela 2 - Média dos valores da concentração necessária para produzir 50% do efeito máximo esperado (EC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$) dos híbridos AD06, AD07 e AD08 e do fármaco de referência (pentamidina) em diferentes condições experimentais (Controle, tratamento, Axenização e tratamento + Axenização).

	AD06	AD07	AD08	PENTAMIDINA
Controle	13,40 $\mu\text{g/mL}$	13,38 $\mu\text{g/mL}$	12,99 $\mu\text{g/mL}$	1,37 $\mu\text{g/mL}$
Tratamento	18,00 $\mu\text{g/mL}$	17,07 $\mu\text{g/mL}$	16,70 $\mu\text{g/mL}$	2,08 $\mu\text{g/mL}$
Axenização	10,95 $\mu\text{g/mL}$	10,90 $\mu\text{g/mL}$	10,16 $\mu\text{g/mL}$	0,99 $\mu\text{g/mL}$
Tratamento + Axenização	6,79 $\mu\text{g/mL}$	8,05 $\mu\text{g/mL}$	6,46 $\mu\text{g/mL}$	0,59 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: Do autor (2025).

Figura 12 - Susceptibilidade de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* frente ao tratamento e a alteração na forma de vida.



Fonte: Do autor (2025).

No grupo submetido ao tratamento, verificou-se um aumento significativo do EC₅₀ em relação ao controle. Esse achado sugere que a exposição prévia ao composto induziu uma tolerância transitória nos promastigotas, fenômeno já descrito em diferentes espécies de *Leishmania*. De acordo com a literatura, essa tolerância pode ocorrer por múltiplos mecanismos adaptativos, incluindo o aumento da expressão de transportadores de efluxo, que reduzem a concentração intracelular da droga, e a modulação da captação, que dificulta sua entrada no parasita. Além disso, há evidências de que *Leishmania* pode intensificar sua resposta antioxidante, aumentando os níveis de glutathiona e tripanotiona, moléculas centrais para neutralização de espécies reativas de oxigênio, reduzindo assim o dano oxidativo provocado por compostos leishmanicidas (ROY *et al.*, 2024). Outro fator relevante é a plasticidade genômica característica do gênero, capaz de gerar amplificações cromossômicas e alterações de expressão gênica em curto espaço de tempo, permitindo ajustes rápidos frente a pressões químicas (MONCADA-DÍAZ *et al.*, 2024; LEPROHON *et al.*, 2015). Tal resposta sugere o aumento do EC₅₀ observado nesse grupo, refletindo um estado de tolerância induzida que, embora não represente resistência genética estável, compromete temporariamente a eficácia dos compostos (JARA *et al.*, 2023).

Por outro lado, quando os parasitas foram diferenciados em AA, houve uma redução do EC₅₀ em comparação ao grupo submetido apenas ao tratamento. Essa queda de suscetibilidade pode ser atribuída às profundas mudanças fisiológicas e metabólicas que ocorrem durante a diferenciação. A transição de promastigota para amastigota é desencadeada por fatores como o aumento da temperatura e o pH ácido, reproduzindo o ambiente do fagolisossomo do macrófago hospedeiro. Esse processo envolve a perda do flagelo, reorganização da membrana celular, alteração no metabolismo energético e maior dependência de vias oxidativas. Tais transformações reconfiguram a interação do parasita com o fármaco, podendo torná-lo mais vulnerável em virtude da diminuição da capacidade de detoxificação antioxidante, da maior permeabilidade da membrana ao composto e da exposição de alvos metabólicos mais sensíveis na fase amastigota (CLOS *et al.*, 2022). Estudos prévios corroboram que a fase amastigota é, em muitos casos, mais suscetível a compostos leishmanicidas do que a promastigota, ressaltando a importância de incluir esse modelo nas triagens (ROY *et al.*, 2024).

O grupo que combinou o tratamento seguido da axenização apresentou o resultado mais expressivo: uma redução ainda maior do EC₅₀, atingindo os menores valores entre todas as condições. Essa observação sugere que o processo de diferenciação pode “quebrar” os mecanismos de tolerância previamente adquiridos, expondo o parasita a um estado de maior vulnerabilidade. É possível que as adaptações induzidas pela exposição prévia, como o aumento

da atividade antioxidante ou de transportadores de efluxo, não sejam sustentadas após a reorganização fisiológica necessária para a diferenciação em amastigota. Assim, a combinação desses dois fatores — pré-exposição ao composto e mudança de estágio biológico — parece gerar uma condição em que o parasita se torna mais sensível ao tratamento. Esse fenômeno pode ser explicado pela sobreposição de estresses: por um lado, a adaptação metabólica imposta pelo tratamento, e por outro, a reorganização estrutural e funcional exigida pela diferenciação, criando um ambiente interno desfavorável para a manutenção da tolerância. Esse resultado é consistente com a ideia de que a diferenciação pode atuar como um “reset biológico” parcial, reduzindo defesas transitórias e revelando vulnerabilidades latentes (SINGH; CHATTERJEE; SUNDAR, 2014).

No caso da pentamidina, utilizada como fármaco de referência, os valores de EC_{50} mantiveram-se consistentemente baixos em comparação aos híbridos; contudo, seguiram o mesmo padrão de variação observado nos demais grupos experimentais, apresentando um aumento inicial após o tratamento e uma posterior redução durante o processo de axenização, ainda que em menor magnitude. Essa estabilidade sugere que a pentamidina possui um mecanismo de ação multifatorial e menos suscetível a adaptações transitórias. Estudos indicam que a pentamidina atua tanto sobre o DNA mitocondrial quanto sobre vias metabólicas centrais e membranas celulares, o que reduz a probabilidade de desenvolvimento de tolerância rápida. Esse perfil robusto é compatível com seu uso clínico como fármaco leishmanicida de referência, ainda que associado a limitações terapêuticas devido a toxicidade (CROFT; COOMBS, 2003; BERMAN, 2005).

Em síntese, os resultados obtidos demonstram que a exposição prévia pode induzir tolerância temporária em promastigotas, mas que a diferenciação para AA reduz significativamente o EC_{50} , sobretudo quando precedida de tratamento. Esses achados reforçam a importância de se considerar o estágio do parasita nos ensaios de susceptibilidade e destacam o potencial dos híbridos estudados como moléculas promissoras na busca por novas alternativas terapêuticas contra a leishmaniose, sobretudo por apresentarem maior eficácia na fase que melhor representa a infecção no hospedeiro.

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os híbridos avaliados (AD06, AD07 e AD08) apresentam atividade leishmanicida. Observou-se que o tratamento dos parasitas, sem a axenização, promoveu aumento do EC_{50} , indicando a indução de mecanismos

adaptativos de tolerância, possivelmente associados à modulação de transportadores de membrana, sistemas antioxidantes e plasticidade celular característicos de *Leishmania*. Por outro lado, a diferenciação para a forma AA resultou em redução significativa do EC_{50} , sugerindo maior suscetibilidade nesta fase, provavelmente em decorrência das alterações metabólicas e estruturais que tornam os parasitas mais vulneráveis à ação dos compostos.

De maneira particularmente expressiva, a associação entre tratamento e axenização levou aos menores valores de EC_{50} entre todos os grupos, revelando que a diferenciação pode “quebrar” defesas adaptativas adquiridas previamente, reforçando a relevância da fase amastigota para avaliação de potenciais fármacos. A pentamidina, empregada como fármaco de referência, apresentou valores de EC_{50} persistentemente baixos em relação aos híbridos; entretanto, exibiu uma tendência de variação semelhante à dos demais grupos, embora de forma menos acentuada.

Dessa forma, este trabalho evidencia a importância de se considerar as diferentes formas de vida do parasita em ensaios de susceptibilidade, uma vez que a forma promastigota isolada pode não refletir adequadamente a resposta real frente a compostos candidatos. Os achados também reforçam o potencial dos híbridos estudados como moléculas promissoras na busca por novas alternativas terapêuticas contra a leishmaniose, sobretudo por apresentarem maior eficácia na fase que melhor representa a infecção no hospedeiro.

Em perspectiva, sugere-se que futuras investigações incluam modelos intracelulares com macrófagos infectados, bem como análises moleculares para elucidar os mecanismos de ação e de adaptação envolvidos. Tais avanços poderão contribuir para consolidar o uso desses híbridos no desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras para o tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- AÏT-LOUDHIA, K.; *et al.* **Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field.** *Parasitology Research*, v. 109, n. 5, p. 1225–1232, 2011.
- AKHOUNDI, M.; *et al.* **A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. **Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host.** *Health Science Journal*, v. 11, n. 4, p. 519, 2017.
- ALVES, M. A.; *et al.* **New Licarin A derivative is effective against Leishmania (Leishmania) amazonensis promastigotes and intracellular amastigotes.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 35, n. 8, p. 1–10, 2024.
- ANVERSA, L.; *et al.* **Human leishmaniasis in Brazil: a general review.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2017.
- ARJMAND, Mohammad *et al.* **Metabolomics-Based Study of Logarithmic and Stationary Phases of Promastigotes in Leishmania major by 1H NMR Spectroscopy.** *Iranian Biomedical Journal*, v. 20, n. 2, p. 77–83, abr. 2016.
- ASHWIN, H.; *et al.* **Characterization of a new Leishmania major strain for use in a controlled human infection model.** *Nature Communications*, v. 12, n. 215, 2021.
- ASM. American Society for Microbiology. **Combination therapy for visceral leishmaniasis: a necessity in the era of emerging drug resistance.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 10, p. 6359–6366, 2014.
- BARBOSA, J.; *et al.* **Evaluation of Giardia duodenalis viability after metronidazole treatment by flow cytometry.** Universidade do Porto, 2014.
- BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. **Cell death in Leishmania.** *Parasite*, v. 26, p. 71, 2019.
- BERMAN, J. D. **Clinical status of agents being developed for leishmaniasis.** *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 14, n. 11, p. 1337–1346, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar.** Brasília: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da leishmaniose visceral.** Brasília: Ministério da Saúde, 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde lança painéis para monitorar leishmanioses no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2024a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica — Leishmaniose tegumentar.** Brasília: Ministério da Saúde, 2024b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. 6. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose tegumentar: situação epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, [s.d.].

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico de morbimortalidade por zoonoses no Brasil, 2007–2023**. Brasília: Ministério da Saúde, 8 jul. 2025.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. **Leishmaniasis**. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAMPOS, C.; *et al.* **Ibuprofen-induced Walker 256 tumor cell death: cytochrome c release from functional mitochondria and enhancement by calcineurin inhibition**. *Biochemical Pharmacology*, v. 68, p. 2197–2206, 2004.

CARRANZA, J. C.; *et al.* **Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in Trypanosoma cruzi isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes**. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 41, p. 299–308, 2009.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Parasites – Leishmaniasis**. *Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria*, 2020.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **DPDx – Leishmaniasis**. Atlanta: CDC, 2024.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Leishmaniasis | Yellow Book**. Atlanta: CDC, 23 abr. 2025.

CERUELOS, A. H.; *et al.* **Therapeutic uses of metronidazole and its side effects**. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 23, n. 1, p. 397–401, 2019.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. **Drug resistance in leishmaniasis**. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 2, n. 2, p. 167–176, 2010.

CLOS, J. *et al.* **Promastigote-to-Amastigote Conversion in Leishmania spp.** *Pathogens*, v. 11, n. 9, p. 1052, 2022.

CONTATO, A. G.; *et al.* **Antiproliferative activity and ultrastructural changes in promastigote and amastigote forms of Leishmania amazonensis caused by limonene-acylthiosemicarbazide hybrids**. *Chemistry and Biodiversity*, 2023.

COURRET, N.; *et al.* **Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites**. *Journal of Cell Science*, v. 115, p. 2303–2316, 2002.

COSTA, L. E.; *et al.* **Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis**. *Microbial Pathogenesis*, v. 110, p. 1–6, 2017.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. **Leishmaniasis — current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs.** *Trends in Parasitology*, v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003.

DE FIGUEIREDO PELOSO, Eduardo *et al.* **Investigation of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one as a promising coumarin compound for the development of a new and orally effective antileishmanial agent.** *Molecular Biology Reports*, v. 47, n. 11, p. 8465–8474, nov. 2020.

DIAS-LOPES, Geovane *et al.* **Axenic amastigotes of Leishmania species as a suitable model for in vitro studies.** *Acta Tropica*, v. 220, p. 105956, ago. 2021.

ENNA, S. J.; BYLUND, D. B. **xPharm: the comprehensive pharmacology reference.** Amsterdam: Elsevier, 2008.

ESPURI, P. F. **Avaliação da atividade leishmanicida de compostos orgânicos contendo prata em sua estrutura.** Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), 2017.

ESPURI, P. F.; *et al.* **Synthesis and evaluation of the antileishmanial activity of silver compounds containing imidazolidine-2-thione.** *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2017.

FERREIRA, B.; *et al.* **Amphotericin B resistance in Leishmania amazonensis: in vitro and in vivo characterization of a Brazilian clinical isolate.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 18, n. 5, p. e0012175, 2024.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. **Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs.** *Pharmaceutical Research*, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Painéis fortalecerão controle de leishmanioses.** Brasília: Fiocruz, 26 ago. 2024.

FRÉZARD, F.; *et al.* **Nanostructures for improved antimonial therapy of leishmaniasis.** In: *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*. p. 419–437, 2017.

GEORGIADOU, S. P.; *et al.* **Leishmaniasis revisited: current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment.** *Journal of Translational Internal Medicine*, 2015.

GOTO, H. **Apoptose e imunossupressão em fases precoces de infecção na leishmaniose visceral experimental.** Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT), 2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. **Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.** *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

HAFIZ, S.; KYRIAKOPOULOS, C. **Pentamidine.** In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.

HAM, R. E.; *et al.* **Joining forces: leveraging novel combination therapies to improve efficacy.** *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1–12, 2020.

HOWELL, J.; *et al.* **Analysis of the *Leishmania mexicana* promastigote cell cycle using imaging flow cytometry provides new insights into cell cycle flexibility and events of short duration.** *PLoS ONE*, v. 19, n. 10, 2024.

HUYNH, C.; *et al.* **Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by a transmembrane protein LHR1.** *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 7, e1002795, 2012.

INGS, R. M. J.; *et al.* **The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other micro-organisms.** *Biochemical Pharmacology*, v. 23, p. 1421–1429, 1973.

INTALKHAN, N.; *et al.* **Artesunate-based combination therapies for leishmaniasis: overcoming current challenges.** *Antibiotics*, v. 13, n. 9, p. 806, 2024.

ISLAMUDDIN, M.; *et al.* **Immunotherapeutic potential of eugenol emulsion in experimental visceral leishmaniasis.** *PLoS ONE*, v. 11, n. 10, e0165090, 2016.

JAAFARI, M. R.; *et al.* **Evaluation of leishmanicidal effect of *Perovskia abrotanoides* Karel. root extract by in vitro leishmanicidal assay using promastigotes of *Leishmania major*.** *Pharmacologyonline*, v. 1, p. 299–303, 2007.

JARA, Marlene *et al.* **Transcriptional Shift and Metabolic Adaptations during *Leishmania* Quiescence Using Stationary Phase and Drug Pressure as Models.** *Microorganisms*, v. 10, n. 1, p. 97, jan. 2022.

JARA, M.; *et al.* **Drug tolerance and persister-like cells in *Leishmania*: a new challenge for treatment.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, p. 1253033, 2023.

JAYAKUMAR, A.; *et al.* **Programmed death-1 and LAG-3 expression in T cells contributes to T cell exhaustion and impaired control of *Leishmania donovani* infection.** *Infection and Immunity*, v. 86, n. 5, 2018.

KAR, A.; *et al.* **Oral combination of eugenol oleate and miltefosine induces eight-fold parasite clearance and Th1 immunoprotection in experimental visceral leishmaniasis.** *International Immunopharmacology*, v. 91, p. 107291, 2021.

KAUFER, A.; *et al.* **The evolution of trypanosomatid taxonomy.** *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, p. 287, 2017.

KAYE, P.; SCOTT, P. **Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, p. 604–615, 2011.

KEDZIERSKI, L.; *et al.* **Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 599–614, 2009.

KOWALTOWSKI, A.; *et al.* **Mitochondria and reactive oxygen species.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, p. 333–343, 2009.

LEPROHON, P. *et al.* **Drug resistance analysis of *Leishmania* isolates using next generation sequencing and functional analysis of gene expression.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 9, n. 6, e0005641, 2015.

MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; NEWMAN, S.; RAMANAN, P.; SUAREZ, J. A. **A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions.** *Current Tropical Medicine Reports*, v. 8, n. 2, p. 121–132, 2021.

MARTINEZ, P. A.; PETERSEN, C. A. **Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms.** *Immunologic Research*, v. 59, p. 153–165, 2014.

MCGWIRE, B.; SATOSKAR, A. **Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment.** *QJM*, v. 107, p. 7–14, 2014.

MESQUITA, J. T. **Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e associações terapêuticas em *Leishmania (L.) infantum*.** São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2013.

MIGUEL, D. C.; FLANNERY, A. R.; MITTRA, B.; ANDREWS, N. W. **Heme uptake mediated by LHR1 is essential for *Leishmania amazonensis* virulence.** *Infection and Immunity*, v. 81, n. 10, p. 3620–3626, 2013.

MOHAMADI, N.; *et al.* **In vitro anti-leishmanial activity and molecular docking of eugenol combined with meglumine antimoniate against *Leishmania major*.** *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, p. 1345, 2025.

MONCADA-DÍAZ, J.; *et al.* ***Leishmania* drug resistance: insights from genomics and molecular adaptations.** *Pathogens*, v. 13, n. 10, p. 835, 2024.

MORAIS, S. M.; *et al.* **Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014.

NAIR, M. G.; *et al.* **CD4 T cells expressing CD200R are major producers of IL-10 during visceral leishmaniasis.** *The Journal of Experimental Medicine*, v. 220, n. 1, 2023.

NCBI. **PubChem Database – Eugenol, CID=3314.** Bethesda: National Center for Biotechnology Information.

NCBI. **PubChem Database – Metronidazole, CID=4173.** Bethesda: National Center for Biotechnology Information.

NISAR, M. F.; *et al.* **Pharmacological properties and health benefits of eugenol: a comprehensive review.** *BioMed Research International*, v. 2021, p. 1–9, 2021.

NUNES, T. A. L.; *et al.* **Curzerene antileishmania activity: effects on *Leishmania amazonensis* and possible action mechanisms.** *International Immunopharmacology*, v. 100, 2021.

OLIVEIRA, L. F. *et al.* **Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World.** *Acta Tropica*, v. 118, p. 87–96, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Leishmaniasis — Fact sheet.** Genebra: OMS, 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas: segunda edição.** Washington, DC: OPAS/OMS, 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Leishmaniose visceral.** Brasília: OPAS/OMS, 2024.

OPPERDOES, F. R.; COOMBS, G. H. **Metabolism of Leishmania: proven and predicted.** *Trends in Parasitology*, v. 23, p. 149–158, 2007.

PACAKOVA, L.; *et al.* **Three types of Leishmania mexicana amastigotes: proteome comparison by quantitative proteomic analysis.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, 2022.

PELOSO, E. F.; *et al.* **Investigation of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one as a promising coumarin compound for the development of a new and orally effective antileishmanial agent.** *Molecular Biology Reports*, v. 47, n. 11, p. 8465–8474, 2020.

PELOZO, M. F.; *et al.* **Synthesis of new trypanocidal agents from the hybridisation of metronidazole and eugenol analogues.** *Bioorganic Chemistry*, v. 146, p. 107288, 2024.

PEREIRA, G. R.; *et al.* [Artigo]. *Tetrahedron Letters*, v. 51, p. 1022–1025, 2010.

PEREIRA, I. O.; *et al.* **Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from Garcinia brasiliensis Mart. fruits.** *Phytomedicine*, v. 17, p. 339–345, 2011.

PNUD. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. **Atlas do Desenvolvimento Humano do Brasil.** Brasília: PNUD, 2021.

PODLIPAEV, S. **The more insect trypanosomatids under study — the more diverse Trypanosomatidae appears.** *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 648–652, 2001.

PONTE-SUCRE, A.; *et al.* **Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2017.

PRAMANIK, P. K.; *et al.* **Drug resistance in protozoan parasites: an incessant wrestle for survival.** *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 18, p. 1–11, 2019.

RAMÍREZ, J. D.; *et al.* **Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of cutaneous leishmaniasis in Colombia: a retrospective study.** *Scientific Reports*, v. 6, p. 28266, 2016.

RAJA, S. **Eugenol and its derivatives as potential antileishmanial agents: effect on Leishmania donovani.** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 10, n. 6, p. 523–530, 2017.

ROJAS-JAIMES, J.; MESIA-GUEVARA, M. **Obtaining axenic amastigotes of Leishmania sp. from an ulcer lesion of a patient with leishmaniasis.** *IDCases*, v. 26, 2021.

ROY, S.; et al. **Oxidative stress and survival of Leishmania spp.** *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 143, 2024.

SACKS, D. L. **Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence.** *Cellular Microbiology*, v. 3, n. 4, p. 189–196, 2001.

SAKTHIANANDAVEL, M.; et al. **T cell exhaustion markers TIM-3 and LAG-3 correlate with disease severity in human visceral leishmaniasis.** *Frontiers in Immunology*, v. 13, 2022.

SALLÂUM, T.; TOKAJIAN, S.; HIRT, R. P. **Advances in Understanding Leishmania Pathobiology: What Does RNA-Seq Tell Us?** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, 2021.

SANTARÉM, N.; CARDOSO, L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. **Advances in Leishmania Research: From Basic Parasite Biology to Disease Control.** *Microorganisms*, v. 11, n. 3, p. 696, 2023.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. **Leishmaniasis: where are we and where are we heading?** *Parasitology Research*, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 2021.

SHADAB, M.; et al. **Apoptosis-like cell death in Leishmania donovani treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B.** *PLOS ONE*, v. 12, n. 2, 2017.

SHAW, J. **Taxonomy of the genus Leishmania: present and future trends and their implications.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 471–478, 1994.

Silva Santos, V. N. et al. **Considerations on leishmaniasis and the current scenario for developing new forms of treatment.** *Journal of Tropical Pathology*, v. 50, n. 4, p. 255–264, 2021.

SILVEIRA, F. T. et al. **Coinfection of HIV and visceral leishmaniasis in Brazil: epidemiological and clinical update.** *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 15, p. 1–9, 2024.

SINGH, N.; CHATTERJEE, M.; SUNDAR, S. **The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India.** *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 596, 2014.

SINGH, A.; MAHAPATRA, B.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, S.; DAS, P.; SINGH, R. K. **Leishmania antigens activated CD4⁺ T cells expressing CD200R receptors are the prime IL-10 producing phenotype and an important determinant of visceral leishmaniasis pathogenesis.** *Cytokine*, v. 173, p. 156435, jan. 2024.

SOUSA-GOMES, M. L. et al. **Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough?** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 7, e1169, 2011.

SYDNEY, M.; FINEGOLD, S. M. **Metronidazole.** *Medical Clinics of North America*, v. 64, n. 2, p. 455–466, 1980.

TEIXEIRA, D. E.; *et al.* **The cell biology of Leishmania: how to teach using animations.** *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 10, e1003594, 2013.

TEIXEIRA, R. R.; *et al.* **Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 146, p. 274–286, 2018.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

TIWARI, N.; *et al.* **Leishmaniasis control: limitations of current drugs and prospects of natural products.** In: *Natural Product Drug Discovery*. p. 293–350, 2019.

TURSYMBOLAT, S.; *et al.* **Ultrasensitive electrochemical determination of metronidazole based on polydopamine/carboxylic multi-walled carbon nanotubes nanocomposites modified GCE.** *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2018.

UEDA-NAKAMURA, T.; *et al.* **Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*.** *Parasitology International*, v. 55, n. 2, p. 99–105, 2006.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. **Biological properties and prospects for the application of eugenol and its derivatives.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 7, p. 3671, 2021.

VAN GRIENSVEN, J.; *et al.* **Combination therapy for visceral leishmaniasis: moving forward in East Africa.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 24, n. 1, p. 1–3, 2024.

VICTOR, M. M.; *et al.* **Design, synthesis, and in vitro evaluation of the leishmanicidal activity of new aromatic symmetrical 1,4-disubstituted 1,2,3-bis-triazoles.** *ACS Omega*, v. 10, n. 26, p. 27819–27829, 2025.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna: contribuições para a descoberta de fármacos.** *Química Nova*, v. 30, n. 6, p. 1429–1446, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis.** Geneva: World Health Organization, 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis.** Geneva: World Health Organization, 2025

ZHANG, H. *et al.* **Progress in antileishmanial drugs: mechanisms, challenges and prospects.** [*Periódico de revisão em farmacologia*], 2025.