

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

MAIARA AMARAL DE OLIVEIRA

**Otimização de neolignanas como protótipos farmacêuticos para a
leishmaniose visceral: mecanismo de ação e estudos
farmacocinéticos**

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

MAIARA AMARAL DE OLIVEIRA

**Otimização de neolignanas como protótipos farmacêuticos para a
leishmaniose visceral: mecanismo de ação e estudos
farmacocinéticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone
Cardoso

São Paulo
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Maiara Amaral de
Otimização de neolignanas como protótipos
farmacêuticos para a leishmaniose visceral :
mecanismo de ação e estudos farmacocinéticos /
Maiara Amaral de Oliveira. -- São Paulo, 2022.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Medicina Tropical. Área de
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.
Orientador: André Gustavo Tempone Cardoso.

Descritores: 1.Descoberta de drogas
2.Terapêutica 3.Leishmaniose 4.Leishmania infantum
5.Lignanas 6.Farmacocinética

USP/FM/DBD-426/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

***À minha mãe, por me ensinar que o
caminho é sempre mais importante que o destino final.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me guiar durante todos estes anos, permitindo que mais um sonho fosse alcançado.

Agradeço também, ao Programa de Pós-graduação em Medicina tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IMT-FMUSP) por me acolher e me oferecer a oportunidade de realizar meu curso de doutorado.

Ao Instituto Adolfo Lutz por toda a estrutura disponibilizada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo destes anos e pela dedicação, profissionalismo e paciência durante todas as dificuldades enfrentadas.

Aos Profs. Drs. João Henrique G. Lago, João Paulo Fernandes, Edward A Anderson, Noemi Taniwaki, Eduardo Antonio Ferraz Coelho e a todos os integrantes de seus laboratórios pela colaboração, vocês foram essenciais para realização deste projeto.

Em especial, agradeço a Prof^a. Dr. Ana Cristina Bairrada Fortuna pela oportunidade de visitar seu laboratório na Universidade de Coimbra e a todo seu grupo (Joana Bicker, Carla Fonseca, Filipa Gouveia, Soraia Silva e Sara Fialho), por me acolherem e prestarem o suporte necessário durante meu período de estágio.

Agradeço ao todo grupo do Laboratório de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas pelo apoio e companheirismo durante estes anos. Especialmente a Thais e a Maiara, pelos conselhos e ensinamentos profissionais e de vida, sem vocês meus dias não teriam a mesma graça.

À técnica do laboratório, Matília Nascimento, pela paciência e assistência, além de todas as instruções fornecidas diariamente.

Especialmente, agradeço a minha mãe, meu exemplo de força e dedicação, por me incentivar durante toda essa trajetória, por estar ao meu lado ao longo de todos os obstáculos e por nunca me deixar desistir. Eu não seria quem sou ou chegaria aonde estou sem você.

A todos meus familiares e amigos que estiveram presentes durante esta etapa, por todos os conselhos e pelo suporte emocional quando eu nem mesmo sabia que precisava.

Por fim, agradeço a todos que passaram por mim durante estes anos e de alguma forma doaram um pouco de si para tornar este trabalho possível.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar
tudo de você, menos o seu conhecimento.”

- Albert Einstein

RESUMO

Oliveira MA Otimização de neolignanas como protótipos farmacêuticos para a leishmaniose visceral: mecanismo de ação e estudos farmacocinéticos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A leishmaniose visceral é uma protozoose negligenciada de elevada mortalidade, cujo tratamento disponível apresenta diversas limitações, representando um sério desafio para a saúde pública. Diante deste cenário e considerando a elevada biodiversidade e quimiodiversidade disponível, produtos naturais representam uma fonte promissora de novos protótipos farmacêuticos. Neste contexto, no presente trabalho foi realizado o estudo do potencial anti-*L. (L.) infantum* de uma nova série de 55 compostos sintéticos e 2 semissintéticos derivados da neolignana desidrodieugenol B, isolada da planta brasileira *Nectandra leucanta*. Dentre eles, 19 exibiram atividade em amastigotas intracelulares com valores de CE₅₀ variando entre 3 e 36,6 µM. A neolignana **PP480** foi a mais promissora, apresentando a maior seletividade (>20) e, portanto, sendo selecionada para aprofundamento dos estudos. Por meio de predições *in silico*, foi demonstrado que este derivado apresenta propriedades físico-químicas e perfil druglikeness adequados, sem apresentar semelhanças estruturais com compostos de interferência (*PAINS*). A avaliação da toxicidade em eritrócitos, indicou que o composto não induz atividade hemolítica nas concentrações máximas testadas. Ademais, utilizando diferentes abordagens de espectrofluorimetria e citometria de fluxo, foi possível a investigação do mecanismo de ação do composto **PP480** em promastigotas de *L. (L.) infantum*. Em suma, foi proposta uma atividade baseada na alcalinização de acidocalcissomos e concomitante liberação de cálcio. Associadas, essas alterações, possivelmente induzem um desarranjo mitocondrial, com sucessivo colapso da cadeia bioenergética, redução dos níveis de ATP e de espécies reativas de oxigênio (ROS). Também foi constatado pela análise de proteínas totais e espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS), que este derivado interfere no perfil proteico dos parasitas. Sendo assim, foi possível sugerir que o composto **PP480** promove uma morte celular do tipo autofágica. Adicionalmente, foi observada uma ação imunomodulatória nas células hospedeiras, com redução de citocinas de resposta Th1 e Th2, caracterizando uma atividade anti-inflamatória. Um estudo do perfil farmacocinético *in vivo*, demonstrou parâmetros promissores do composto no organismo, incluindo uma meia vida plasmática (T_{1/2}) média de 21h, recomendando assim, análises mais detalhadas para definição de um regime posológico adequado. Por fim, estes resultados enfatizam o potencial promissor do desidrodieugenol B como protótipo para a síntese de novos fármacos anti-*Leishmania*, e fornecem um ponto de partida para futuros estudos pré-clínicos de eficácia *in vivo*.

Palavras-chave: Descoberta de drogas. Terapêutica. Leishmaniose. *Leishmania infantum*. Lignanas. Farmacocinética.

ABSTRACT

Oliveira MA. Optimization of neolignans as pharmaceutical prototypes for visceral leishmaniasis: mechanism of action and pharmacokinetic studies [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Visceral leishmaniasis is a neglected protozoan disease with high mortality, whose available treatments has several limitations, triggering a serious public health challenge. Given this scenario and due to the high biodiversity and chemiodiversity available, natural products represent an attractive source of new pharmaceutical prototypes. In this context, the present work studied the anti-*L. (L.) infantum* potential of a new series of 55 synthetic and 2 semi-synthetic compounds derived from the neolignan dehydrodieugenol B, isolated from the Brazilian plant *Nectandra leucanta*. Among them, 19 exhibited activity against intracellular amastigotes with IC₅₀ values ranging from 3 to 36.6 µM. The neolignan **PP480** was the most promising one, showing the highest selectivity (>20) and being selected for further studies. Through *in silico* predictions, it was demonstrated that this derivative present adequate physicochemical properties and druglikeness profile, without structural similarities to interference compounds (PAINS). The evaluation of toxicity in erythrocyte indicated that even at the maximum concentrations tested, this compound does not induce hemolytic activity. Furthermore, using different approaches of spectrofluorimetry and flow cytometry, it was possible to investigate **PP480** mechanism of action in promastigotes of *L. (L.) infantum*. In short, an activity based on acidocalcisomes alkalinization and concomitant calcium leakage was proposed. Associated, these alterations possibly induce a mitochondrial breakdown, with successive collapse of the bioenergetic chain, reduction of ATP and reactive oxygen species (ROS) levels. It was also verified by the analysis of total proteins and mass spectrometry (MALDI-TOF/MS), that this derivative interferes with the parasites protein profile. Therefore, it is possible to suggest that **PP480** promotes an autophagic cell death. Additionally, an immunomodulatory action was observed in the host cells, with a reduction of Th1 and Th2 cytokines response, characterizing an anti-inflammatory activity. A study of the pharmacokinetic profile *in vivo* showed promising parameters of the compound in the organism, including a mean plasma half-life (T_{1/2}) of 21h, thus recommending more detailed analyzes to define an appropriate dosage regimen. Overall, these studied emphasize the promising potential of dehydrodieugenol B as a prototype for the synthesis of new anti-Leishmania drugs and provide a starting point for future preclinical efficacy studies *in vivo*.

Keywords: Drug Discovery. Therapeutics. Leishmaniasis. *Leishmania infantum*. Lignans. Pharmacokinetics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ATCC	(American Type Culture Collection) Coleção Americana de Cultura de Células
ATP	Trifosfato de Adenosina
AUC	Área Sob a Curva
AUC _{0-inf}	Área Sob a Curva do Tempo Zero ao Tempo da Última Concentração Mensurável
AUC _{0-t}	Área Sob a Curva do Tempo Zero ao Tempo da Última Concentração Mensurável
AUC _{extrap}	Porcentagem de Área Sob a Curva Extrapolada do Tempo da Última Concentração Mensurável ao Infinito
BCA	Ácido Bicinconínico
Bisoxonol	Ácido bis-(1,3-dimetil tiobarbitúrico) trimetil oxonol
BL-1	Filtro de Emissão de 530 nm
BL-2	Filtro de Emissão de 574 nm
BTS	Extrato Proteico DH5-alfa de <i>Escherichia coli</i>
Ca ²⁺	Íons de Cálcio
CC ₅₀	Concentração Citotóxica 50%
CCCP	Carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
C _{last}	Última Concentração Mensurável
C _{max}	Concentração Máxima
CO ₂	Dióxido de Carbono
ConA	Concanavalina A
Cu ¹⁺	Cátion Cuproso
CYP	Citocromo P450
DCF	2',7'-diclorofluoresceína

DCM	Diclorometano
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DND <i>i</i>	(Drug for Neglected Diseases <i>initiative</i>) Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DP	Desvio Padrão
Et ₃ N	Trietilamina
FDA	(Food and Drug Administration) Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
H ⁺	Íons de Hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ DCFDA	2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hanks
HCCA	Matrix de ácido α-ciano-4-hidroxi-cinâmico
Hex	Hexano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HRMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
IAL	Instituto Adolfo Lutz de São Paulo
IF	Índice de Infecção
IFN-γ	Interferon-γ
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IS	Índice de Seletividade
JC-1	Iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-Tetraetilbenzimidazolil carbocianina
Kel	Constante da Taxa de Eliminação Aparente
Log D	Coeficiente de Distribuição
Log P	Coeficiente de Partição / Lipofilicidade

Log S	Solubilidade Aquosa
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
LV	Leishmaniose Visceral
m/z	Razão Massa Carga
MALDI-TOF/MS	Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
MeOH	Metanol
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MM	Massa Molecular
MRT	Tempo Médio de Residência
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
Na ₂ SO ₄	Sulfato De Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NO	Óxido Nítrico
NO ²⁻	Nitrito
PAINS	(Pan-Assay Interference Compounds) Compostos de Interferência
PBS	Tampão Fosfato-Salina
P-gp	Glicoproteína P
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Iodeto de Propídio
PK/PD	Farmacocinética e Farmacodinâmica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNase	Ribonuclease
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI 1640	Meio Roswell Park Memorial Institute 1640
Sb ^v	Antimoniais Pentavalentes
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
T _{1/2}	Tempo de Meia Vida
Th1	Linfócitos T auxiliares Tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares Tipo 2

T_{max}	Tempo Máximo
TMS	Tetrametilsilano
TPSA	Área de Superfície Polar Topológica
$\Delta\psi_m$	Potencial de Membrana Mitocondrial
$\Delta\psi_p$	Potencial de Membrana Plasmática

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura e massa molecular (MM) do protótipo desidrodieugenol B e dos 55 compostos sintéticos preparados.....	44
Tabela 2 - Estrutura e massa molecular (MM) dos dois compostos semissintéticos preparados.....	51
Tabela 3 - Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania (L.) infantum</i> e citotoxicidade dos compostos e do fármaco padrão miltefosina.....	65
Tabela 4 - Predições <i>in silico</i> de parâmetros físico-químicos, estruturais e de ADMET.....	69
Tabela 5 - Avaliação de alterações no ciclo celular em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> após 24h de tratamento com PP480 e com fármaco padrão miltefosina.	84
Tabela 6 - Parâmetros farmacocinéticos após administração do composto PP480 em seis ratos Wistar, por via intraperitoneal.....	91
Tabela 7 - Condições cromatográficas e de validação para quantificação por HPLC do composto PP480 em plasma.....	110
Tabela 8 – Estabilidade do composto PP480 em plasma sob condições de manuseio e armazenamento.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas clínicas de leishmaniose.....	21
Figura 2 - Fêmea de flebotomíneo adulta	23
Figura 3 - Ciclo biológico dos parasitas de <i>Leishmania</i>	23
Figura 4 - Distribuição de novos casos de leishmaniose visceral mundialmente no ano de 2020	25
Figura 5 - Distribuição de casos de leishmaniose visceral por município brasileiro no ano de 2020	26
Figura 6 - Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2020	26
Figura 7 - Estrutura do fármaco anfotericina B	28
Figura 8 - Estrutura do fármaco paromomicina.....	29
Figura 9 - Estrutura do fármaco miltefosina	30
Figura 10 - Etapas do desenvolvimento de fármacos	31
Figura 11 - Distribuição das fontes de 1881 fármacos desenvolvidos no período de 1981 a 2019	35
Figura 12 - <i>Nectandra leucantha</i> Nees & Mart (Lauraceae)	37
Figura 13 - Estrutura do composto desidrodieugenol B.....	37
Figura 14 - Esquema de síntese total do desidrodieugenol B em seis etapas.	38
Figura 15 - Abordagens de modificação estrutural do desidrodieugenol B..	39
Figura 16 - Avaliação da atividade anti- <i>L. (L.) infantum</i> em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas, após 96h.....	68
Figura 17 - Radar de biodisponibilidade do composto PP480 , obtido utilizando o servidor SwissADME	70
Figura 18 - Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos BALB/c, após 2h de tratamento com PP480	71
Figura 19 - Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 4h de tratamento com PP480 , utilizando o fluoróforo Sytox Green	72

Figura 20 - Histogramas de fluorescência determinados por citometria de fluxo em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após tratamento com PP480 , utilizando o fluoróforo bisoxonol.....	73
Figura 21 - Avaliação do potencial de membrana plasmática em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 2 e 4h de tratamento com PP480 , utilizando o fluoróforo bisoxonol.....	74
Figura 22 - Histogramas de fluorescência determinados por citometria de fluxo em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após tratamento com PP480 , utilizando o fluoróforo JC-1.....	75
Figura 23 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 2 e 4h de tratamento com PP480 , utilizando o fluoróforo JC-1.....	76
Figura 24 - Avaliação dos níveis de ATP em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 2 e 4h de tratamento com PP480 , utilizando o ATP Determination Kit.....	77
Figura 25 - Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 2 e 4h de tratamento com PP480 , utilizando o fluoróforo H ₂ DCFDA.....	78
Figura 26 - Avaliação dos níveis de cálcio intracelular em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 4h de tratamento com PP480 , utilizando o fluoróforo Fluo-4 AM.....	79
Figura 27 - Avaliação da alcalinização de acidocalcissomos em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 4h de tratamento com PP480 , utilizando o fluoróforo laranja de acridina.....	80
Figura 28 - Avaliação dos níveis de proteínas totais em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 2 e 4h de tratamento com PP480 , utilizando o BCA Protein Assay Kit.....	81
Figura 29 - Avaliação do perfil proteico de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , utilizando MALDI-TOF/MS na faixa de 2000 a 14000 m/z	82
Figura 30 - Histogramas de fluorescência determinados por citometria de fluxo em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 24h de tratamento com PP480 , utilizando o fluoróforo iodeto de propídio	83

Figura 31 - Avaliação da integridade do DNA em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 24h de tratamento com PP480 , utilizando eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio.....	85
Figura 32 - Avaliação de alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , utilizando microscopia eletrônica de transmissão	86
Figura 33 - Proposta de mecanismo de ação em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após tratamento com PP480	87
Figura 34 - Avaliação dos níveis de óxido nítrico em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 48h de tratamento com PP480 , utilizando o método de Griess	88
Figura 35 - Avaliação dos níveis de citocinas em macrófagos peritoneais infectados com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , após 48 e 72h de tratamento com PP480 , utilizando os kits BD OptEIA Mouse ELISA	89
Figura 36 - Perfis médios de concentração plasmática por tempo após administração do composto PP480 em seis ratos Wistar, por via intraperitoneal	91
Figura 37 - Cromatogramas de HPLC representativos	109

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1.	Leishmanioses.....	21
1.2.	Leishmaniose visceral (LV).....	21
1.2.1	Ciclo Biológico	22
1.2.2	Patogenia.....	24
1.2.3	Epidemiologia	24
1.3.	Quimioterapia Disponível para LV	26
1.3.1	Antimoniais Pentavalentes (Sb ^v).....	27
1.3.2	Anfotericina B.....	27
1.3.3	Paromomicina	28
1.3.4	Miltefosina.....	29
1.4.	Descoberta e Desenvolvimento de Novas Quimioterapias.....	30
1.5.	Produtos Naturais como Novos Protótipos Farmacêuticos	34
1.5.1	<i>Nectandra leucantha</i> (Laureceae).....	36
1.5.2	Estudos Prévios: Neolignanas de <i>Nectandra leucantha</i> (Laureceae)	37
1.6.	Justificativa	39
2	OBJETIVOS	40
2.1	Gerais.....	40
2.2	Específicos	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1	Reagentes e Equipamentos	42
3.2	Animais de Experimentação.....	43
3.3	Parasitas.....	43

3.4	Células de Mamíferos.....	43
3.5	Preparo dos Derivados Sintéticos e Semissintéticos.....	44
3.5.1	Derivados Sintéticos	44
3.5.2	Derivados Semissintéticos.....	50
3.6	Determinação <i>in vitro</i> da Concentração Efetiva 50% (CE ₅₀)	52
3.7	Determinação <i>in vitro</i> da Concentração Citotóxica 50% (CC ₅₀)	53
3.8	Determinação do Índice de Seletividade (IS).....	53
3.9	Análise <i>in silico</i> de Parâmetros Físico-químicos e ADMET	53
3.10	Análise <i>in vitro</i> da Atividade Hemolítica.....	54
3.11	Avaliação do Mecanismo de Ação em Promastigotas.....	54
3.11.1	Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática.....	55
3.11.2	Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ($\Delta\psi_p$)	55
3.11.3	Alterações no Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	55
3.11.4	Alterações nos Níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)	56
3.11.5	Alterações nos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	56
3.11.6	Alterações nos Níveis de Cálcio Intracelular (Ca ²⁺)	57
3.11.7	Alterações nos Acidocalcissomos.....	57
3.11.8	Alterações nos Níveis de Proteínas Totais	57
3.11.9	Alterações no Perfil Proteico por MALTI-TOF/MS	58
3.11.10	Alterações no Ciclo Celular.....	58
3.11.11	Alterações na Integridade do DNA.....	59
3.11.12	Alterações Ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	59
3.12	Avaliação da Resposta Imunomodulatória	60
3.12.1	Dosagem de Óxido Nítrico (NO)	60
3.12.2	Dosagem de Citocinas.....	60
3.13	Determinação do Perfil Farmacocinético <i>in vivo</i>	61

3.14	Análises Estatísticas.....	62
4	RESULTADOS	63
4.1	Preparo dos Derivados Semissintéticos	63
4.2	Determinação <i>in vitro</i> da Concentração Citotóxica (CC ₅₀) e Efetiva (CE ₅₀) 50%	65
4.3	Análise <i>in silico</i> de Parâmetros Físico-químicos e ADMET	68
4.4	Análise <i>in vitro</i> da Atividade Hemolítica.....	70
4.5	Avaliação do Mecanismo de Ação em Promastigotas.....	71
4.5.1	Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática.....	71
4.5.2	Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ($\Delta\psi_p$)	72
4.5.3	Alterações no Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	74
4.5.4	Alterações nos Níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)	76
4.5.5	Alterações nos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	77
4.5.6	Alterações nos Níveis de Cálcio Intracelular (Ca ²⁺)	78
4.5.7	Alterações nos Acidocalcissomos.....	79
4.5.8	Alterações nos Níveis de Proteínas Totais	80
4.5.9	Alterações no Perfil Proteico por MALDI-TOF/MS.....	81
4.5.10	Alterações no Ciclo Celular.....	82
4.5.11	Alterações na Integridade do DNA.....	84
4.5.12	Alterações Ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	85
4.5.13	Proposta de Mecanismo de Ação	86
4.6	Avaliação da Resposta Imunomodulatória	87
4.6.1	Dosagem de Óxido Nítrico (NO)	87
4.6.2	Dosagem de Citocinas.....	88
4.7	Determinação do Perfil Farmacocinético <i>in vivo</i>	89

5	DISCUSSÃO.....	92
6	CONCLUSÕES.....	106
	APÊNDICE A – VALIDAÇÃO HPLC	108
	REFERÊNCIAS.....	112

1 INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas que afetam mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, representando um grande desafio para a saúde pública. Esse complexo de doenças é causado por mais de 20 espécies de parasitas do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) e é classificado em três formas clínicas principais, de acordo com a espécie do parasita e a resposta imune do hospedeiro: cutânea, mucocutânea e visceral (**Figura 1**) (Burza *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2019).



Figura 1 - Formas clínicas de leishmaniose. **(A)** Cutânea, **(B)** Mucocutânea e **(C)** Visceral.

Fonte: Ministério da Saúde, 2014 e 2017b.

Atualmente, as leishmanioses estão presentes em 98 países/territórios com aproximadamente 1,3 milhões de novos casos por ano e 600 milhões de pessoas em situação de risco de infecção. Somente na América Latina, cerca de 60 mil novos casos ocorrem anualmente (World Health Organization, 2017, 2022; Mazire *et al.*, 2021). Dentre as doenças tropicais, as leishmanioses estão no quarto lugar no que se refere a morbidade e segundo em mortalidade (Lee *et al.*, 2019).

1.2. Leishmaniose visceral (LV)

A leishmaniose visceral é a forma clínica mais grave de seu complexo de doença, sendo causada essencialmente por duas espécies de parasitas: *L. (L.)*

donovani e *L. (L.) infantum* (Ibarra-Meneses *et al.*, 2020). A primeira, antroponótica, com transmissão humano-humano, é a mais comum e acomete todas as faixas etária. Já a segunda, zoonótica, com transmissão animal-humano, tende a afetar principalmente crianças e indivíduos imunocomprometidos (Alves *et al.*, 2018; Van Griensven e Diro, 2019). Existem mais de 70 espécies de animais considerados reservatórios destes parasitas, dentre eles, no ambiente doméstico o cão é relatado como principal e no ambiente silvestre, raposas e marsupiais (Ministério da Saúde, 2017a; Saini *et al.*, 2022).

1.2.1 Ciclo Biológico

O ciclo biológico da *Leishmania* compreende um inseto vetor e um hospedeiro mamífero. Além disso, dois estágios de desenvolvimento do parasita, com formas morfológicas distintas, são observados: um extracelular infectante, promastigota, localizado no tubo digestivo do inseto vetor é alongada com 1 a 4 µm de largura e 5 a 20 µm de comprimento e possui um flagelo; outro intracelular obrigatório, amastigota, encontrado em macrófagos do hospedeiro mamífero, dispondo de uma forma arredondada com diâmetros de 1,5 a 3 x 3 a 6,5 µm (Sunter e Gull, 2017; Tiwari *et al.*, 2018).

O inseto vetor responsável pela transmissão da LV é a fêmea de flebotomíneo do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*. Estes insetos, popularmente conhecidos como mosquito-palha, são mais ativos no período noturno e em sua forma adulta apresentam de 2 a 4 mm de comprimento (**Figura 2**) (World Health Organization, 2017; Valero e Uriarte, 2020). No Brasil, o principal vetor relacionado com a doença é a espécie *Lutzomyia longipalpis*, no entanto, flebotomíneos da espécie *Lutzomyia cruzi* também foram relatados como transmissores (Ministério da Saúde, 2017a). As transmissões por acidentes congênitos, transfusão, transplante de órgãos ou acidentes de laboratório são extremamente raras (Burza *et al.*, 2018).



Figura 2 - Fêmea de flebotomíneo adulta. Fonte: Ministério da Saúde, 2014.

O início do ciclo biológico ocorre quando um inseto vetor infectado, durante o repasto sanguíneo, regurgita promastigotas por sua probóscida. Os parasitas são então internalizados por macrófagos e outras células fagocitárias do hospedeiro mamífero, formando vacúolos parasitóforos. Após fusão com lisossomos, esses vacúolos formam fagolisossomos e devido a troca de microambiente promastigotas se diferenciam em amastigotas. Essas, se multiplicam por divisão binária até causar ruptura da célula e poderem infectar novas células. Quando um novo flebotomíneo fêmea se alimenta do hospedeiro e ingere células infectadas, amastigotas se transformam em promastigotas em seu intestino e migram para sua probóscida, completando o ciclo e continuando a propagação da doença (**Figura 3**) (Lee *et al.*, 2019; Centers for Disease Control and Prevention, 2022).

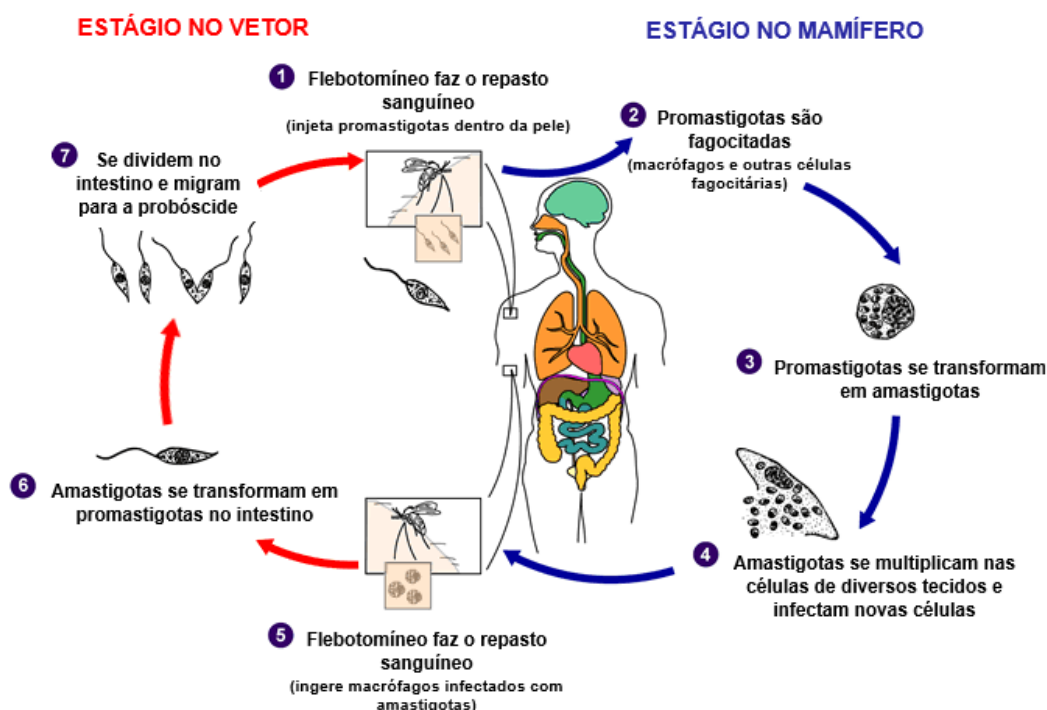


Figura 3 - Ciclo biológico dos parasitas de *Leishmania*. Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2022.

1.2.2 Patogenia

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica que afeta principalmente as células do sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, linfonodos e medula óssea. Comumente, o período de incubação varia de 2 a 6 meses e a doença é caracterizada pelas seguintes manifestações clínicas: febre, perda de peso, aumento dos gânglios linfáticos, pancitopenia (diminuição de células sanguíneas) e hepatoesplenomegalia (aumento do baço e fígado). A LV pode ainda, em alguns casos, ser assintomática e persistir sem manifestações clínicas (Burza *et al.*, 2018; Van Griensven e Diro, 2019).

Pacientes imunossuprimidos têm maior risco de desenvolver LV ativa e apresentam uma evolução clínica mais severa, podendo desenvolver sintomas atípicos. Além disso, exibem uma menor resposta aos tratamentos e maior frequência de recorrência da doença. Em portadores de HIV os parasitas induzem ainda o aumento da multiplicação do vírus e conseqüentemente a uma maior progressão para a AIDS (Lindoso *et al.*, 2018; Ruiz-Postigo *et al.*, 2021).

1.2.3 Epidemiologia

São registados anualmente cerca de 300 mil novos casos de LV em todo mundo, 60% localizados apenas na Ásia. O número de mortes varia de 20 a 50 mil pessoas por ano, uma vez que a doença é fatal dentro de dois anos se não tratada e mesmo quando tratada, pode levar a taxas de mortalidade de 10 a 20% (Hailu, 2016; World Health Organization, 2017, 2022). Considerando os índices de incidência e letalidade, a leishmaniose visceral está entre as seis endemias mais relevantes do mundo, sendo também a segunda parasitose mais fatal, atrás apenas da malária (Ministério da Saúde, 2017a; Mazire *et al.*, 2021).

A LV está presente em diversos países (**Figura 4**), com 90% dos casos concentrados na Índia, China, Nepal, Bangladesh, Quênia, Somália, Etiópia, Sudão, Sudão do Sul e Brasil. A distribuição varia de acordo com a espécie causadoras da doença, a *L. (L.) infantum* está presente na China, América do Sul, Oriente Médio e bacia do Mediterrâneo. Enquanto a *L. (L.) donovani* é prevalente principalmente na

Índia, África Oriental, Nepal e Bangladesh (Burza *et al.*, 2018; Ruiz-Postigo *et al.*, 2021).

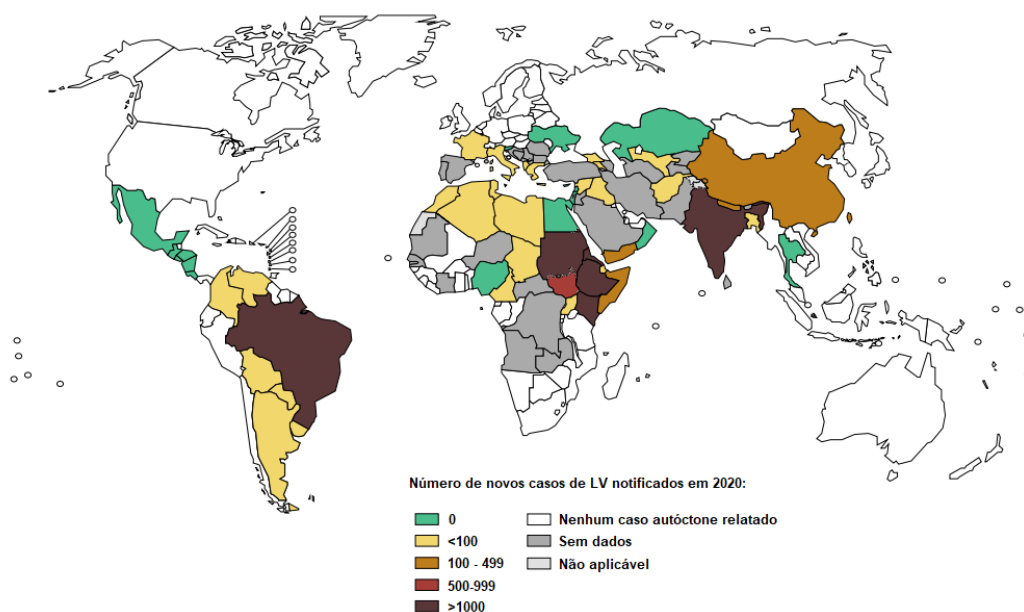


Figura 4 - Distribuição de novos casos de leishmaniose visceral mundialmente no ano de 2020. Fonte: Adaptado de Ruiz-Postigo *et al.*, 2021.

O Brasil é responsável por mais de 90% dos casos de LV reportados na América Latina. Inicialmente a ocorrência era limitada a pequenos locais urbanos e a áreas rurais, no entanto, com o decorrer dos anos, a doença vem se expandindo e atualmente está registrada em quase todo o território nacional, chegando a importantes centros econômicos. Atualmente, a LV está distribuída em 23 dos 26 estados brasileiros, com 49,6% dos casos na Região Nordeste. (**Figura 5**). Além da vasta distribuição continental, somente em 2020 foram registrados 1.933 casos e 165 óbitos, resultando em uma taxa de letalidade de 9,5%, a maior nos últimos 10 anos. Todos esses fatos somados geram uma grande preocupação com o futuro da saúde pública nacional (**Figura 6**) (Ministério da Saúde, 2017a, 2022).

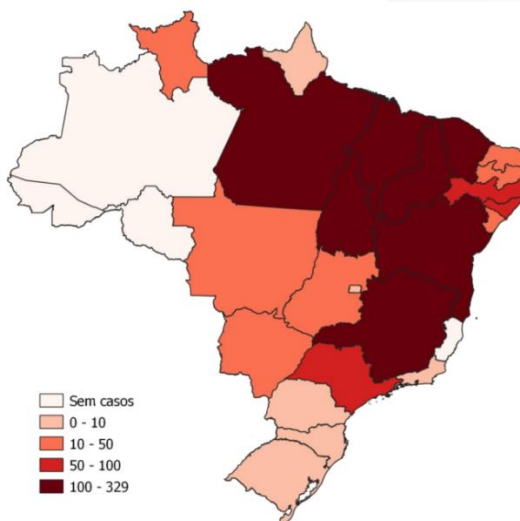


Figura 5 - Distribuição de casos de leishmaniose visceral por município brasileiro no ano de 2020. Fonte: Ministério da Saúde, 2022.

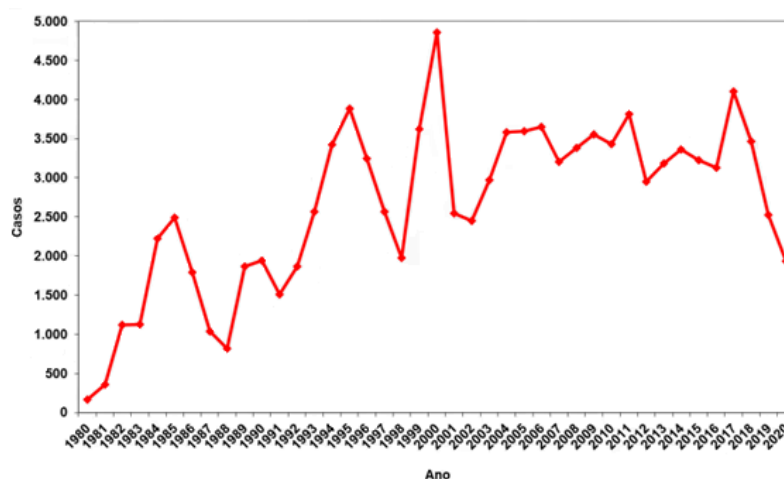


Figura 6 – Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2020. Fonte: Ministério da Saúde, 2022.

1.3. Quimioterapia Disponível para LV

O arsenal quimioterápico da leishmaniose visceral é composto de apenas três fármacos principais: antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina; e da paromomicina, utilizada predominantemente em combinações terapêuticas. Esses tratamentos apresentam diversas limitações, incluindo: toxicidade, administração parenteral, necessidade de hospitalização, longos esquemas posológicos e alto custo. Além disso, nenhum fármaco disponível elimina completamente o parasita e casos de

resistência foram reportados para todos os medicamentos disponíveis. Diante desse cenário, o desenvolvimento de novas quimioterapias seguras e acessíveis para esta doença é indispensável e uma necessidade da era atual (Tiwari *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019).

1.3.1 Antimoniais Pentavalentes (Sb^v)

A terapia antimonial é originária do século XVI, quando utilizada como purgativo. Porém, somente em 1912 foi empregado na leishmaniose tegumentar pelo médico brasileiro Gaspar de Oliveira Viana. Em 1920, foi desenvolvido por Bhrmachari na Índia, o antimonial pentavalente (Marsden, 1985; Lago e Tempone, 2018). Desde então, são utilizados como primeira linha no tratamento da leishmaniose visceral na maioria dos países. No entanto, estes medicamentos demandam esquemas posológicos longos e apresentam significativos efeitos adversos, como: nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, pancreatite e hepatotoxicidade (Mazire *et al.*, 2021).

Atualmente, os antimoniais pentavalentes são comercializados em duas formulações diferentes: estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), ambos administrados por via intravenosa ou intramuscular (Akbari *et al.*, 2017). No Brasil, é recomendado o tratamento com 20 mg/kg/dia de antimonial, por no mínimo 20 dias e no máximo 40 (Ministério da Saúde, 2017a). Entretanto, devido a todas as limitações e ao aumento de cepas resistentes, estes medicamentos vêm sendo utilizados exclusivamente em associações terapêuticas ou substituídos por outras opções, como anfotericina B (Ministério da Saúde, 2017a; Van Griensven e Diro, 2019).

1.3.2 Anfotericina B

A anfotericina B (**Figura 7**), é um agente antifúngico da classe dos polienos, licenciada desde 1959 para o tratamento de infecções fúngicas, sendo um dos fármacos mais prescritos nesta área (Newcomer *et al.*, 1959; Lago e Tempone, 2018). Atualmente, é também utilizado para leishmaniose visceral, compondo a segunda

linha de tratamento desta doença. A anfotericina B vêm sendo empregada principalmente em pacientes que apresentem contraindicações aos antimoniais pentavalentes ou comorbidades prévias, em casos de resistência e para o tratamento de gestantes (Akbari *et al.*, 2017). No entanto, apresenta consideráveis efeitos adversos, incluindo: nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, hipocalcemia e anemia (Bekhit *et al.*, 2018).

A formulação lipossomal da anfotericina B (Ambisome[®]), foi desenvolvida anos depois, com o intuito de reduzir significativamente sua toxicidade, favorecendo sua biodisponibilidade enquanto mantém a potência, ampliando assim a aderência ao tratamento (Adler-Moore e Proffitt, 1993). No Brasil, a anfotericina B é utilizada por infusão intravenosa em um regime de 3 mg/kg/dia, durante 7 dias ou 4 mg/kg/dia, durante 5 dias (Ministério da Saúde, 2017a). Esta formulação apresenta efeitos adversos consideravelmente mais leves, com insuficiência renal, erupção cutâneas e urticárias, que são extinguidos após o fim do tratamento. Apesar de proporcionar os resultados mais promissores no tratamento da LV, este fármaco tem seu uso limitado devido a necessidade de administração parenteral e consequente hospitalização prolongada, além de um elevado custo, restringindo seu uso em locais de baixa renda, como grande parte dos países endêmicos (Uliana *et al.*, 2018; Mazire *et al.*, 2021).

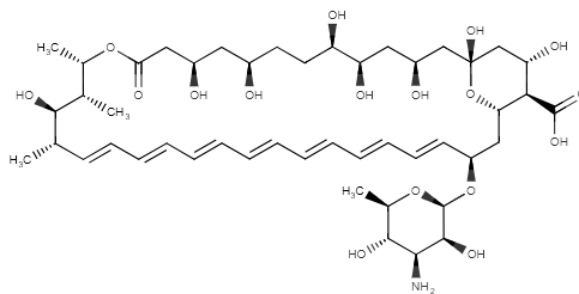


Figura 7 - Estrutura do fármaco anfotericina B. Fonte: DrugBank, 2022.

1.3.3 Paromomicina

A paromomicina (**Figura 8**), é um antibiótico oral de amplo espectro da classe dos aminoglicosídeos, desenvolvida em 1959 (Yow e Yow, 1961; Lago e Tempone, 2018). Logo após, em 1968, seu uso terapêutico para as leishmanioses foi demonstrado. No entanto, apenas em 2007 este fármaco foi licenciado na Índia, para

tratamento de leishmaniose visceral por via intramuscular (Neal, 1968; Mazire *et al.*, 2021). Apesar da acessibilidade, o desenvolvimento de resistência, assim como os efeitos colaterais (ototoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade), limitaram o uso deste fármaco a regimes de combinação terapêutica. Além do mais, quando associada a antimoniais pentavalentes, a paromomicina apresenta resultados superiores aos da monoterapia, mostrando-se tão eficaz quanto os antimoniais isoladamente, porém com menor mortalidade (Bekhit *et al.*, 2018; Van Griensven e Diro, 2019).

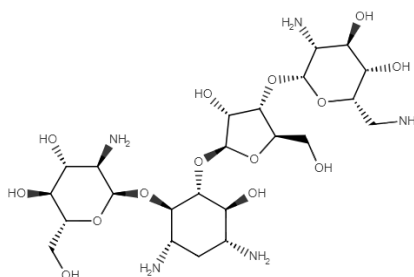


Figura 8 - Estrutura do fármaco paromomicina. Fonte: DrugBank, 2022.

1.3.4 Miltefosina

A miltefosina, uma hexadecilfosfolina (**Figura 9**), é um composto alquilfosfolípídico, análogo de fosfatidilcolina, desenvolvido primeiramente, em 1982, como anti-inflamatório e antineoplásico. Em 2002, foi introduzido como o primeiro medicamento de administração oral licenciado para a terapêutica das leishmanioses, tornando dispensável a hospitalização de pacientes e consequentemente expandindo a adesão ao tratamento (Unger *et al.*, 1989; Uliana *et al.*, 2018). Apesar de representar um grande avanço clínico, a miltefosina tem seu uso humano restringido, com aprovação apenas na Índia. Este fato se deve principalmente ao prolongado tempo de meia-vida plasmática deste fármaco, o que acarreta um grande risco de surgimento de cepas resistentes após uso extensivo (Bekhit *et al.*, 2018; Palić *et al.*, 2022). No Brasil, a miltefosina foi disponibilizada somente em 2017, sendo empregada exclusivamente no tratamento de leishmaniose visceral canina e posteriormente na leishmaniose tegumentar humana (Ribeiro *et al.*, 2018). Ademais, por ser um composto teratogênico, o tratamento de mulheres grávidas ou em período fértil é

inviabilizado. Dentre outros efeitos adversos, é possível mencionar: diarreia, vômito, febre, além de ocasional nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Mazire *et al.*, 2021).

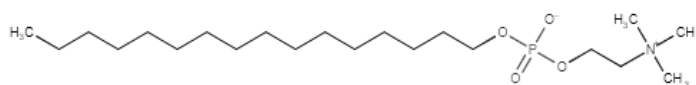


Figura 9 - Estrutura do fármaco miltefosina. Fonte: DrugBank, 2022.

1.4. Descoberta e Desenvolvimento de Novas Quimioterapias

A introdução de uma nova molécula farmacêutica no mercado, desde o conceito inicial até o lançamento do produto (**Figura 10**), é um processo extenso e de elevado custo, com duração em torno de 10 a 17 anos e despesas acima de US\$ 1 bilhão (Balaña-Fouce *et al.*, 2019). Neste contexto, este desenvolvimento pode ser fundamentado em duas vertentes diferentes: reposicionamento ou descoberta. A primeira consiste na inclusão de novas indicações terapêuticas para fármacos já aprovados. Considerando que estes compostos já possuem perfis de farmacocinética e segurança comprovados por ensaios clínicos, é possível então reduzir o tempo e custo do processo (Cha *et al.*, 2018, Andrade-Neto *et al.*, 2018). Já a segunda, visa a identificação de novas moléculas químicas, provenientes de diferentes fontes: produtos naturais, bibliotecas químicas, métodos computacionais ou química combinatória (Swinney e Anthony, 2011; Pirintsos *et al.*, 2022). Atualmente o arsenal quimioterápico da leishmaniose visceral compreende fármacos predominantemente introduzidos por reposicionamento (Lago e Tempone, 2018).

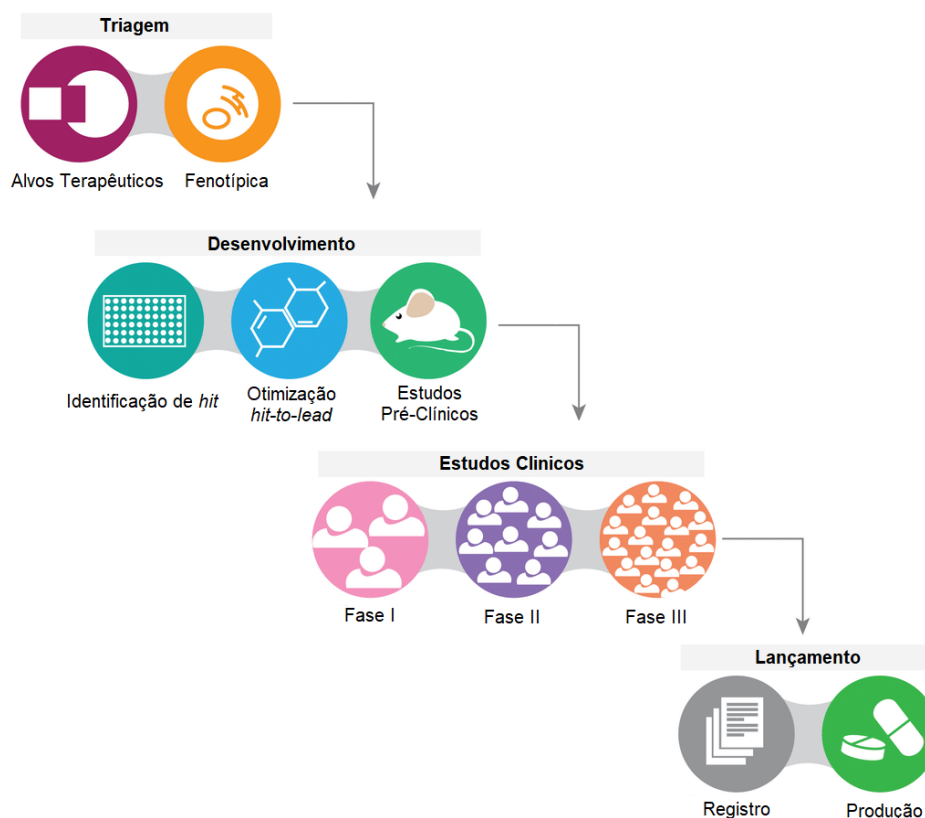


Figura 10 - Etapas do desenvolvimento de fármacos. Adaptado de Ferreira, 2019.

Independente da estratégia empregada, as etapas iniciais da pesquisa de novos quimioterápicos incluem essencialmente a identificação de um composto ativo (*hit compound*), que pode ser realizada por triagens baseadas em alvos terapêuticos ou triagens fenotípicas (Balaña-Fouce *et al.*, 2019; Cohen e Azas, 2021).

Desde o início da era genômica na década de 80, as grandes indústrias farmacêuticas vêm priorizando a seleção de moléculas com atividade em um alvo molecular específico, identificado *in silico* e validado bioquimicamente *in vitro*. Esta abordagem é conhecida como triagem baseada em alvos terapêuticos. Normalmente, são selecionadas proteínas conhecidas, envolvidas em processos fundamentais para a progressão da doença, desenvolvimento e sobrevivência do microrganismo ou parasita. Alvos moleculares ausentes no hospedeiro mamífero ou estruturalmente diferentes, são também cruciais, visto que reduzem os possíveis efeitos adversos (Davis, 2020, Vincent *et al.*, 2020). No entanto, na área das leishmanioses, estas proteínas e vias metabólicas ainda não são bem estabelecidas e poucos alvos são conhecidos e validados, restringindo o uso desta técnica. A falta de tradução dos resultados moleculares para estudos em organismos celulares *in vitro* ou *in vivo* e,

consequente, ausência de eficácia, também reduz o número de candidatos promissores provenientes desta triagem (Jones *et al.*, 2018; Balaña-Fouce *et al.*, 2019).

Segundo o DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*), a abordagem fenotípica é considerada a mais apropriada e eficiente para aumentar a diversidade química, no que se trata de protozooses negligenciadas (Don e Ioset, 2014). Neste tipo de triagem uma molécula é selecionada com base em sua atividade frente a uma célula, tecido ou organismo, não sendo definido um alvo terapêutico específico. Desta forma, é possível mimetizar as condições fisiológicas celulares e até as do hospedeiro, gerando resultados de maior relevância biológica e reduzindo possíveis falhas terapêuticas nas fases subsequentes (Clatworthy *et al.*, 2018). No entanto, um dos grandes desafios das triagens fenotípicas para doenças parasitárias é a existência de múltiplas formas morfológicas, restritas a diferentes microambientes e com metabolismos distintos. No caso das leishmanias, o processo de seleção do estágio de desenvolvimento a ser trabalho é crítico para a evolução da pesquisa e os ensaios podem ser realizados em promastigotas, amastigotas axênicas ou intracelulares, sendo a última, a forma priorizada devido a maior importância clínica (Cohen e Azas, 2021).

Ao mesmo tempo, a elucidação do mecanismo de ação dos compostos, fica como um viés desta abordagem e é investigado apenas após a confirmação de sua eficácia. Apesar de não ser necessário para o registro do fármaco, este tipo de informação é extremamente relevante para identificação de novos alvos moleculares e otimização estrutural racional para incremento da potência e seletividade, além de auxiliar na compreensão de uma possível toxicidade (Aulner *et al.*, 2019; Rycker *et al.*, 2022). Entretanto, apenas 10 a 20% dos fármacos aprovados atualmente possuem mecanismos de ação elucidados ou conhecidos. No tratamento das leishmanioses, grande parte dos fármacos utilizados na clínica não possuem informações precisas e parecem interagir e interferir com múltiplos alvos metabólicos. Sendo assim, a inclusão de fármacos com diferentes mecanismos de ação oferece a oportunidade de descoberta de novos alvos moleculares e vias metabólicas, podendo promover a redução dos índices de resistência e aumentar a efetividade de combinações terapêuticas, com o estímulo de vias alternativas de morte celular (Davis, 2020).

O processo de construção de uma nova molécula farmacêutica exige a adequação de suas características àsquelas de fármacos já aprovados (*drug-likeness*). Para isto, após a triagem e seleção de um composto ativo, este é utilizado como protótipo para otimização estrutural, objetivando o desenvolvimento de uma molécula que atenda aos requisitos de perfil farmacêutico desejável (*lead compound*). Este processo denominado “*hit-to-lead*”, envolve o incremento de propriedades físico-químicas e farmacológicas, visando a melhora da potência e seletividade. Sendo assim, as modificações moleculares auxiliam na seleção de fármacos com parâmetros apropriados de biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade, tendendo a apresentar uma melhor eficácia *in vivo* (Nag *et al.*, 2022). Em triagens fenotípicas, devido à ausência de alvos bioquímicos definidos, o processo de otimização molecular pode ser iniciado por meio de estudos *in silico*, utilizando *softwares* e filtros específicos. Desta forma, é possível direcionar o desenho de análogos através de predições de parâmetros físico-químicos (logP, log D, solubilidade, massa molecular) e propriedades farmacocinéticas de ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) (Katsuno *et al.*, 2015; Lombardo *et al.*, 2017).

Considerando que a maioria das falhas terapêuticas são observadas em fases pré-clínicas e clínicas, o grupo da farmacêutica Novartis, demonstrou a importância dos estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos (PK/PD). Com isto, um novo racional foi sugerido para este processo, incluindo estas etapas nas fases iniciais da pesquisa de novos fármacos, aumentando assim a chance de êxito (Tuntland *et al.*, 2014). Portanto, para os compostos com eficácia terapêutica e características moleculares adequadas, é primordial a obtenção de um perfil farmacocinético detalhado (Hughes *et al.*, 2011). Esta avaliação é realizada *in vivo* após tratamento com o composto de interesse, fornecendo informações de exposição plasmática (AUC - área sob a curva), tempo de meia vida ($T_{1/2}$) e concentração máxima (C_{max}). Desta forma, é possível prever o esquema posológico, estabelecendo um projeto experimental refinado e personalizado para etapas posteriores e reduzindo o tempo de desenvolvimento do fármaco e o uso de animais. Durante os testes iniciais de farmacocinética, moléculas que demonstrem resultados promissores podem prosseguir para uma investigação mais extensa, com múltiplas doses, diferentes concentrações e vias de administração, além de serem consideradas como candidatas para estudos pré-clínicos de eficácia *in vivo*, farmacodinâmica e metabolismo. Já as moléculas com

propriedades desfavoráveis, devem regressar ao processo de otimização estrutural (Croft, 2017; Balaña-Fouce *et al.*, 2019).

1.5. Produtos Naturais como Novos Protótipos Farmacêuticos

Produtos naturais são compostos químicos derivados de animais, plantas ou microrganismos. Desde os primórdios da medicina são utilizados para o tratamento de doenças humanas, constituindo a base dos primeiros fármacos descobertos (Tiwari *et al.*, 2018). Historicamente, diversas pesquisas sobre a eficácia e segurança destes produtos foram fundamentadas nos conhecimentos tradicionais, orientadas pela etnofarmacologia. Neste contexto, ao longo dos anos, produtos naturais vêm desempenhando um papel fundamental como fonte de compostos com excelente potencial farmacológico, empregados também como protótipos para inspiração de novas moléculas químicas (Chopra e Dhingra, 2021).

Atualmente, os produtos de fontes naturais vêm sendo cada vez mais difundidos e a exploração científica de suas aplicações vêm contribuindo significativamente para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, principalmente nas áreas de doenças infecciosas e câncer (Atanasov *et al.*, 2021; Pirintsos *et al.*, 2022). Newman e Cragg (2020) relatam que cerca de 50% de todos os fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) tem suas estruturas baseadas em produtos naturais (**Figura 11**). Dentre eles, podem ser citados anticancerígenos como taxol (*Taxus brevifolia*), vimblastina e vincristina (*Catharanthus roseus*). Também são descritos exemplos bem-sucedidos de analgésicos como morfina (*Papaver somniferum*) e o antibiótico penicilina (*Penicillium* spp.), além do primeiro fármaco antimalárico, quinina (*Cinchona* spp.) e a artemisinina (*Artemisia annua*) (Thomford *et al.*, 2018; Varela e Fernandes, 2020).

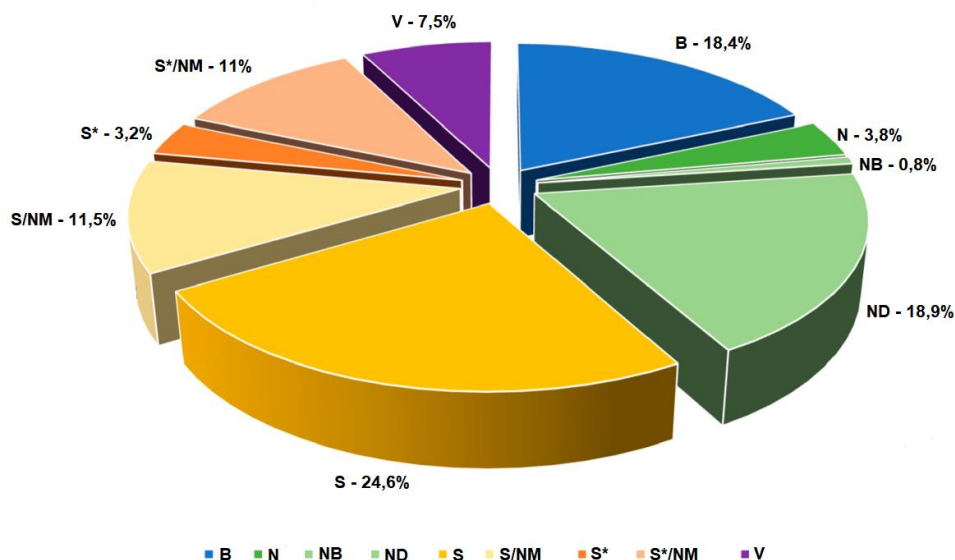


Figura 11 - Distribuição (em porcentagem) das fontes de 1881 fármacos desenvolvidos no período de 1981 a 2019. (B) macromolécula biológica; (N) produto natural; (NB) extrato botânico; (ND) derivado de produto natural: semissintético; (S) fármaco totalmente sintético; (S/NM) fármaco totalmente sintético inibidor competitivo direto do substrato natural; (S*) fármaco totalmente sintético com o farmacóforo de produto natural; (S*/NM) fármaco totalmente sintético com farmacóforo de produto natural inibidor competitivo direto do substrato natural e (V) vacina. Fonte: Adaptado de Newman e Cragg, 2020.

Em especial, as plantas são a principal fonte de moléculas farmacêuticas, oferecendo um gama de substâncias naturais com eficácia terapêutica (Beutler *et al.*, 2019). Além disso, extratos vegetais são prescritos até hoje para o tratamento de doenças em diversos países, como China e Índia (Zhang *et al.*, 2020). Estima-se também que existam de 300 a 400 mil espécies de plantas no mundo, poucas exploradas quanto a sua quimiodiversidade. Desta forma, a relevância das pesquisas fitoterápicas é evidenciada, principalmente em países tropicais como o Brasil, que possui uma das mais vastas biodiversidades do mundo (Thomford *et al.*, 2018; Newman e Cragg, 2020). A variedade e abundância destes vegetais resultam então em uma grande diversidade de metabólitos secundários produzidos, principalmente nas diferentes condições ecológicas nas quais as plantas são submetidas, impactando diretamente seu metabolismo. Estas moléculas desempenham papéis importantes na sobrevivência, comunicação, proteção contra predadores e estresses ambientais (Pirintsos *et al.*, 2022). Considerando que a biodiversidade do planeta ainda é pouco explorada, um número grande de produtos naturais tende a ser descoberto no futuro,

fornecendo uma oportunidade de ampliação do espaço químico conhecido (Chopra e Dhingra, 2021).

1.5.1 *Nectandra leucantha* (Lauraceae)

A Lauraceae está entre as principais famílias de angiospermas conhecidas, compreendendo aproximadamente 68 gêneros e 3000 espécies, predominantemente arbóreas e de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais (Gottlieb, 1972; The Plant List, 2022). Ademais, esta família possui grande relevância econômica, produzindo frutos e especiarias comercializáveis, como abacate e canela, além de madeira de alta qualidade. Do ponto de vista fitoquímico, é fonte majoritariamente de lignóides e alcalóides (Grecco *et al.*, 2016).

O gênero *Nectandra* é o segundo maior da família Lauraceae, englobando cerca de 120 espécies, sendo 40 delas encontradas no Brasil. As plantas deste gênero dispõem de uma grande quimiodiversidade, sendo empregadas na medicina tradicional como anti-inflamatórios, anestésicos, analgésicos, antiprotozoários e antifúngicos (Macías-Villamizar *et al.*, 2015). A composição química deste gênero foi primeiramente reportada em 1898 e uma variedade de substâncias foi descoberta posteriormente (Garcez *et al.*, 2009; Grecco *et al.*, 2016). Sobretudo, a espécie *Nectandra leucantha* Ness & Mart (**Figura 12**) tem sido frequentemente associada a produção de metabolitos secundários com potencial farmacológico. Esta árvore de grande porte (5-10 m), popularmente nomeada de "canela-branca" ou "canela-seca", é encontrada em diferentes estados brasileiros (São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro), incentivando ainda mais sua investigação. Desta forma, uma ampla diversidade de compostos isolados foi descrita, incluindo não apenas lignóides e alcalóides, mas também uma quantidade abundante de flavonóides, terpenos, fenilpropanóides e esteróides (Zanon *et al.*, 2009; Grecco *et al.*, 2016).



Figura 12 - *Nectandra leucantha* Nees & Mart (Lauraceae). Fonte: UFRGS, 2018.

1.5.2 Estudos Prévios: Neolignanas de *Nectandra leucantha* (Lauraceae)

Neolignanas são uma subclasse de lignóides, constituídas pelo acoplamento de dois fenilpropanoides. Estes metabolitos secundários são biosintetizados com base no aminoácido fenilalanina e diferentemente das lignanas, a ligação dos dímeros não ocorre pelos carbonos 8-8' (Teponno *et al.*, 2016; Varela e Fernandes, 2020). Na busca por novos fármacos para leishmaniose visceral, nosso grupo descreveu pioneiramente a atividade anti-*Leishmania (L.) donovani* de neolignanas isoladas da planta brasileira *Nectandra leucantha* (Lauraceae) (Costa-Silva *et al.*, 2015). Entre elas, desidrodieugenol B (**Figura 13**) foi a mais seletiva e em uma análise posterior, demonstrou um perfil de segurança promissor *in silico*, sem potencial mutagênico, carcinogênico ou genotóxico (Grecco *et al.*, 2017b). Ademais, a atividades anti-*Trypanosoma cruzi* destas neolignanas também foi reportada (Grecco *et al.*, 2017a, 2017b).

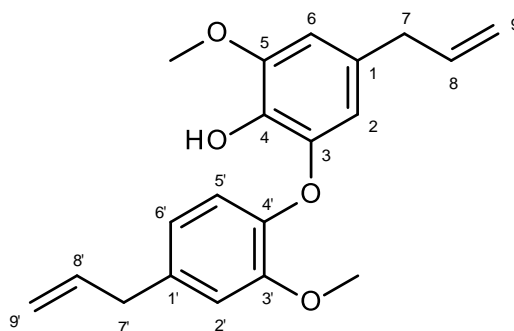


Figura 13 - Estrutura do composto desidrodieugenol B. Fonte: Costa-Silva *et al.*, 2015.

A partir desses estudos, quatro derivados semissintéticos foram preparados por modificações químicas estruturais, utilizando o desidrodieugenol B como protótipo. Os compostos demonstraram atividade potente e seletiva contra amastigotas de *Leishmania (L.) infantum in vitro*, com valores de CE_{50} variando de 6 a 35 μM . Além disso, em uma avaliação *in silico*, apresentaram boa disponibilidade oral, não se assemelharam a compostos de interferência (*PAINS*) e também não exibiram potencial mutagênico ou indutor de fosfolipidose (Amaral *et al.*, 2019).

O processo de obtenção da neolignana desidrodieugenol B através de galhos e folhas de *Nectandra leucanta*, é conhecido e relatado na literatura (Costa-Silva *et al.*, 2015; Grecco *et al.*, 2017b). No entanto, com o intuito de facilitar a obtenção e possibilitar alterações mais específicas na molécula, a síntese total desse composto foi desenvolvida, utilizando como base um acoplamento de Ullmann catalisado por cobre (Buck *et al.*, 2002). A estratégia de síntese compreende seis etapas e envolve a iodação do anel aromático de uma molécula de eugenol, previamente protegida por um grupo protetor metoximetila (MOM), seguida do acoplamento a outro eugenol. Ao final, o grupamento MOM é retirado e se tem desidrodieugenol B como produto (Figura 14) (Sear *et al.*, 2020).

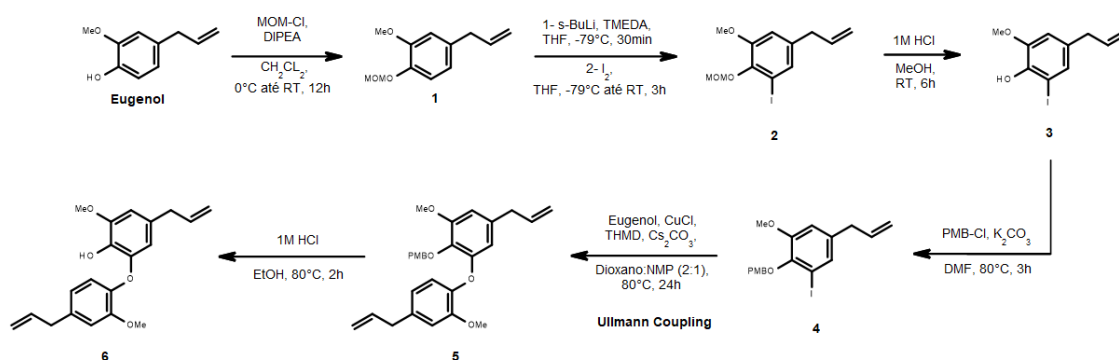


Figura 14 - Esquema de síntese total do desidrodieugenol B em seis etapas.

Neste trabalho, utilizando desidrodieugenol B como protótipo, uma série de 55 derivados sintéticos e 2 semissintéticos foram preparados e analisados contra amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*. Esses compostos foram sintetizados com diferentes padrões de substituições estruturais objetivando incrementar a atividade biológica. Para isso três abordagens foram empregadas (Figura 15): I) Substituições no grupo fenol do anel A (**R1**); II) Remoção dos grupos

metoxi (**R2-A e B**) e III) Saturação, substituição ou remoção das cadeias laterais de alil (**R3-A e B**).

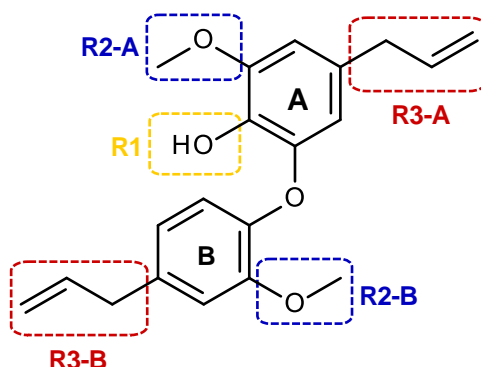


Figura 15 - Abordagens de modificação estrutural do desidrodieugenol B.

1.6. Justificativa

Tendo em vista o atual cenário de resistência e o número restrito de fármacos disponíveis na clínica, todos com inúmeras limitações de toxicidade, a pesquisa de novas quimioterapias para a leishmaniose visceral se faz indispensável e urgente. Considerando a diversidade de produtos naturais disponíveis para exploração e os estudos prévios realizados com neolignanas provenientes da biodiversidade brasileira, o presente trabalho visa ampliar as bibliotecas químicas por meio de otimizações moleculares, utilizando abordagens multidisciplinares e incluindo colaborações internacionais.

Desta forma, o desidrodieugenol B, isolado da planta *Nectandra leucantha* (Lauraceae), foi selecionado como protótipo para a construção de novas moléculas farmacêuticas. Este processo foi realizado através de um racional estratégico de “*hit to lead*”, baseado em triagens fenotípicas, objetivando a obtenção de um análogo mais seletivo e potente, com propriedades físico-químicas e farmacológicas desejáveis. Buscamos assim, dar impulso a pesquisa científica e ampliar a competência no desenvolvimento de novas terapias para a leishmaniose visceral.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Estudar *in vitro* a atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* de novos derivados semissintéticos e sintéticos da neolignana desidrodieugenol B e selecionar o composto mais promissor para avaliação dos possíveis mecanismos de ação antiparasitária e perfil farmacocinético.

2.2 Específicos

1. Preparar uma nova série de compostos sintéticos e semissintéticos derivados da neolignana desidrodieugenol B.

2. Determinar *in vitro* a Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) dos compostos em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*.

3. Determinar *in vitro* a Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀) dos compostos em células de mamífero.

4. Estudar *in silico* propriedades físico-químicas e parâmetros de ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) do composto mais promissor.

5. Estudar *in vitro* a atividade hemolítica do composto mais promissor em eritrócitos de camundongo.

6. Avaliar *in vitro* os possíveis mecanismos de ação do composto mais promissor em promastigotas de *L. (L.) infantum*, investigando:

- a. Alterações na permeabilidade da membrana plasmática;
- b. Alterações no potencial da membrana plasmática ($\Delta\psi_p$);
- c. Alterações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$);
- d. Alterações nos níveis de adenosina trifosfato (ATP);
- e. Alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS);
- f. Alterações nos níveis de cálcio intracelular (Ca^{2+});
- g. Alterações nos acidocalcissomos;

- h. Alterações nos níveis de proteínas totais;
- l. Alterações no perfil proteico por MALDI-TOF/MS;
- i. Alterações do ciclo celular;
- j. Alterações na integridade do DNA;
- k. Alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

7. Avaliar o potencial imunomodulatório do composto mais promissor, através da dosagem de óxido nítrico (NO) e citocinas.

8. Determinar *in vivo* o perfil farmacocinético do composto mais promissor.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Equipamentos

Sytox® Green, brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), ácido bis-(1,3-dimetil tiobarbitúrico) trimetil oxonol (Bisoxonol), 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1), ATP Determination Kit, iodeto de propídio (PI), laranja de acridina, fluo-4 AM e BCA Protein Assay Kit foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific. Soro fetal bovino (SFB) foi obtido da Gibco, sulfato de gentamicina da Hipolabor Farmacêutica e QIAamp DNA Mini Kit da Qiagen. A matrix de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (HCCA) e o padrão bacteriano de extrato proteico DH5-alfa de *Escherichia coli* (BTS) foram adquiridos da Bruker-Daltonics. Já os kits BD OptEIA Mouse ELISA set para IL-4, IL-10, IL-12 e INF- γ foram obtidos da BD Biosciences. Todos os outros reagentes não mencionados foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

As leituras de luminescência, absorvância e fluorescência foram realizadas utilizando o espectrofluorímetro FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) ou o citômetro de fluxo Atunne NxT (Thermo Fisher Scientific). Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹³C foram registrados a 75 MHz e de ¹H a 300 MHz, em um espectrômetro Bruker Advance 300. CDCl₃ foi empregado como solvente e TMS como referência.

As análises de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para avaliação de pureza foram realizadas no equipamento Proeminence LC-20A (Shimadzu) e para a avaliação farmacocinética no Nexera-i LC-2040C (Shimadzu). As análises de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) para caracterização dos compostos foram realizadas no Daltonics MicroTOF QII (Bruker-Daltonics) e para a avaliação do perfil proteico no MALDI-TOF/MS BrukerAutoflex III (Bruker-Daltonics).

3.2 Animais de Experimentação

Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) machos e camundongos BALB/c fêmeas foram obtidos do biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL) e mantidos em caixas esterilizadas com ambiente controlado, recebendo água e alimento *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente avaliados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Adolfo Lutz e do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (Projeto CEUA 05/2018, 000404A respectivamente).

3.3 Parasitas

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em meio 199 suplementado com NaHCO₃ (26 mM), L-glutamina (2 mM), sulfato de gentamicina (20 µg/mL), SFB (10%), hemina (0,25%) e urina humana (5%) a 24°C e pH 7,2.

Amastigotas de *L. (L.) infantum* foram obtidas a partir da purificação por centrifugação diferencial do baço de hamsters dourados com 60-70 dias de infecção. O número de parasitas foi determinado pelo método de Stauber e colaboradores (1958). Para manutenção da cepa, animais recém-desmamados foram infectados mensalmente com 1×10^8 amastigotas/animal.

3.4 Células de Mamíferos

Fibroblastos de tecido conjuntivo de camundongos, NCTC clone 929 (ATCC® CCL-1™), foram fornecidos pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz-SP e mantidos em meio RPMI-1640 com NaHCO₃ (24 mM), sulfato de gentamicina (20 µg/mL) e 10% de SFB em pH 7,2 a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

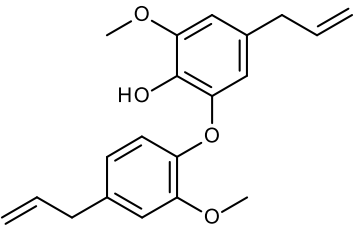
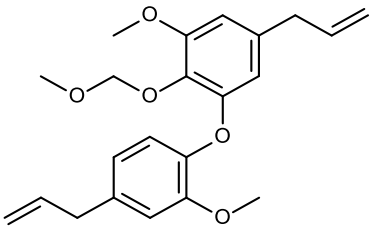
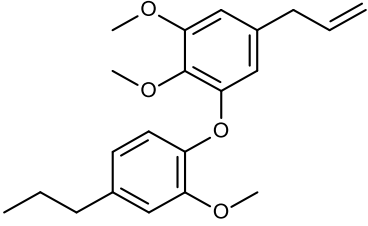
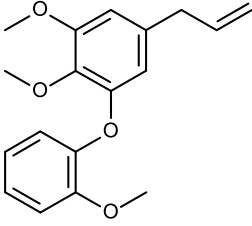
Macrófagos peritoneais foram coletados por meio de lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c com meio RPMI-1640 acrescido de NaHCO_3 (24 mM), sulfato de gentamicina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 10% de SFB em pH 7,2.

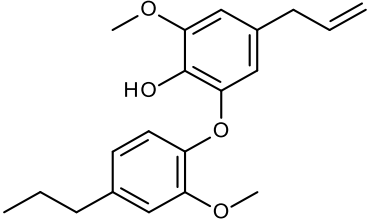
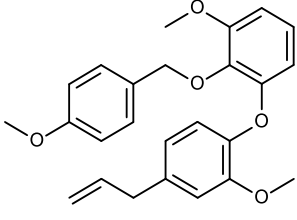
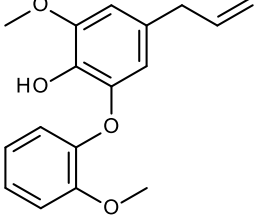
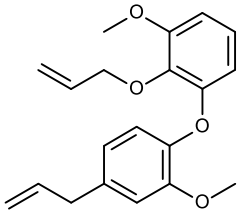
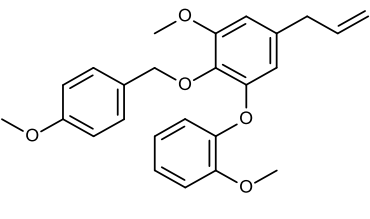
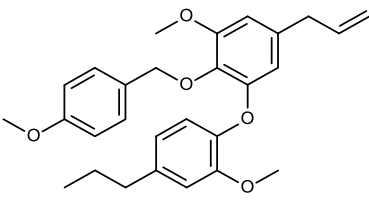
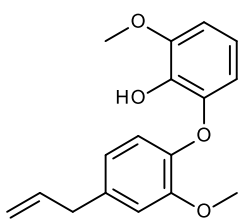
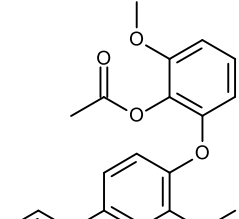
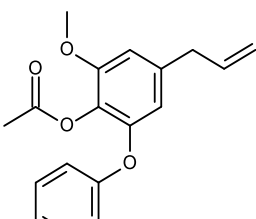
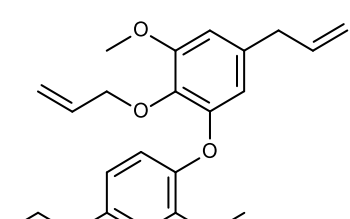
3.5 Preparo dos Derivados Sintéticos e Semissintéticos

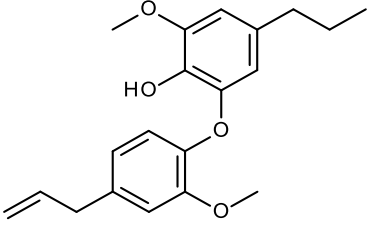
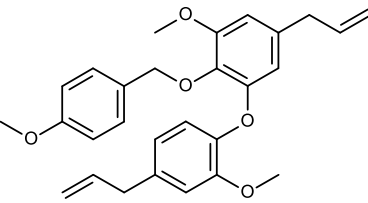
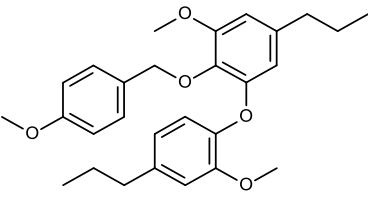
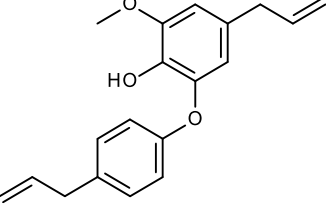
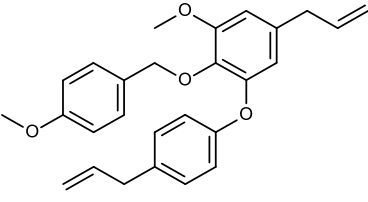
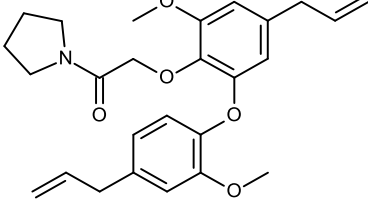
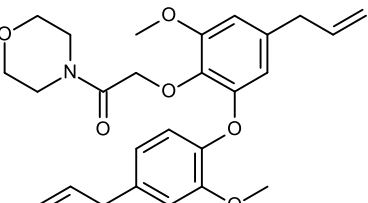
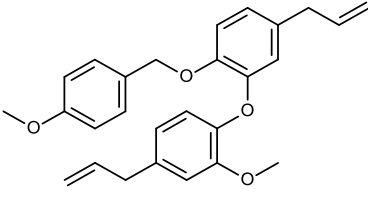
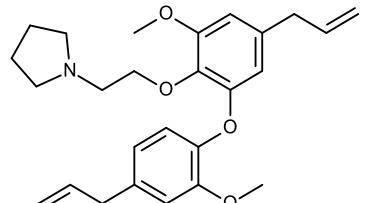
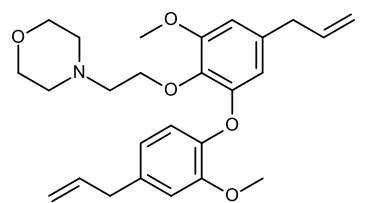
3.5.1 Derivados Sintéticos

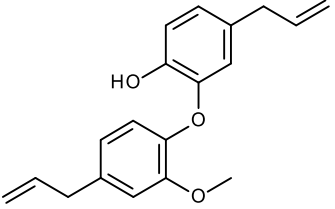
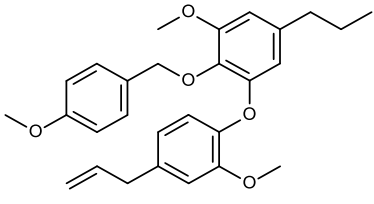
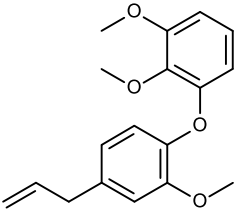
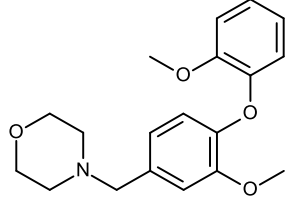
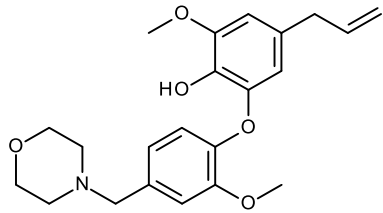
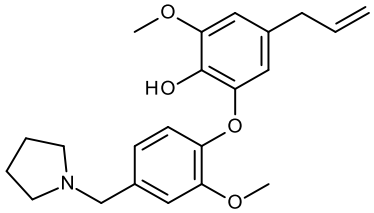
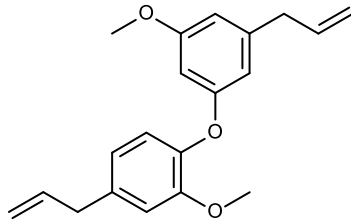
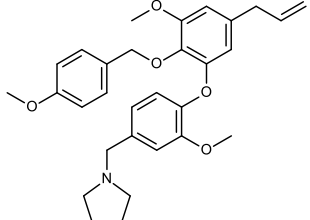
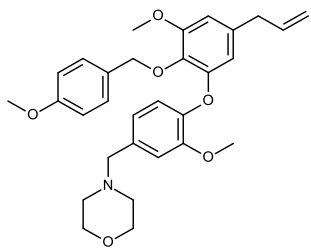
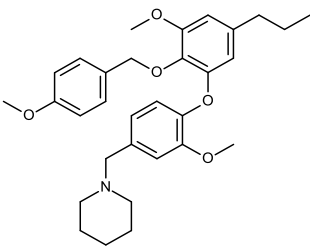
Os compostos sintéticos foram obtidos em colaboração com o Prof. Dr. Edward A. Anderson (Department of Chemistry, Oxford University, Oxford - UK) utilizando como protótipo desidrodieugenol B. Uma serie de 55 derivados foi preparada por meio de alterações químicas nas cadeias laterais desta neolignana, seguindo a síntese orientada pela diversidade estrutural (**Tabela 1**). Os compostos foram caracterizados por RMN e HRMS, com grau de pureza no mínimo de 97%, analisado por HPLC.

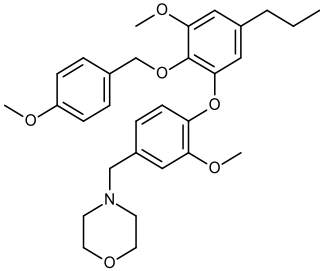
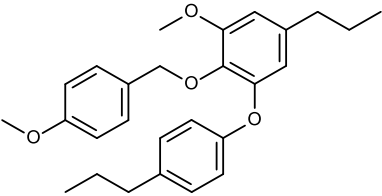
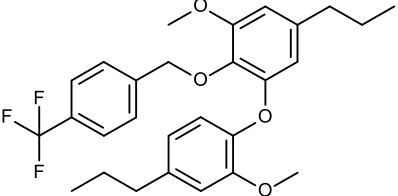
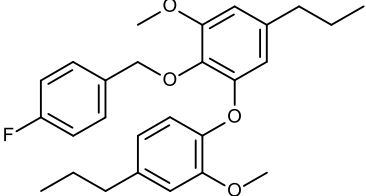
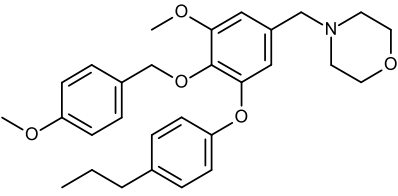
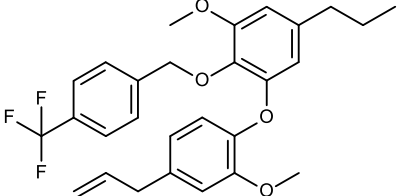
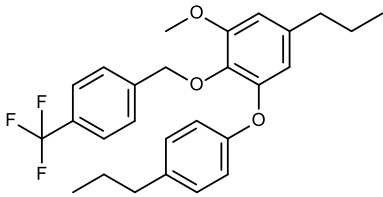
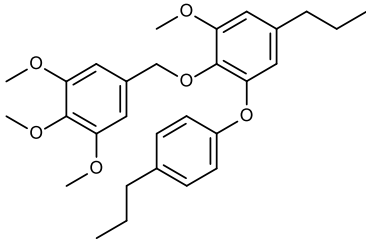
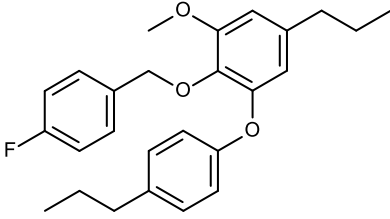
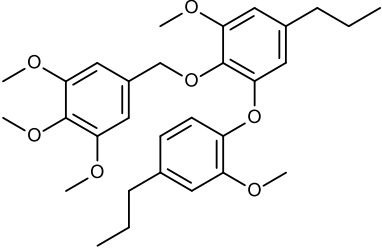
Tabela 1 - Estrutura e massa molecular (MM) do protótipo desidrodieugenol B e dos 55 compostos sintéticos preparados.

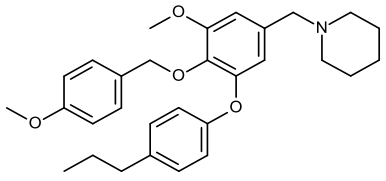
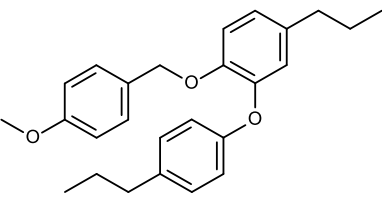
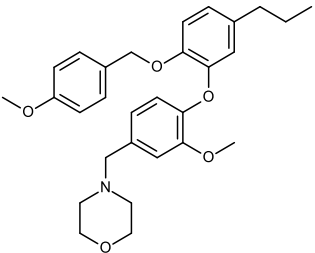
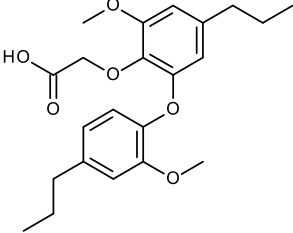
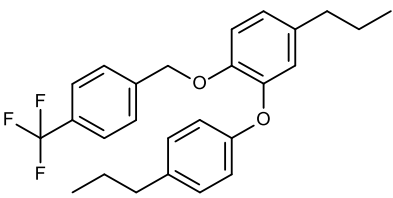
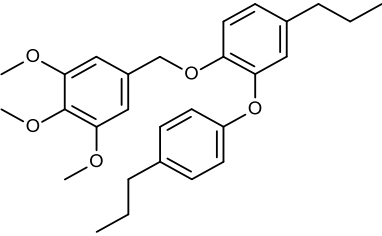
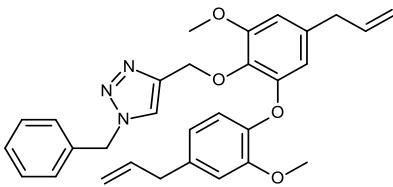
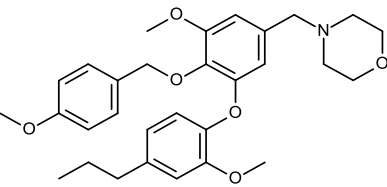
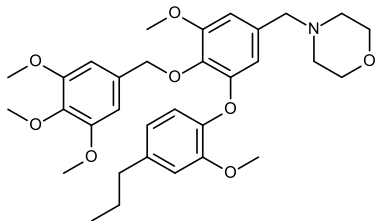
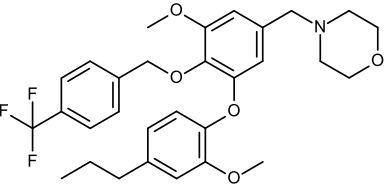
Estrutura Molecular	MM	Estrutura Molecular	MM
 <p>Desidrodieugenol B</p>	326,15	 <p>CES392</p>	370,44
 <p>CES410</p>	342,43	 <p>CES411</p>	300,35

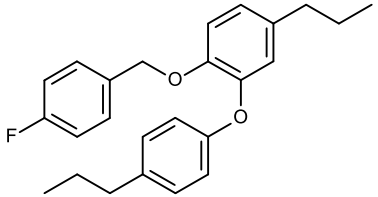
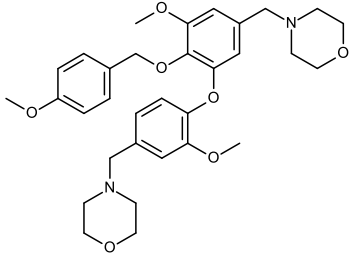
 <p>CES413</p>	328,40	 <p>CES427</p>	406,47
 <p>CES429</p>	286,32	 <p>CES435</p>	326,39
 <p>CES436</p>	406,47	 <p>CES437</p>	448,55
 <p>CES438</p>	268,32	 <p>CES442</p>	328,36
 <p>CES448</p>	328,36	 <p>CES462</p>	366,45

 <p>CES464</p>	328,40	 <p>CES467</p>	446,53
 <p>CES468</p>	450,57	 <p>CES474</p>	296,36
 <p>CES475</p>	416,51	 <p>CES476</p>	437,53
 <p>CES477</p>	453,53	 <p>CES508</p>	416,51
 <p>CES509</p>	423,54	 <p>CES512</p>	439,54

 <p style="text-align: center;">CES530</p>	296,36	 <p style="text-align: center;">CES535</p>	448,55
 <p style="text-align: center;">MMH661</p>	300,35	 <p style="text-align: center;">PP1</p>	329,39
 <p style="text-align: center;">PP2</p>	385,45	 <p style="text-align: center;">PP3</p>	369,45
 <p style="text-align: center;">PP126</p>	310,39	 <p style="text-align: center;">PP475</p>	489,25
 <p style="text-align: center;">PP480</p>	505,25	 <p style="text-align: center;">SN27</p>	505,65

 <p style="text-align: center;">SN28</p>	507,63	 <p style="text-align: center;">SN32</p>	420,55
 <p style="text-align: center;">SN34</p>	488,55	 <p style="text-align: center;">SN36</p>	438,54
 <p style="text-align: center;">SN39</p>	477,60	 <p style="text-align: center;">SN43</p>	486,53
 <p style="text-align: center;">SN44</p>	458,52	 <p style="text-align: center;">SN45</p>	408,60
 <p style="text-align: center;">SN47</p>	408,51	 <p style="text-align: center;">SN48</p>	510,63

 <p>SN52</p>	475,63	 <p>SN57</p>	390,52
 <p>SN58</p>	477,60	 <p>SN59</p>	388,46
 <p>SN62</p>	428,49	 <p>SN63</p>	450,57
 <p>HA043</p>	497,59	 <p>HA075</p>	507,63
 <p>HA077</p>	567,68	 <p>HA078</p>	545,60

 <p style="text-align: center;">HA147</p>	378,49	 <p style="text-align: center;">HA171</p>	564,68
--	--------	---	--------

3.5.2 Derivados Semissintéticos

O isolamento do composto natural, desidrodieugenol B, foi realizado com o auxílio do Prof. Dr. João Henrique G. Lago (Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André - SP) seguindo a metodologia descrita pelo grupo previamente (Costa-Silva *et al.*, 2015). Os galhos de *N. leucantha* foram coletados e identificados pelo botânico Euder G. A. Martins (CEPEMA-USP) no Parque Ecológico do Perequê na cidade de Cubatão/SP (Grecco SS *et al.*, 2015). O material foi depositado no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP) com o número da exsicata EM357.

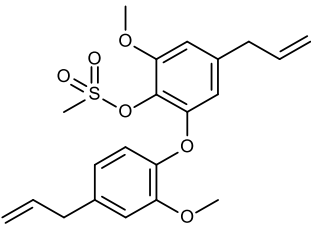
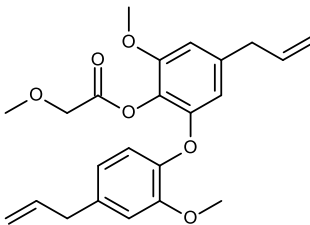
Aproximadamente 263 g de galhos finos foram secos em temperatura ambiente e moídos. O material vegetal foi então extraído até esgotamento com hexano e em seguida com MeOH. O extrato metanólico (12 g) foi submetido a um fracionamento em coluna de sílica gel (650 g), utilizando como eluente as misturas de Hex:AcOEt:MeOH com gradiente em ordem crescente de polaridade. Deste processo foram obtidas 217 frações (60 mL cada), as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reagrupadas por similaridade em 15 grupos. As frações foram evaporadas sob pressão reduzida e analisadas por ¹H RMN. De acordo com os perfis cromatográficos obtidos foi possível observar que os grupos 5 e 6 (frações 43-58) continham o composto de interesse.

Os dois grupos (798,9 mg) foram então submetidos a um fracionamento por coluna de Sephadex LH-20 (90 x 2 cm), utilizando como eluente uma mistura de 1:4 Hex:DCM e em seguida 3:2 DCM:Acetona. O fracionamento foi realizado em duas etapas com a aplicação de aproximadamente 400 mg em cada. De cada processo foram obtidas 40 frações, as quais foram reagrupadas por similaridade utilizando

CCD. Após evaporação do solvente, os cinco grupos obtidos foram submetidos a análise de ^1H RMN, onde foi possível observar que 2 e 3 (frações 11-32) continham desidrodieugenol B puro (325 mg).

Posteriormente, dois compostos semissintéticos (**MA001** e **MA002**, **Tabela 2**) foram preparados no laboratório do Prof. Dr. João Paulo Fernandes (Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema - SP).

Tabela 2 - Estrutura e massa molecular (MM) dos dois compostos semissintéticos preparados.

Estrutura Molecular	MM	Estrutura Molecular	MM
 <p>MA001</p>	404,13	 <p>MA002</p>	398,17

O primeiro composto foi sintetizado a partir de uma solução de desidrodieugenol B (34,2 mg; 0,1 mmol) em DCM (10 mL) onde foram adicionados cloreto de metanossulfonila (22,91 mg; 0,2 mmol; 2 equivalentes), Et_3N (0,1 mL; 0,7 mmol; 7 equivalentes) e DMAP (1,22 mg; 0,01 mmol; 0,1 equivalentes). Após 48h de agitação a 60°C , foram realizadas duas extrações líquido-líquido com 5 mL NaHCO_3 em água e a fase orgânica foi então seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada. Ao final, o produto **MA001** (28 mg; 0,069 mmol; 69%) foi obtido.

Já para o preparo do segundo composto, em uma solução de desidrodieugenol B (21,8 mg; 0,067 mmol) em DCM (5mL) foram adicionados cloreto de metoxiacetila (24,7 mg; 0,23 mmol; 3,4 equivalentes), Et_3N (0,1 mL; 0,7 mmol; 10,4 equivalentes) e DMAP (1,22 mg; 0,01 mmol; 0,15 equivalentes). Após 24h de agitação a 60°C , foram realizadas duas extrações líquido-líquido com 5 mL NaHCO_3 em água e a fase orgânica foi então seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada. O extrato obtido foi purificado por cromatografia em sílica gel, utilizando como eluente

Hex:AcOEt 9:1 (50 mL) e 2:1 (50 mL), para obtenção do produto **MA002** (7,2 mg; 0,018 mmol; 27%).

Os dois derivados semissintéticos foram submetidos a uma análise por HPLC para avaliação do grau de pureza. O perfil cromatográfico foi obtido a 254 nm em condição analítica, através de uma coluna C4 (ACE, 250 x 4,6mm, 5 µm partícula) com eluição em modo isocrático (fluxo de 1 mL/min), utilizando 95% de MeOH e 5% de H₂O como fase móvel. As amostras foram preparadas em MeOH a 1,5 mg/mL e o volume de injeção foi de 20 µL.

A caracterização dos compostos foi realizada por HRMS. **MA001** (100 pg/µL) e **MA002** (400 pg/µL) foram preparados em fase aquosa com água ultrapura Milli-Q sob duas condições diferentes: I) 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico e II) 0,1% de ácido fórmico. Em sequência, as amostras foram analisadas em espectrômetro de massas, utilizando como fase móvel MeOH e fase aquosa (1:1 v/v).

3.6 Determinação *in vitro* da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀)

Macrófagos peritoneais (1x10⁵ células/poço) foram inseridos em placas NUNC de 16 poços e incubados a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24h. Posteriormente, uma infecção com amastigotas de *L. (L.) infantum* (10:1 amastigotas/macrófago) foi realizada sob as mesmas condições descritas anteriormente. Os compostos foram então adicionados, serialmente diluídos em base 2 (3 a 60 µM) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. O fármaco miltefosina foi utilizado como padrão e células não tratadas como controle negativo (100% viabilidade). Após 96h, as células foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico (Tempone *et al.*, 2007). A concentração efetiva 50% foi determinada por contagem diferencial de 200 macrófagos/poço, através do cálculo do índice de infecção (IF) (Chang *et al.*, 1986):

$$\text{IF} = \frac{\text{Macrófagos Infectados} \times \text{Amastigotas Intracelulares}}{\text{Macrófagos Totais}}$$

3.7 Determinação *in vitro* da Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀)

Células NCTC (6x10⁴ células/poço) foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 48h com os compostos serialmente diluídos em base 2 (1,6 a 200µM) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. Posteriormente, a viabilidade celular foi determinada através de uma incubação de 4h com MTT (0,5 mg/mL/poço). Para interromper a reação, foi acrescentado SDS (10% m/v) e após 24h a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm (Tada *et al.*, 1986).

O fármaco miltefosina foi utilizado como padrão e células não tratadas como controle negativo (100% viabilidade). Também foram adicionados controles contendo apenas os compostos e MTT, para verificar possíveis interferências na leitura.

Seguindo a mesma metodologia, foi realizado também um ensaio de concentração citotóxica 50% com o composto **PP480** utilizando macrófagos peritoneais (5x10⁵ células/poço).

3.8 Determinação do Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade dos compostos foi determinado por meio da razão:

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ em células de mamífero}}{CE_{50} \text{ em amastigotas intracelulares}}$$

3.9 Análise *in silico* de Parâmetros Físico-químicos e ADMET

As predições *in silico* foram realizadas utilizando o servidor SwissADME (Daina *et al.*, 2017). Essa análise inclui vários modelos para avaliação de: i) propriedades físico-químicas como área de superfície polar topológica (TPSA) e número de ligações rotativas; ii) lipofilicidade (log P); iii) solubilidade aquosa (log S); iv) parâmetros farmacocinéticos como absorção gastrointestinal e inibição do CYP450; v) perfil *drug-likeness* incluindo filtros de Lipinski (Pfizer), Veber (GlaxoSmithKline) e Muegge (Bayer); vi) alertas estruturais para compostos de

interferência (*PAINS*). Além desses parâmetros, o servidor também disponibiliza um radar de biodisponibilidade, com intervalos ideais de seis propriedades: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação.

3.10 Análise *in vitro* da Atividade Hemolítica

Eritrócitos coletados de camundongos BALB/c foram adicionados em placas de 96 poços com fundo em “U” a uma concentração de 3% e tratados com diluições seriadas em base 2 (6,5 a 200 μM) do composto **PP480** em PBS 1x a 24°C por 2h. Após este período, o sobrenadante celular foi coletado e analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda à 570 nm para determinação da atividade hemolítica (Rea *et al.*, 2013). Água ultrapura Milli-Q foi empregada como controle positivo e eritrócitos não tratados como controle negativo (100% viabilidade).

3.11 Avaliação do Mecanismo de Ação em Promastigotas

Os estudos de mecanismo de ação foram realizados com o composto mais potente e seletivo, **PP480**. Todos os experimentos utilizaram promastigotas de *L. (L.) infantum* em fase exponencial tardia e meio HBSS suplementando com NaHCO_3 (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), exceções foram descritas.

Com intuito de definir as condições experimentais ideais de tempo e concentração foi realizado um ensaio de CE_{50} com promastigotas. Parasitas (2×10^6 parasitas/poço) foram adicionados em placas de 96 poços e tratados com o composto **PP480** serialmente diluído em base 2 (1,6 a 200 μM) a 24°C por 1, 2, 3 e 4h. Após o período de incubação, a viabilidade celular determinada utilizando o método do MTT descrito na Seção 3.7 (Tada *et al.*, 1986). A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda à 570 nm. Parasitas não tratados foram empregados como controle negativo (100% viabilidade).

3.11.1 Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas/poço) foram inseridos em placas pretas de 96 poços e incubados com Sytox® Green ($1 \mu\text{M}$) a 24°C por 15 min. Em sequência, uma leitura basal foi realizada e o composto **PP480** ($169,2 \mu\text{M}$) foi adicionado. A fluorescência foi monitorada a cada 20 min por 4h em espectrofluorímetro com filtros de excitação e emissão de 485 e 535 nm, respectivamente (Chicharro *et al.*, 2001).

Triton X-100 0,5% (v/v) foi empregado como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, membrana íntegra) (Kulkarni *et al.*, 2009). Também foram adicionados controles contendo apenas o composto e fluoróforo, para verificar possíveis interferências na fluorescência.

3.11.2 Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ($\Delta\psi_p$)

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas/poço) foram tratados com o composto **PP480** ($169,2 \mu\text{M}$) por 2 e 4h a 24°C . Posteriormente, uma lavagem foi realizada e bisoxonol ($0,2 \mu\text{M}$) foi acrescentado. Após 5 min de incubação a temperatura ambiente, a fluorescência foi observada em citômetro de fluxo com filtro de excitação 488 nm e emissão 574 nm (BL-2) (Luque-Ortega e Rivas, 2010).

Sertralina ($70 \mu\text{M}$) foi empregada como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, potencial basal) (Lima *et al.*, 2018).

3.11.3 Alterações no Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas/poço) foram tratados com o composto **PP480** ($169,2 \mu\text{M}$) por 2 e 4h a 24°C . Em seguida, uma lavagem foi realizada e JC-1 ($10 \mu\text{M}$) foi acrescentado. Após 20 min de incubação a 24°C , a fluorescência foi observada em citômetro de fluxo com filtro de excitação 488 nm e

emissão 530 (BL-1) e 574 nm (BL-2). O potencial de membrana mitocondrial foi estabelecido por meio da razão entre os canais BL-2/BL-1 (Mukherjee *et al.*, 2002).

CCCP (100 μ M) foi empregado como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, potencial basal).

3.11.4 Alterações nos Níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas/poço) foram tratados com o composto **PP480** (169,2 μ M) por 2 e 4h a 24°C. Posteriormente, uma lavagem foi realizada e os parasitas foram lisados com Triton X-100 (0,5% v/v). Os níveis de ATP foram dosados utilizando um tampão de reação padrão (DTT 1 mM, luciferina 0,5 mM e luciferase 1,25 μ g/ml) contido no ATP Determination Kit, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram adicionadas em placas de 96 poços e observadas em luminômetro. Uma curva de ATP (1 a 6000 nM) foi utilizada como padrão para a quantificação (Dolai *et al.*, 2009).

CCCP (25 μ M) foi empregado como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, nível basal). Também foram adicionados controles contendo apenas o composto e o tampão de reação, para verificar possíveis interferências na luminescência.

3.11.5 Alterações nos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas/poço) foram inseridos em placas pretas de 96 poços e tratados com o composto **PP480** (169,2 μ M) por 2 e 4h a 24°C. Em sequência, H₂DCFDA (5 μ M) foi acrescentado e após 15 min de incubação a fluorescência foi monitorada em espectrofluorímetro com filtros de excitação e emissão de 485 e 535 nm, respectivamente (Mukherjee *et al.*, 2002).

Azida sódica (10mM) foi empregada como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, nível basal). Também foram adicionados controles contendo apenas o composto e fluoróforo, para verificar possíveis interferências na fluorescência.

3.11.6 Alterações nos Níveis de Cálcio Intracelular (Ca²⁺)

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas/poço) foram pré-tratados com Fluo-4 AM (5 μ M) em PBS 1x, por 1h a 24°C. Posteriormente, os parasitas foram lavados e adicionados em placas pretas de 96 poços. Em seguida, uma leitura basal foi realizada e o composto **PP480** (169,2 μ M) foi adicionado. A fluorescência foi monitorada a cada 20 min por 4h em espectrofluorímetro com filtros de excitação e emissão de 485 e 535 nm, respectivamente (Corral *et al.*, 2016).

Triton X-100 0,5% (v/v) foi empregado como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, nível basal). Também foram adicionados controles contendo apenas o composto e fluoróforo, para verificar possíveis interferências na fluorescência.

3.11.7 Alterações nos Acidocalcissomos

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas/poço) foram pré-tratados com laranja de acridina (4 μ M) em PBS 1x, por 5 min a 24°C. Os parasitas foram então lavados e adicionados em placas pretas de 96 poços. Em sequência, uma leitura basal foi realizada e o composto **PP480** (169,2 μ M) foi adicionado. A fluorescência foi monitorada a cada 20 min por 4h em espectrofluorímetro com filtros de excitação e emissão de 485 e 535 nm, respectivamente (Serrano-Martín *et al.*, 2009).

Nigericina (4 μ M) foi empregada como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, nível basal) (Docampo *et al.*, 1995). Também foram adicionados controles contendo apenas o composto e fluoróforo, para verificar possíveis interferências na fluorescência.

3.11.8 Alterações nos Níveis de Proteínas Totais

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas/poço) foram tratados com o composto **PP480** (169,2 μ M) por 2 e 4h a 24°C. Posteriormente, uma lavagem foi realizada e os parasitas foram incubados em placas de 96 poços com um tampão de

reação padrão contido no BCA Protein Assay Kit, de acordo com as instruções do fabricante (Pinho *et al.*, 2020). Após 30 min a 37°C, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e observadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550 nm. Uma curva de albumina (25 a 750 µg/mL) foi utilizada como padrão para a quantificação.

Miltefosina (40 µM) foi empregada como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, nível basal). Também foram adicionados controles contendo apenas o composto e o tampão de reação, para verificar possíveis interferências na leitura.

3.11.9 Alterações no Perfil Proteico por MALDI-TOF/MS

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas/poço) foram tratados com o composto **PP480** (169,2 µM) por 2 e 4h a 24°C. Em seguida, duas lavagens foram realizadas com água ultrapura Milli-Q e o precipitado foi ressuspensionado em 300 µL de água e 900 µL de etanol 70% (v/v). As amostras foram agitadas em vórtex por 30 segundos e centrifugadas (10000 g por 2 min). Posteriormente, o precipitado foi ressuspensionado em 20 µL de ácido fórmico 70% (v/v) e 20 µL de acetonitrila. As amostras foram novamente agitadas e centrifugadas sob as mesmas condições descritas anteriormente (Mouri *et al.*, 2014). Por fim, 1 µL de sobrenadante foi adicionado em uma placa de aço polido MSP 96 poços (Bruker-Daltonics), sobreposto por 1 µL de matriz HCCA (50 mg/mL). A análise foi realizada em espectrômetro de massas MALDI-TOF/MS, com laser de nitrogênio a 337 nm.

Miltefosina (40 µM) foi empregada como padrão e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, perfil basal). Também foi adicionado o controle BTS, para calibração do equipamento.

3.11.10 Alterações no Ciclo Celular

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas/poço) em fase exponencial foram tratados com o composto **PP480** (169,2 µM) em meio 199 suplementado com

10% de SFB, por 24h a 24°C. Os parasitas foram então lavados com PBS 1x e permeabilizados com etanol 70% (v/v) *overnight*, à -20°C. Após outra lavagem com PBS 1x, uma incubação com iodeto de propídio (10 µg/mL) e RNase A (20 µg/mL) foi realizada por 30 min à temperatura ambiente. Em sequência, a fluorescência foi monitorada em citômetro de fluxo com filtro de excitação 488 nm e emissão 574 nm (Luque-Ortega e Rivas, 2010).

Miltefosina (25 µM) foi empregada como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, ciclo celular padrão) (Paris *et al.*, 2004).

3.11.11 Alterações na Integridade do DNA

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (1×10^7 parasitas/poço) foram tratados com o composto **PP480** (169,2 µM) em meio 199 suplementado com 10% de SFB, por 24h a 24°C. Os parasitas foram então lavados com PBS 1x e submetidos a extração do material genético utilizando o QIAamp DNA Mini Kit, de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA total foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 em comprimento de onda à 260/280 nm. Em sequência, o material genético purificado (300 ng) foi analisado por eletroforese durante 1h a 60 mV em gel de agarose 2% com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A visualização foi realizada sob luz UV em transluminador MiniBIS Pro (DNR Bio Imaging System) (Corral *et al.*, 2016).

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - 10 mM) foi empregado como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, DNA integro) (Néris *et al.*, 2013).

3.11.12 Alterações Ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Promastigotas de *L. (L.) infantum* (3×10^7 parasitas/poço) foram tratados com o composto **PP480** (169,2 µM) por 2, 4 e 6h a 24°C. Em sequência, os parasitas foram lavados, fixados em solução de glutaraldeído (2,5% m/v) e pós-fixados em tetróxido

de ósmio 1% (m/v). As amostras foram então desidratadas gradualmente em acetona e incluídas em resina Epon 812. Cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Duarte *et al.*, 1992). O material foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1011). Parasitas não tratados foram empregados como controle negativo (100% viabilidade). Este procedimento foi realizado em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Noemi N. Taniwaki (Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo - SP).

3.12 Avaliação da Resposta Imunomodulatória

3.12.1 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Macrófagos peritoneais (5×10^5 células/poço) foram inseridos em placas de 24 poços e incubados a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24h. Posteriormente, uma infecção com amastigotas de *L. (L.) infantum* (10:1 amastigotas/macrófago) foi realizada sob as mesmas condições descritas anteriormente. O composto **PP480** foi então adicionado, serialmente diluído (7,5 a 60 µM) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. Após 48h, os sobrenadantes celulares foram coletados e incubados em placas de 96 poços com reagente de Griess [1% (m/v) sulfanilamida, 0,1% (m/v) dicloridrato de naftil etilenodiamina e 2,5% (v/v) H₃PO₄]. A dosagem de óxido nítrico foi realizada pela leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda à 570 nm (Green *et al.*, 1990). Uma curva de NaNO₂ (0 a 400 µM) foi utilizada como padrão para quantificação de NO.

LPS (25 µg/mL) foi empregado como controle positivo e células não tratadas como controle negativo (100% viabilidade, produção basal) (Choi *et al.*, 2013).

3.12.2 Dosagem de Citocinas

A quantificação de citocinas foi realizada com o auxílio do Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho (Setor de Patologia Clínica COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG).

Macrófagos peritoneais (1×10^6 células/poço), obtidos de camundongos BALB/c, foram inseridos em placas de 24 poços e incubados a 37°C em estufa com 5% de CO_2 por 2h. Posteriormente, uma infecção com promastigotas de *L. (L.) infantum* (10:1 amastigotas/macrófago) foi realizada por 24h sob as mesmas condições descritas anteriormente. O composto **PP480** foi então adicionado nas concentrações de 60 e 10 μM em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. Os sobrenadantes celulares foram coletados após 48 e 72h e as citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e INF- γ foram dosadas por reações imunoenzimáticas de ELISA sanduiche, utilizando os kits de BD OptEIA Mouse ELISA set, de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda à 450 nm.

Concanavalina A (ConA - 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi empregada como controle positivo e células não tratadas como controle negativo (100% viabilidade, produção basal).

3.13 Determinação do Perfil Farmacocinético *in vivo*

Os experimentos de avaliação de parâmetros farmacocinéticos *in vivo* foram realizados pela candidata por meio de um estágio na Universidade de Coimbra (Coimbra-PT), sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Bairrada Fortuna.

O composto **PP480** (5 mg/kg) foi administrado (10 mL/kg em soro fisiológico) por via intraperitoneal em seis ratos Wistar (3 fêmeas e 3 machos) com peso entre 217 e 376 g. A partir de um cateter introduzido na veia caudal, amostras de sangue (300 μL) foram coletadas em tubos de heparina nos tempos de 30 min, 1, 2, 3, 5, 6, 8, 12 e 24h. Para obtenção do plasma, as amostras foram centrifugadas a 2900 rpm por 10 min a 4°C . As análises foram realizadas por HPLC seguindo um método analítico previamente validado e o perfil farmacocinético foi obtido utilizando o software WinNonlin 6.4, determinando a área sob a curva (AUC), concentração plasmática máxima (C_{max}), tempo máximo (T_{max}), tempo de meia vida ($T_{1/2}$) e tempo médio de residência (MRT).

A validação completa do método analítico para detecção e quantificação do composto **PP480** em amostra biológica está descrita com detalhes no APÊNDICE .

3.14 Análises Estatísticas

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram processados através do software MNova da Mestrelab Research.

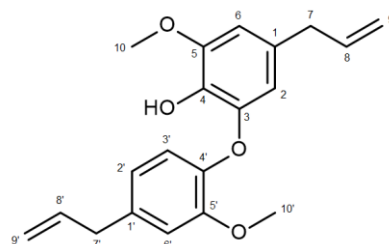
Os valores de CC_{50} e CE_{50} foram determinados através de curvas sigmóides dose-resposta, enquanto a significância estatística entre amostras foi analisada a partir de valores de P, pelo método One-way ANOVA, teste Tukey's Multiple Comparison. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 5.

As amostras foram estudadas em duplicata e os ensaios foram reproduzidos no mínimo duas vezes, com um experimento representativo apresentado.

4 RESULTADOS

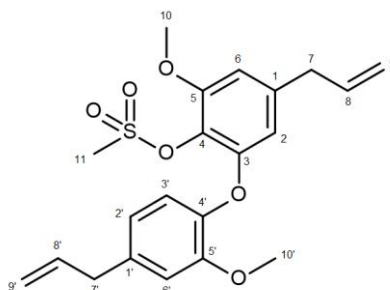
4.1 Preparo dos Derivados Semissintéticos

Desidrodieugenol B puro (325 mg), caracterizado por RMN e HRMS, foi obtido a partir do extrato metanólico de galhos de *Nectandra leucanta* por fracionamento em coluna de sílica e Sephadex LH-20, sucessivamente.

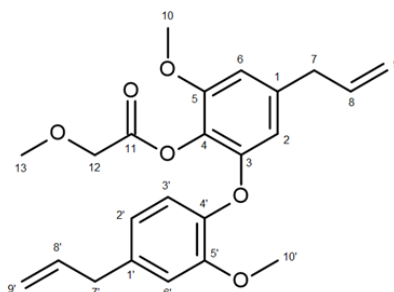


Desidrodieugenol B: ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz, δ = ppm) 6,89 (1H, d, J = 8,1 Hz, $\text{H}_{3'}$), 6,80 (1H, d, J = 2,0 Hz, $\text{H}_{6'}$), 6,72 (1H, dd, J = 8,1 e 2,0 Hz, $\text{H}_{2'}$), 6,50 (1H, d, J = 1,8 Hz, H_2), 6,40 (1H, d, J = 1,8 Hz, H_6), 6,00 - 5,87 (2H, m, H_8 e $\text{H}_{8'}$), 5,12 - 5,01 (4H, m, H_9 e $\text{H}_{9'}$), 3,89 (3H, s, H_{10}), 3,87 (3H, s, $\text{H}_{10'}$), 3,36 (2H, d, J = 6,6 Hz, $\text{H}_{7'}$), 3,24 (2H, d, J = 6,6 Hz, H_7). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz, δ = ppm) 150.4 (C_5), 147.8 (C_5), 144.4 (C_3), 144.2 ($\text{C}_{4'}$), 137.4 ($\text{C}_{8'}$), 137.2 (C_8), 136.4 ($\text{C}_{1'}$), 135.2 (C_4), 131.0 (C_1), 120.8 ($\text{C}_{2'}$), 119.5 ($\text{C}_{3'}$), 116.0 (C_9), 115.7 (C_9), 112.9 ($\text{C}_{6'}$), 111.8 (C_6), 107.3 (C_2), 75.6.2 (C_{10}), 55.9 ($\text{C}_{10'}$), 40.0 (C_7), 39.9 ($\text{C}_{7'}$). HRMS m/z 327.1595 [$\text{M} + \text{H}^+$] (calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_4$, 327.1596).

Utilizando essa neolignana como protótipo, os compostos **MA001** (28 mg; 0,069 mmol; 69%) e **MA002** (7,2 mg; 0,018 mmol; 27%) foram preparados por metodologias clássicas de semi-síntese e caracterizados por RMN (^{13}C e ^1H) e HRMS, com grau de pureza no mínimo de 94%, analisado por HPLC.



MA001: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) 6,94 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 6,82 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, $\text{H}_{6'}$), 6,76 (1H, dd, $J = 8,1$ e $2,0$ Hz, H_2), 6,50 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H_2), 6,16 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H_6), 6,08 - 5,74 (2H, m, H_8 e $\text{H}_{8'}$), 5,18 - 4,96 (4H, m, H_9 e $\text{H}_{9'}$), 3,89 (3H, s, H_{10}), 3,78 (3H, s, $\text{H}_{10'}$), 3,39 (2H, d, $J = 6,8$ Hz, H_7), 3,32 (3H, s, H_{11}), 3,23 (2H, d, $J = 6,7$ Hz, H_7). ^{13}C RMN (75MHz, CDCl_3 , δ ppm) 153,39 (C_5), 150,79 (C_5), 150,71 ($\text{C}_{4'}$), 141,08 (C_3), 139,45 ($\text{C}_{1'}$), 137,41 (C_1), 136,80 (C_8), 136,12 (C_8), 127,19 (C_4), 120,85 (C_2), 120,76 ($\text{C}_{9'}$), 116,15 (C_9), 115,85 (C_6), 113,00 ($\text{C}_{3'}$), 108,83 (C_6), 106,45 (C_2), 56,12 (C_{10}), 55,60 ($\text{C}_{10'}$), 39,95 ($\text{C}_{7'}$), 39,69 (C_7), 39,40 (C_{11}). HRMS m/z 405.1364 [$\text{M} + \text{H}^+$] (calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{S}$ 405.1373).



MA002: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) 6,87 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 6,78 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, $\text{H}_{6'}$), 6,70 (1H, dd, $J = 8,1$ e $2,0$ Hz, H_2), 6,50 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H_2), 6,27 (1H, d, $J = 1,8$ Hz H_6), 6,06 - 5,77 (2H, m, H_8 e $\text{H}_{8'}$), 5,16 - 4,98 (4H, m, H_9 e $\text{H}_{9'}$), 4,25 (2H, s, H_{12}), 3,82 (3H, s, H_{10}), 3,80 (3H, s, $\text{H}_{10'}$), 3,45 (3H, s, H_{13}), 3,36 (2H, d, $J = 6,7$ Hz, $\text{H}_{7'}$), 3,26 (2H, d, $J = 6,7$ Hz, H_7). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) 167,76 (C_{11}), 151,97 (C_5), 150,59 (C_5), 149,80 ($\text{C}_{4'}$), 143,11 (C_3), 138,40 ($\text{C}_{1'}$), 136,98 (C_1), 136,57 (C_8), 136,45 (C_8), 129,50 (C_4), 120,72 (C_2), 120,28 ($\text{C}_{9'}$), 115,97 (C_9), 115,71 (C_6), 112,89 ($\text{C}_{3'}$), 110,26 (C_6), 106,50 (C_2), 68,62 (C_{12}), 59,69 (C_{13}), 55,86 (C_{10}), 55,77 ($\text{C}_{10'}$), 39,96 ($\text{C}_{7'}$), 39,69 (C_7). HRMS m/z 399.1800 [$\text{M} + \text{H}^+$] (calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{O}_6$ 399.1809).

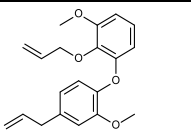
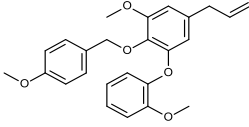
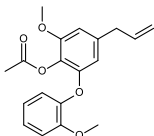
4.2 Determinação *in vitro* da Concentração Citotóxica (CC₅₀) e Efetiva (CE₅₀) 50%

A atividade anti-*L. (L.) infantum* foi determinada em macrófagos peritoneais previamente infectados com amastigotas. Dentre os 57 derivados avaliados, 19 apresentaram atividade com valores de CE₅₀ entre 3,0 e 36,6 µM, incluindo os dois semissintéticos (**Tabela 3**).

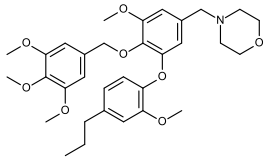
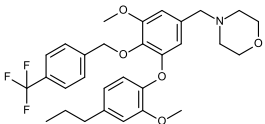
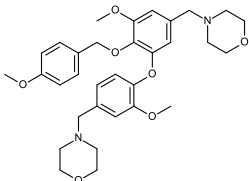
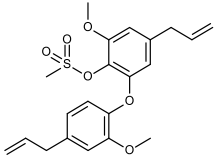
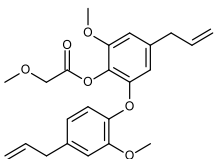
A citotoxicidade destes compostos foi avaliada em células NCTC clone 929 utilizando o método do MTT, no qual somente células viáveis reduzem o sal de tetrazólio (amarelo) em formazana (azul). Através dos resultados obtidos foi possível verificar que, apenas 7 compostos (**CES476, CES509, CES512, SN27, SN28, SN52 e HA171**) apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas, com valores de CC₅₀ entre 14,5 e 74,4 µM.

Com o intuito de avaliar a relação entre atividade em amastigotas intracelulares e citotoxicidade, o índice de seletividade (IS) dos compostos foi determinado e os valores obtidos variaram entre 2,6 a maior que 20,6. O fármaco padrão miltefosina apresentou CE₅₀ e CC₅₀ de 6,5 e 119,7 µM, respectivamente, resultando em um IS de 18,4.

Tabela 3 - Avaliação da atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* e citotoxicidade dos compostos e do fármaco padrão miltefosina.

Composto	Estrutura	CE ₅₀ (µM) ± DP	CC ₅₀ (µM) ± DP	IS
CES435		17,8 ± 8,4	>200	>11,2
CES436		24,2 ± 18,2	>200	>8,3
CES448		32,7 ± 5,0	>200	>6,1

CES476		$20,3 \pm 5,9$	$52,9 \pm 15,2$	2,6
CES509		$4,1 \pm 1,1$	$24,9 \pm 2,6$	6,0
CES512		$9,6 \pm 3,6$	$63,7 \pm 0,2$	6,6
PP480		$9,7 \pm 2,0$	>200	>20,6
SN27		$3,7 \pm 0,5$	$14,5 \pm 0,2$	3,9
SN28		$7,7 \pm 0,8$	$74,4 \pm 4,4$	9,7
SN39		$15,3 \pm 1,9$	>200	>13,1
SN52		$3,0 \pm 1,1$	$22,7 \pm 0,9$	7,6
SN63		$27,6 \pm 2,1$	>200	>7,2
HA043		$21,9 \pm 5,8$	>200	>9,1
HA075		$16,4 \pm 4,3$	>200	>12,2

HA077		26,3 ± 3,2	>200	>7,6
HA078		13,2 ± 2,1	>200	15,1
HA171		27,8 ± 7,4	74,4 ± 5,8	2,7
MA001		36,6 ± 5,9	>200	>5,5
MA002		14,9 ± 6,9	>200	>13,4
Miltefosina	-	6,5 ± 3,0	119,7 ± 4,2	18,4

CC₅₀: Concentração Citotóxica 50% em células NCTC; CE₅₀: Concentração Efetiva 50% em amastigotas intracelulares; IS: Índice de Seletividade, dado pela razão entre CC₅₀ e CE₅₀; DP: Desvio Padrão.

De acordo com os resultados apresentados, o derivado **PP480** foi o mais potente, seletivo e promissor da série sintética e semissintética. Além de eliminar 100% as formas amastigotas na maior concentração testada (60 µM), sem induzir alterações na viabilidade dos macrófagos (**Figura 16**). Este fato foi confirmado através da citotoxicidade avaliada em macrófagos peritoneais que apresentou valor de CE₅₀ de 130,3 µM. Portanto, este composto foi selecionado para os estudos apresentados adiante.

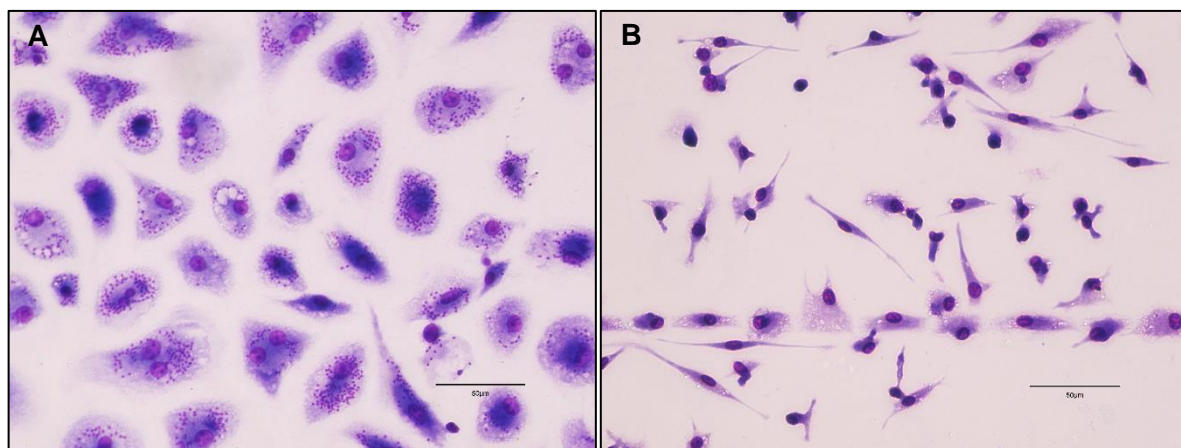


Figura 16 - Avaliação da atividade anti-*L. (L.) infantum* em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas, após 96h. **(A)** Controle **(B)** Tratamento com **PP480** (60 µM). Imagens obtidas em microscópio digital com ampliação de 40X.

4.3 Análise *in silico* de Parâmetros Físico-químicos e ADMET

A análise de propriedades farmacocinéticas e alertas toxicológicos do composto **PP480** foi obtida *in silico*, de acordo com sua estrutura química, utilizando o servidor SwissADME (**Tabela 4**). As predições foram realizadas com o intuito de verificar a segurança e perfil *drug-likeness* do derivado selecionado, além de auxiliar e direcionar os estudos farmacocinéticos.

A partir da análise das propriedades físico-químicas foi possível constatar um valor log P de 4,92. Além disso, na avaliação da solubilidade em água o composto apresentou um log S de -5,92, enquadrando-se na classe de solubilidade moderada.

Os resultados relacionados a parâmetros farmacocinéticas apontam alta absorção gastrointestinal e permeabilidade a barreira hematoencefálica. A avaliação também apresentou o composto **PP480** como substrato da glicoproteína P (P-gp). Adicionalmente, os resultados de inibição do citocromo P450 indicaram que este derivado tem ação em apenas uma (CYP2D6) das cinco isoformas analisadas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4).

No que se refere ao perfil *drug-likeness*, o derivado apresentou parâmetros aceitáveis pela avaliação de Lipinski e Egan. Por fim, nenhum alerta estrutural de semelhança a *PAINS* foi detectado.

Tabela 4 - Predições *in silico* de parâmetros físico-químicos, estruturais e de ADMET.

Propriedades	PP480
Fração de carbonos sp ³	0,33
Nº de ligações rotativas	12
Nº aceptores de ligação H	7
Nº doadores de ligação H	0
TPSA (Å ²)	58,62
Log P	4,92
Log S	-5,92
Classe de solubilidade	Moderada
Absorção gastrointestinal	Alta
Permeabilidade na barreira hematoencefálica	✓
Substrato P-gp	✓
Inibidor CYP1A2	✗
Inibidor CYP2C19	✗
Inibidor CYP2C9	✗
Inibidor CYP2D6	✓
Inibidor CYP3A4	✗
Lipinski	✓
Ghose	✗
Veber	✗
Egan	✓
Muegge	✗
PAINS	0

PAINS: *pan-assay interference compounds*; CYP: citocromo P450; P-gp: glicoproteína P; TPSA: área de superfície polar topológica. ✓ Sim, ✗ Não.

Outra análise disponibilizada pelo servidor SwissADME é o radar de biodisponibilidade, que se baseia em intervalos ideais de seis propriedades: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação. De acordo com os resultados apresentados na **Figura 17**, o composto **PP480** excedeu os critérios determinados para flexibilidade (número de ligações rotativas < 9) e tamanho (MM entre 150 e 500 g/mol). Além disso, o derivado exibiu um perfil de lipofilicidade no extremo do limite desejado (log P entre 0,7 e 5,0). Já nos parâmetros de saturação (0,25 < sp³ < 1), solubilidade (log S < -6) e polaridade (TPSA entre 20 e 130 Å²), o composto **PP480** se enquadrou nos padrões preestabelecidos.

No geral, o composto demonstrou predições de biodisponibilidade favoráveis e promissoras, sem alertas estruturais e exibindo como problemas majoritários apenas propriedades relacionadas a flexibilidade.

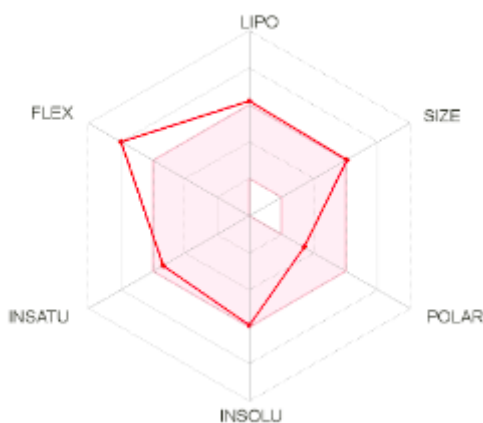


Figura 17 - Radar de biodisponibilidade do composto **PP480**, obtido utilizando o servidor SwissADME. A área rosa representa os valores *drug-likeness* ideais de cada propriedade: lipofilicidade (log P entre 0,7 e 5,0), tamanho (MM entre 150 e 500 g/mol), polaridade (TPSA entre 20 e 130 Å²), solubilidade (log S < -6), flexibilidade (número de ligações rotativas < 9) e saturação (fração de carbonos com hibridação sp3 entre 0,25 e 1).

4.4 Análise *in vitro* da Atividade Hemolítica

Visando complementar os estudos de citotoxicidade previamente realizados, a atividade hemolítica do composto **PP480** foi avaliada por meio de um ensaio colorimétrico com eritrócitos de camundongos BALB/c. A partir dos resultados obtidos (**Figura 18**) foi possível observar que após 2h de incubação com **PP480** não houve indução de hemólise em nenhuma das concentrações testadas (6,25 a 200 µM).

Água ultrapura Milli-Q foi utilizada como controle positivo, para obtenção da hemólise máxima, apresentando resultados estatisticamente significantes quando comparados ao controle não tratado ($p < 0,0001$). Sua atividade hemolítica se dá através do desequilíbrio osmótico, induzindo o rompimento dos eritrócitos e consequente liberação de hemoglobina no meio, tornando-o avermelhado.

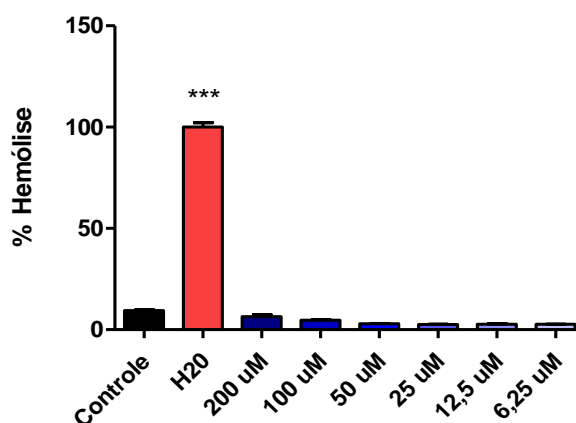


Figura 18 - Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos BALB/c, após 2h de tratamento com **PP480** (6,5 a 200 µM). Hemácias não tratadas e tratadas com H₂O Milli-Q foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A densidade óptica é relatada como porcentagem referente a H₂O (100%). ** p<0,0001 em relação ao controle.

4.5 Avaliação do Mecanismo de Ação em Promastigotas

Os parâmetros de tempo e concentração, utilizados nos estudos de mecanismo de ação, foram definidos a partir da concentração efetiva 50% em promastigotas tratados com o composto **PP480**. Utilizando o método do MTT descrito anteriormente, foi possível observar que apenas no tempo de 4h houve morte de 50% dos parasitas na maior concentração testada, resultando em um CE₅₀ de 169,2 µM. Deste modo, os ensaios apresentados adiante foram todos realizados nestas condições (exceções foram descritas).

4.5.1 Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática

Danos na integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum* foram avaliados utilizando o fluoróforo Sytox Green. Este marcador de ácidos nucleicos não ultrapassa células viáveis e, portanto, sua entrada ocorre apenas quando a membrana plasmática está comprometida. Desta forma, o aumento da fluorescência é diretamente relacionado ao aumento da permeabilidade celular.

De acordo com os resultados apresentados (**Figura 19**), o tratamento com o composto **PP480** (169,2 μM) não alterou a integridade da membrana plasmática, a fluorescência permaneceu similar ao controle (parasitas não tratados), mesmo após 4h de incubação. Já o surfactante não iônico Triton X-100 (0,5 % v/v), utilizado como controle positivo para máxima permeabilização dos parasitas, foi estatisticamente significativo ($p < 0,005$) desde o primeiro tempo, quando comparado aos parasitas não tratados.

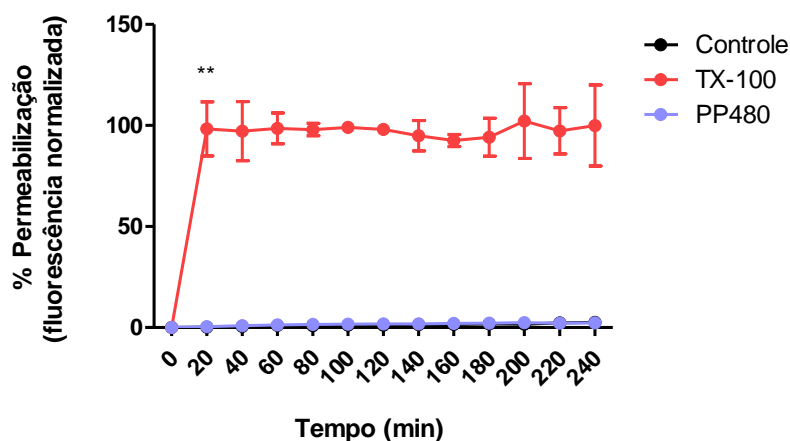


Figura 19 - Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 4h de tratamento com **PP480** (169,2 μM), utilizando o fluoróforo Sytox Green (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Parasitas não tratados e tratados com Triton X-100 a 0,5%, foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência é relatada como porcentagem referente ao Triton X-100 em 240 min (100%). ** $p < 0,0055$ em relação ao controle.

4.5.2 Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ($\Delta\psi_p$)

A avaliação do potencial de membrana plasmática foi realizada por citometria de fluxo em promastigotas de *L. (L.) infantum*, utilizando o fluoróforo bisoxonol. Por ser aniônico, este marcador tem sua entrada na célula impedida pelo potencial negativo da membrana plasmática e, conseqüentemente, consegue entrar apenas quando ocorre uma despolarização do potencial. Portanto, o aumento da fluorescência é diretamente ligado a despolarização. Fato este observado pelos histogramas de fluorescência da **Figura 20**, onde o controle (parasitas não tratados) está disposto à esquerda em um pico único. Com o aumento da despolarização, os picos são concentrados à direita, resultando na elevação dos níveis de fluorescência,

dados pelo controle positivo (sertralina 70 μM) e o composto em estudo, **PP480** (169,2 μM).

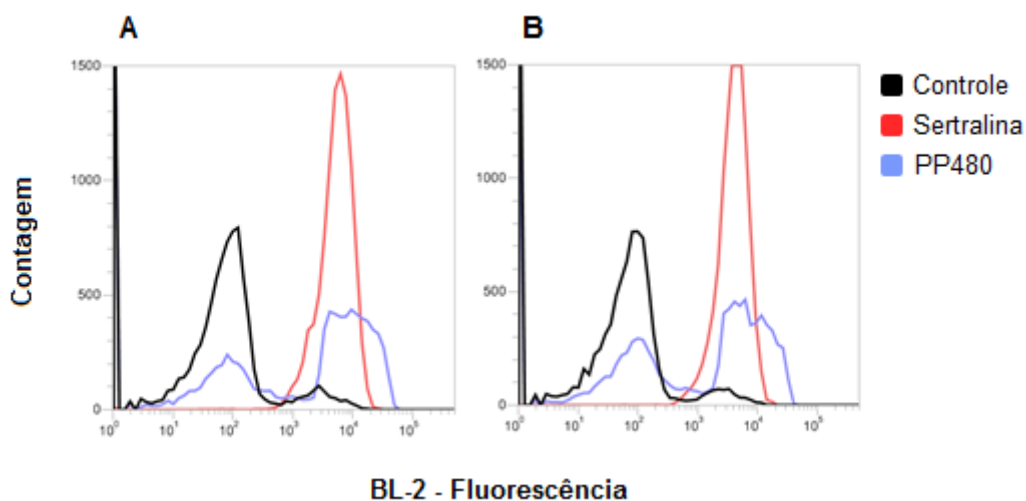


Figura 20 - Histogramas de fluorescência determinados por citometria de fluxo em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após tratamento com **PP480** (169,2 μM), utilizando o fluoróforo bisoxonol (excitação 488 nm e emissão 574 nm). **(A)** 2h e **(B)** 4h.

Os níveis de fluorescência observados no controle representam um potencial basal, compreendido por células em diversos estágios, incluindo aquelas em processo de morte (**Figura 21**). O fármaco sertralina, foi utilizado como controle positivo para máxima despolarização da membrana plasmática, e demonstrou significância estatística quando comparado aos parasitas não tratados em 2 e 4h com $p < 0,0002$ e $0,002$, respectivamente. Da mesma forma, o composto **PP480** apresentou um percentual de despolarização estatisticamente significativo ($p < 0,0002$) em ambos os tempos de tratamento, quando comparado ao controle não tratado.

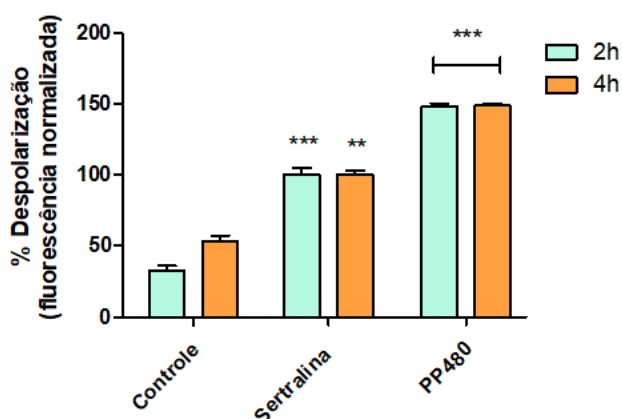


Figura 21 - Avaliação do potencial de membrana plasmática em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 2 e 4h de tratamento com **PP480** (169,2 μM), utilizando o fluoróforo bisoxonol (excitação 488 nm e emissão 574 nm). Parasitas não tratados e tratados com sertralina (70 μM) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência é relatada como porcentagem referente a sertralina (100%). *** $p < 0,0002$ e ** 0,002 em relação ao controle.

4.5.3 Alterações no Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Utilizando o fluoróforo JC-1, foi possível verificar por citometria de fluxo alterações no potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) infantum*. Em concentrações baixas, este marcador existe na forma de monômeros (fluorescência verde / BL-1) e em concentrações altas na forma de J-agregados (fluorescência vermelha / BL-2). Conforme a membrana mitocondrial é despolarizada, menos fluoróforo é internalizado nesta organela e, portanto, são observados menos J-agregados e mais monômeros. Deste modo, de acordo com o aumento ou diminuição da razão entre J-agregados e monômeros (BL-2/ BL-1), é possível estabelecer se a membrana está hiperpolarizada ou despolarizada, respectivamente.

Nos histogramas de fluorescência de BL-1 (emissão 530 nm) é possível uma melhor representação do funcionamento do fluoróforo JC-1 (**Figura 22**). Os parasitas não tratados (controle) são apresentados em um pico único a esquerda com menor fluorescência. Já o controle positivo (CCCP 100 μM) e a neolignana **PP480** (169,2 μM), têm seus picos deslocados à direita, com maior concentração de monômeros e, conseqüentemente, aumento dos níveis de fluorescência.

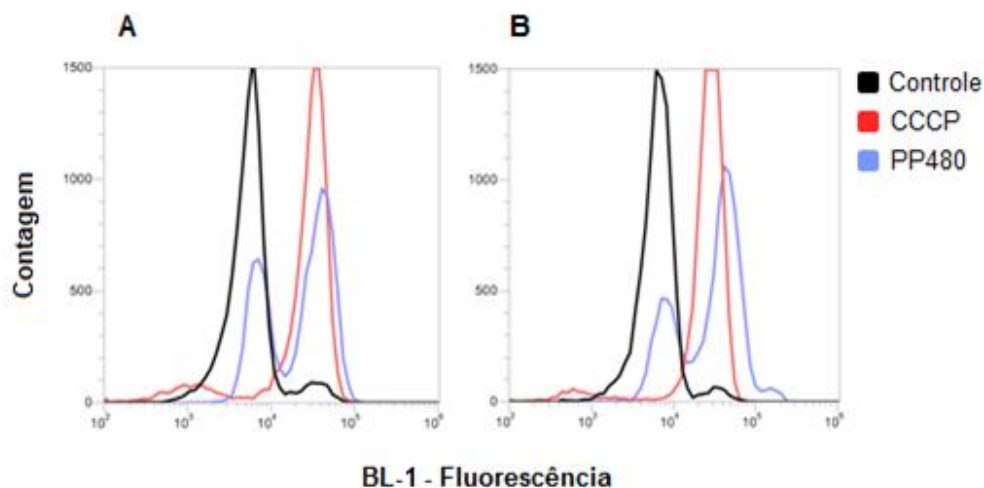


Figura 22 - Histogramas de fluorescência determinados por citometria de fluxo em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após tratamento com **PP480** (169,2 μM), utilizando o fluoróforo JC-1 (excitação 488 nm e emissão 530 nm). **(A)** 2h e **(B)** 4h.

Através dos níveis de fluorescência detectados, foi possível verificar que o controle apresenta um potencial de membrana mitocondrial basal (**Figura 23**). Já o desacoplador de fosforilação oxidativa, CCCP, foi utilizado como controle positivo para obtenção da despolarização máxima e apresentou significância estatística quando comparado aos parasitas não tratados com $p < 0,0001$ e $0,006$ em 2 e 4h, respectivamente. O composto **PP480** também induziu uma despolarização estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle, com efeito contínuo mesmo após 4h de tratamento.

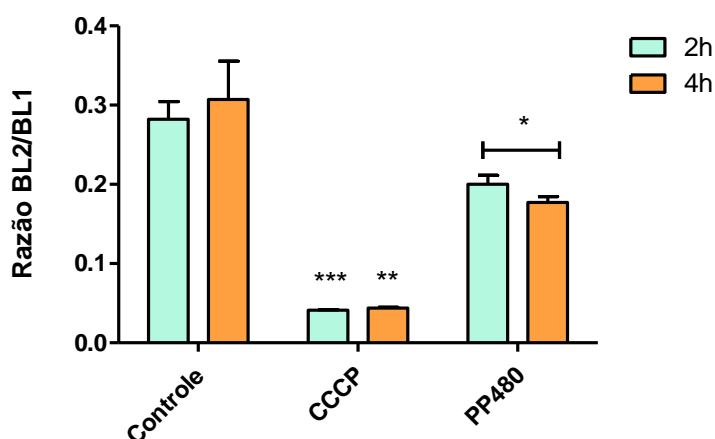


Figura 23 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 2 e 4h de tratamento com **PP480** (169,2 μ M), utilizando o fluoróforo JC-1 (excitação 488 nm e emissão 530/574 nm). Parasitas não tratados e tratados com CCCP (100 μ M) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência é relatada como razão entre BL-2 (574 nm) e BL-1 (530 nm) *** $p < 0,0001$, ** 0,006 e *0,05 em relação ao controle.

4.5.4 Alterações nos Níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)

Níveis de ATP em promastigotas de *L. (L.) infantum* foram quantificados através do *ATP Determination Kit*. Este ensaio de bioluminescência depende da catalização de ATP e luciferina pela enzima luciferase, para produção de luz. Sendo assim, o aumento da concentração de ATP na célula afeta diretamente ao aumento da emissão de luz.

Conforme representado na **Figura 24**, o tratamento com o composto **PP480** (169,2 μ M) provocou uma diminuição significativa na concentração de ATP ($p < 0,05$) em ambos os tempos, quando comparado a parasitas não tratados (controle). O controle positivo CCCP (25 μ M), foi utilizado para máxima redução dos níveis de ATP e quando comparado ao controle apresentou significância estatística em 2 e 4h, com $p < 0,0036$.

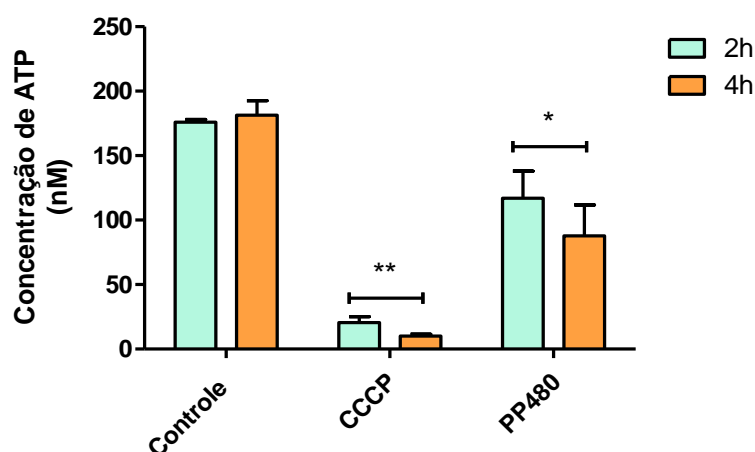


Figura 24 - Avaliação dos níveis de ATP em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 2 e 4h de tratamento com **PP480** (169,2 μ M), utilizando o ATP Determination Kit. Parasitas não tratados e tratados com CCCP (25 μ M) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. ** $p < 0,0036$ e * 0,05 em relação ao controle.

4.5.5 Alterações nos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio foi realizada em promastigotas de *L. (L.) infantum*, utilizando o marcador não fluorescente H₂DCFDA. Após entrada na célula, este composto tem seus grupos acetato clivados e ao ser oxidado é convertido para sua forma fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Sendo assim, é possível a investigação de alterações nos níveis de ROS pelo aumento ou diminuição da oxidação do marcador e, conseqüentemente, da fluorescência.

De acordo com os dados obtidos (**Figura 25**), quando comparado aos parasitas não tratados (controle) o composto **PP480** (169,2 μ M) reduziu significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio, com $p < 0,05$ em 2h e 0,0001 em 4h. Contrariamente, o controle positivo (azida sódica 10mM) elevou os níveis de ROS, sendo utilizado para produção máxima, demonstrando significância estatística em ambos os tempos, com valores de $p < 0,0011$ e 0,0001 em 2 e 4h, respectivamente.

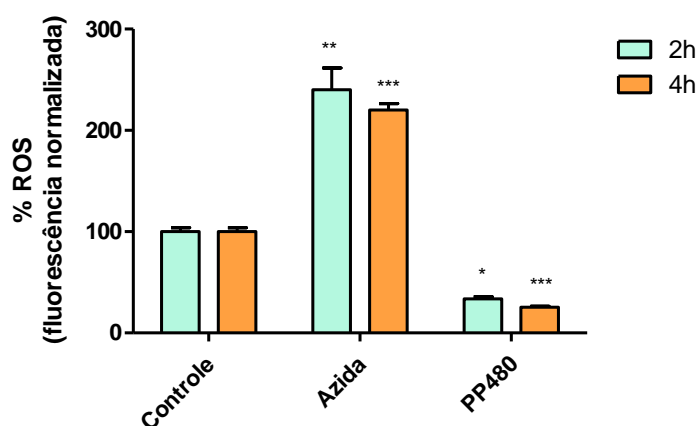


Figura 25 - Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 2 e 4h de tratamento com **PP480** (169,2 μ M), utilizando o fluoróforo H₂DCFDA (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Parasitas não tratados e tratados com azida sódica (10 mM) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência é relatada como porcentagem referente aos parasitas não tratados (100%). *** $p < 0,0001$, ** 0,0011 e * 0,05 em relação ao controle.

4.5.6 Alterações nos Níveis de Cálcio Intracelular (Ca²⁺)

Os níveis de cálcio intracelular foram avaliados em promastigotas de *L. (L.) infantum*, utilizando o fluoróforo Fluo-4 AM. Após entrada na célula, este marcador não fluorescente tem seus grupos acetato hidrolisados por esterases e, ao se ligar a íons de Ca²⁺, forma complexos fluorescentes. Dessa maneira, o aumento de cálcio se relaciona diretamente ao aumento da fluorescência.

Conforme os dados apresentados na **Figura 26**, o tratamento com o composto **PP480** (169,2 μ M) induziu um aumento rápido e exacerbado dos níveis de cálcio intracelular, com significância estatística ($p < 0,0001$) logo no primeiro tempo (20 min), com quando comparado ao controle (parasitas não tratados). Esta elevação foi também nitidamente superior ao controle positivo, o surfactante não iônico Triton X-100, que apresentou a mesma significância estatística.

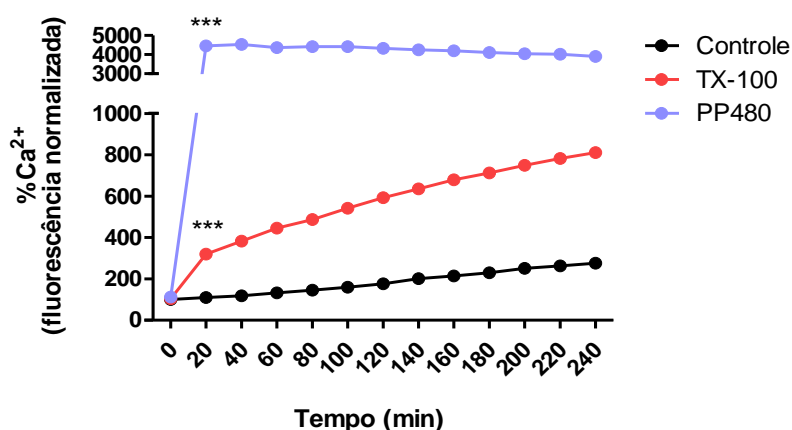


Figura 26 - Avaliação dos níveis de cálcio intracelular em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 4h de tratamento com **PP480** (169,2 μ M), utilizando o fluoróforo Fluo-4 AM (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Parasitas não tratados e tratados com Triton X-100 0,5% foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência é relatada como porcentagem referente aos parasitas não tratados em 0 min (100%). *** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

4.5.7 Alterações nos Acidocalcissomos

Utilizando o fluoróforo laranja de acridina, foi possível investigar modificações nos acidocalcissomos de promastigotas de *L. (L.) infantum*. A distribuição deste marcador na célula varia de acordo com o gradiente de pH, com maior acúmulo em ambientes ácidos, como os acidocalcissomos. Portanto, conforme estas organelas são alcalinizadas, este composto é liberado para o citoplasma resultando em um aumento da fluorescência.

Através da **Figura 27**, foi possível observar que em apenas 20 minutos de tratamento com o composto **PP480** (169,2 μ M) os níveis de alcalinização já estão significativamente maiores que nos parasitas não tratados (controle), com valor de $p < 0,0003$. Também foi notável que as alterações permaneceram constantes durante as 4h. Um efeito semelhante foi observado no controle positivo, o trocador de K^+/H^+ nigericina (4 μ M), utilizado para indução de alcalinização.

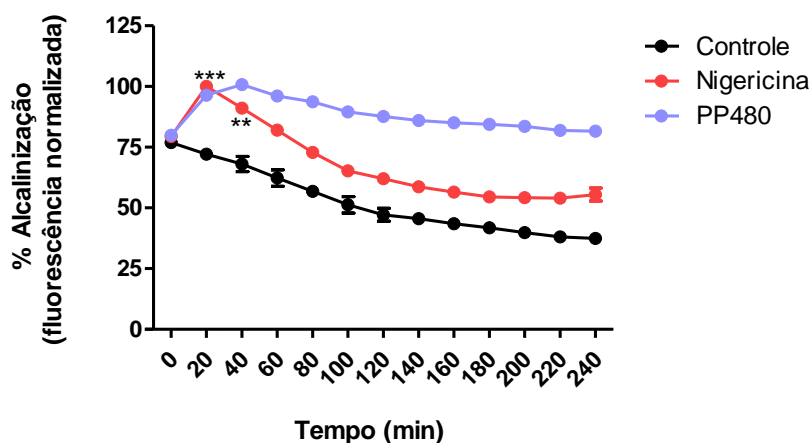


Figura 27 - Avaliação da alcalinização de acidocalcissomos em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 4h de tratamento com **PP480** (169,2 μ M), utilizando o fluoróforo laranja de acridina (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Parasitas não tratados e tratados com nigericina (4 μ M) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência é relatada como porcentagem referente a nigericina em 20 min (100%). *** $p < 0,0003$ e ** 0,0025 em relação ao controle.

4.5.8 Alterações nos Níveis de Proteínas Totais

Os níveis de proteínas totais foram quantificados em promastigotas de *L. (L.) infantum* utilizando o BCA Protein Assay Kit. Este ensaio colorimétrico se baseia na redução de Cu^{2+} para Cu^{1+} realizada por proteínas em meio alcalino (reação do biureto) e consequente detecção do cátion cuproso (Cu^{1+}) pelo ácido bicinconínico (BCA). O complexo BCA/ Cu^{1+} resulta em um produto de reação colorido, cuja intensidade é diretamente proporcional a concentração proteica.

Através da **Figura 28**, foi possível verificar que o composto **PP480** (169,2 μ M) induziu um aumento da concentração de proteínas totais em ambos os tempos de tratamento, apresentando significância estatística quando comparado aos parasitas não tratados (controle), com valor de $p < 0,05$. Contrariamente, o fármaco miltefosina, utilizado como controle positivo, reduziu significativamente os níveis proteicos quando comparado ao controle ($p < 0,0012$).

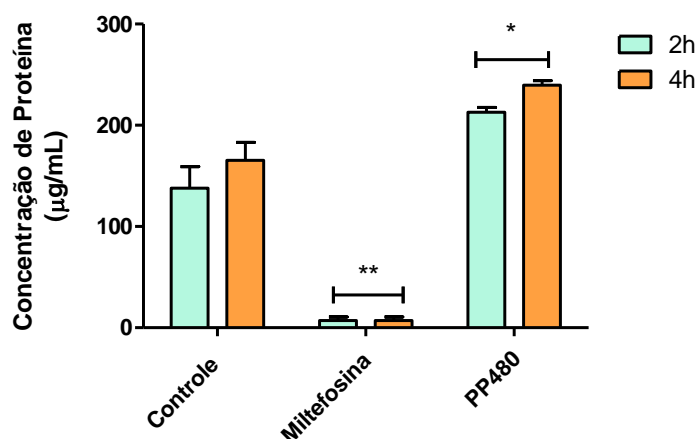


Figura 28 - Avaliação dos níveis de proteínas totais em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 2 e 4h de tratamento com **PP480** (169,2 µM), utilizando o BCA Protein Assay Kit (absorbância 550 nm). Parasitas não tratados e tratados com miltefosina (40 mM) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. ** $p < 0,0012$ e * 0,05 em relação ao controle.

4.5.9 Alterações no Perfil Proteico por MALDI-TOF/MS

A caracterização do perfil proteico de promastigotas de *L. (L.) infantum* foi realizada por espectrometria de massas, utilizando MALDI-TOF/MS. Para esta análise, foram considerados somente picos na faixa entre 2000 e 14000 m/z, com relação sinal/ruído superior a 3. A identificação do subgênero *Leishmania* foi indicada pelos picos 6154 e 7187 m/z, presentes nos parasitas não tratados (controle). Os resultados apresentados (**Figura 29**), apontam que o tratamento com o composto **PP480** (169,2 µM) por 4h, induziu a redução na intensidade de diferentes picos como 2185, 4318, 6478 e 12953 m/z, quando comparado aos parasitas não tratados. Este efeito foi observado principalmente na faixa de 2000 a 5700 m/z. Por outro lado, também pode ser destacado, o aumento acentuado na intensidade dos picos 3080, 4712 e 9421 m/z. Já o fármaco miltefosina, utilizado como padrão, reduziu a intensidade de todos os picos em relação ao controle não tratado.

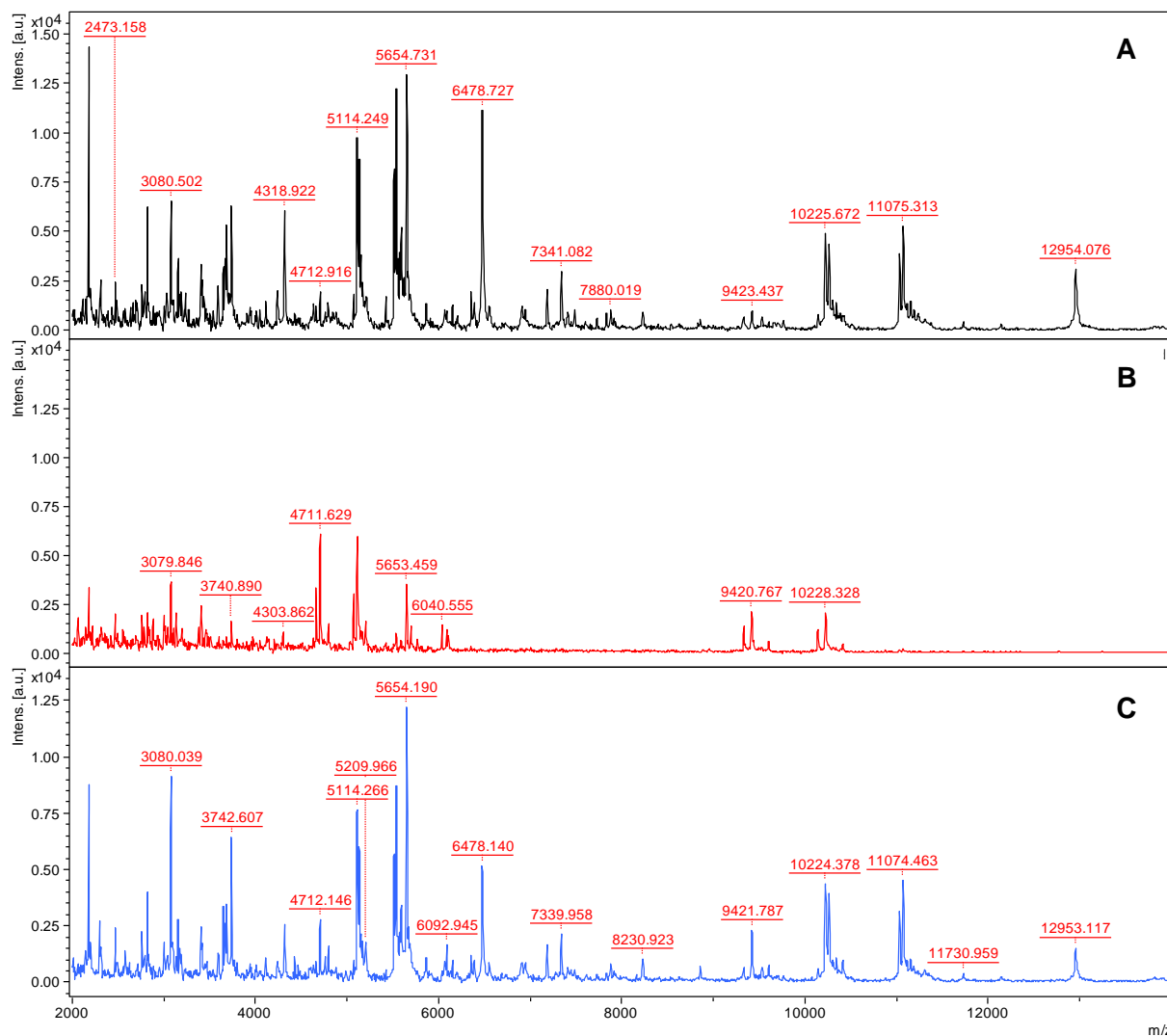


Figura 29 - Avaliação do perfil proteico de promastigotas de *L. (L.) infantum*, utilizando MALDI-TOF/MS na faixa de 2000 a 14000 m/z. **(A - Linha Preta)** Controle, **(B - Linha Vermelha)** Tratamento com miltefosina (40 mM) por 4h e **(C - Linha Azul)** Tratamento com **PP480** (169,2 μ M) por 4h.

4.5.10 Alterações no Ciclo Celular

A avaliação do ciclo celular foi realizada em promastigotas de *L. (L.) infantum*, utilizando o fluoróforo iodeto de propídeo. Este marcador entra em células permeabilizadas e se liga ao DNA, aumentando a fluorescência de acordo com o conteúdo de ácido desoxirribonucleico. É possível uma melhor compreensão a partir dos histogramas da **Figura 30**, onde a esquerda está localizada a fase Sub G₀ que compreende células com DNA fragmentado em processo de morte, com uma menor

fluorescência, uma vez que o fluoróforo não tem onde se ligar. O pico G_0/G_1 diz respeito a células diploides ($2N$) que estão aguardando o início do ciclo celular. Subsequente está a fase S, que abrange a replicação de DNA e por fim o pico G_2/M que engloba células com DNA já duplicado ($4N$) prontas para iniciar a mitose.

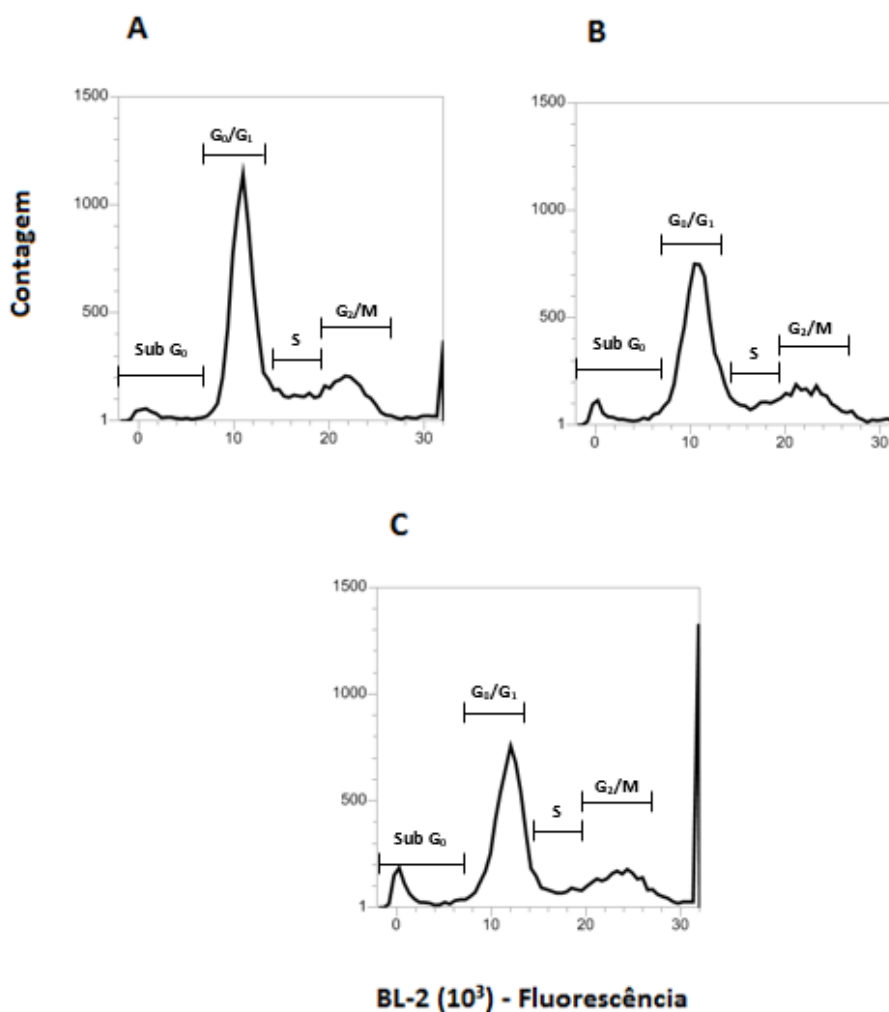


Figura 30 - Histogramas de fluorescência determinados por citometria de fluxo em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 24h de tratamento com **PP480** ($169,2 \mu\text{M}$), utilizando o fluoróforo iodeto de propídio (excitação 488 nm e emissão 574 nm). **(A)** Controle, **(B)** Miltefosina e **(C)** **PP480**. Sub G_0 : DNA fragmentado, morte celular; G_0/G_1 : células diploides ($2N$); S: replicação de DNA; M/G_2 : células com DNA duplicado.

Segundo os dados obtidos (**Tabela 5**), o tratamento com o composto **PP480** ($169,2 \mu\text{M}$) por 24h induziu um aumento estatisticamente significativo na população de Sub G_0 ($p < 0,05$), quando comparado aos parasitas não tratados (controle). Também foi observada uma interferência na fase G_0/G_1 , com uma diminuição

significante de células ($p < 0,0001$). Nenhuma alteração considerável foi verificada nas fases S e G₂/M. O fármaco miltefosina foi empregado para indução de alterações no ciclo celular e apresentou o mesmo perfil do composto **PP480**.

Tabela 5 - Avaliação de alterações no ciclo celular em promastigotas de *L. (L.) infantum* após 24h de tratamento com **PP480** e com fármaco padrão miltefosina.

Grupos	Proporção de células em diferentes fases do ciclo celular (% ± DP)			
	Sub G ₀	G ₀ /G ₁	S	M/G ₂
Controle	3,4 ± 0,4	61,3 ± 0,3	12,3 ± 0,2	18,2 ± 0,0
PP480	7,5 ± 0,7*	46,6 ± 0,7***	11,1 ± 1,3	17,9 ± 0,5
Miltefosina	7,1 ± 0,6*	53,8 ± 0,1***	10,5 ± 0,3	18,1 ± 0,4

Sub G₀: DNA fragmentado, morte celular; G₀/G₁: células diploides (2N); S: replicação de DNA; M/G₂: células com DNA duplicado; DP: Desvio Padrão. *** $p < 0,0001$ e * 0,05 em relação ao controle.

4.5.11 Alterações na Integridade do DNA

Danos na integridade do DNA de promastigotas de *L. (L.) infantum* foram avaliados por eletroforese em gel de agarose. Nesta técnica, quando o material genético está íntegro, uma banda intensa de peso elevado é concentrada no início do gel. À medida que o DNA é fragmentado, essa banda diminui sua intensidade, uma vez que os fragmentos formados possuem menor peso e, portanto, são arrastados mais adiante do gel.

Uma melhor representação pode ser observada na **Figura 31**, onde o controle (parasitas não tratados) se apresenta como uma banda acentuada. Já o controle positivo, peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - 10 mM), exibe uma banda de intensidade inferior, ilustrando a fragmentação de DNA. Além disso, foi possível verificar que o tratamento com o composto **PP480** (169,2 µM) não induziu alterações na integridade do material genético, permanecendo com uma banda semelhante à dos parasitas não tratados.

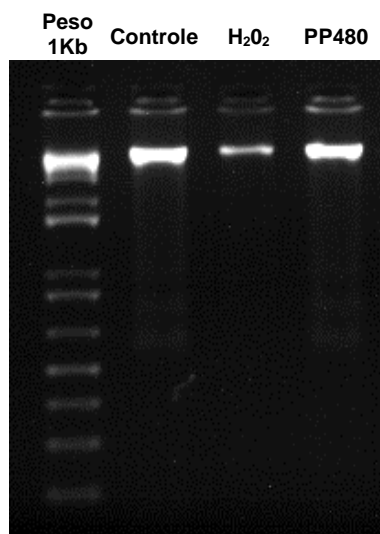


Figura 31 - Avaliação da integridade do DNA em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 24h de tratamento com **PP480** (169,2 μ M), utilizando eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio (0,5 μ g/mL). Parasitas não tratados e tratados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - 10 mM) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Um peso molecular de 1Kb foi empregado como padrão.

4.5.12 Alterações Ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Alterações ultraestruturais foram investigadas por microscopia eletrônica de transmissão em promastigotas de *L. (L.) infantum*. Conforme ilustrado na **Figura 32-A**, os parasitas não tratados (controle) exibem morfologia padrão com membranas integras e organelas viáveis. Já após 2h de tratamento com o composto **PP480** (169,2 μ M), foi possível verificar um pequeno aumento tanto no volume da mitocôndria quanto do cinetoplasto (**Figura 32-B**) em relação aos parasitas não tratados. Estes efeitos são exacerbados conforme a exposição a esta neoligana, e nos tempos tardios de incubação, também foi observada a perda das cristas mitocondriais (**Figura 32-C / D**). Adicionalmente, foi constatado no citoplasma, o surgimento de vacúolos autofágicos, em todos os tempos estudados. Embora o composto **PP480** provoque os desarranjos mencionados, as membranas celulares, assim como o núcleo e a bolsa flagelar, permaneceram sem alterações estruturais mesmo após o tratamento máximo utilizado.

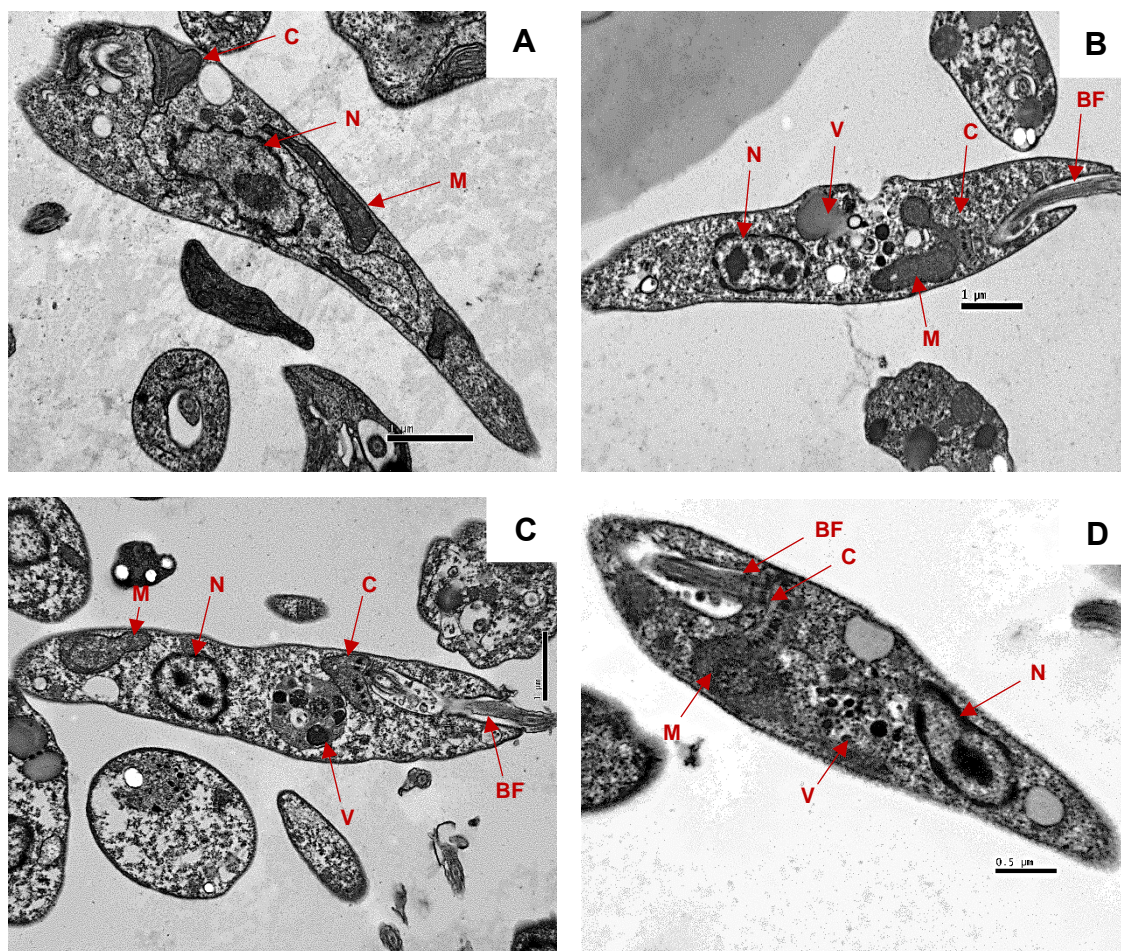


Figura 32 - Avaliação de alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) infantum*, utilizando microscopia eletrônica de transmissão. **(A)** Controle, **(B)** 2h, **(C)** 4h e **(D)** 6h de tratamento com **PP480** (169,2 µM). N: núcleo; C: cinetoplasto; M: mitocôndria; BF: bolsa flagelar e V: vacúolo.

4.5.13 Proposta de Mecanismo de Ação

A investigação do mecanismo de ação do composto **PP480** foi realizada em promastigotas de *L. (L.) infantum*, por meio de diferentes abordagens de espectrofluorimetria e citometria de fluxo. Em resumo (**Figura 33**), foi possível observar que o derivado sintético não causa alteração da permeabilidade da membrana plasmática, no entanto, induz a despolarização de seu potencial elétrico **(1)**. Já no interior do parasita, esta neolignana gera a alcalinização dos acidocalcissomos e decorrente aumento de Ca^{2+} **(2)**. Também é possível observar a despolarização da membrana mitocondrial do parasita **(3)**, com diminuição dos níveis de ATP e ROS **(4)**. Na avaliação nuclear, o tratamento com o derivado **PP480** não

induz danos a integridade do material genético e nem mudanças significativas no processo de divisão celular (5). Por fim, foi possível verificar uma interferência no perfil proteico, com aumento dos níveis de proteínas totais.

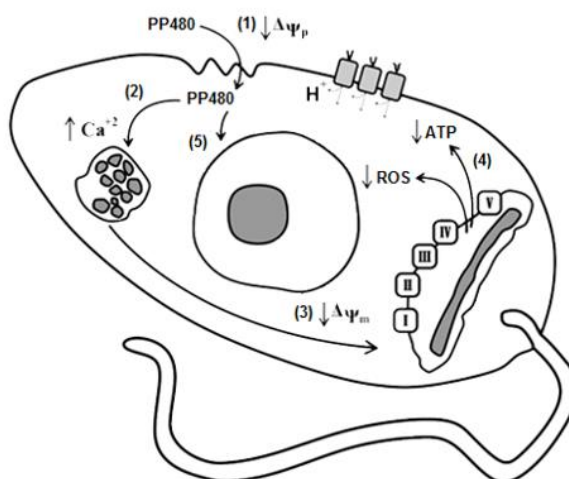


Figura 33 - Proposta de mecanismo de ação em promastigotas de *L. (L.) infantum*, após tratamento com **PP480**. **(1)** Despolarização do potencial elétrico da membrana plasmática; **(2)** Alcalinização dos acidocalcissomos com decorrente aumento de Ca^{2+} ; **(3)** Despolarização da membrana mitocondrial; **(4)** Diminuição de ATP e espécies reativas de oxigênio (ROS); **(5)** Nenhuma alteração nuclear, porém interferências no perfil proteico, com aumento dos níveis de proteínas totais.

4.6 Avaliação da Resposta Imunomodulatória

4.6.1 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico foi realizada em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum*, utilizando o método de Griess. Tendo em vista que o óxido nítrico produzido na célula é oxidado em nitrito (NO_2^-), este ensaio se baseia na reação deste ânion com sulfanilamida e dicloridrato de naftil etilenodiamina, em condições ácidas, para formação do cromógeno Azo. Sendo assim, o aumento da concentração de NO na célula leva diretamente ao aumento de cromógeno.

Os resultados obtidos (**Figura 34**) indicam que mesmo após 48h de tratamento com o composto **PP480** (7,5 a 60 μM) os níveis de NO permaneceram similares ao controle (parasitas não tratados). Já no controle positivo, LPS (25 $\mu\text{g/mL}$),

houve uma produção média de 35 μM , um aumento significativo quando comparado aos parasitas não tratados ($p < 0,0001$).

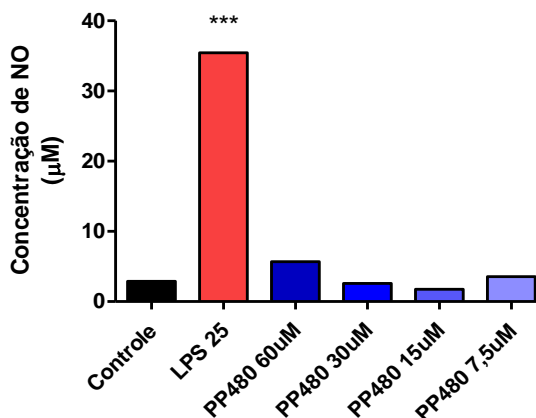


Figura 34 - Avaliação dos níveis de óxido nítrico em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum*, após 48h de tratamento com **PP480** (7,5 a 60 μM), utilizando o método de Griess (absorbância 570 nm). Macrófagos não tratados e tratados com LPS (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. *** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

4.6.2 Dosagem de Citocinas

Os níveis das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e INF- γ foram quantificados em macrófagos peritoneais infectados com promastigotas de *L. (L.) infantum*, através dos kits BD OptEIA Mouse ELISA. Neste ensaio de reação imunoenzimática, são empregados dois anticorpos monoclonais para detecção do analito, formando um complexo sanduiche (anticorpo de captura + analito + anticorpo de detecção).

De acordo com os resultados adquiridos, foi possível verificar que o composto **PP480** (10 e 60 μM) induziu uma redução nos níveis de IL-10 após 48 e 72h de tratamento, significativa estatisticamente quando comparado ao controle (macrófagos não tratados) (**Figura 35-A**). Referente as citocinas IL-4 e IL-12 (**Figura 35-B / C**) foi possível observar que apenas na concentração de 60 μM ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa em todos os tempos. A avaliação de INF- γ também apresentou níveis significativamente reduzidos após tratamento com **PP480** (60 μM) por 48 e 72h (**Figura 35-D**). Portanto, foi possível constatar que o composto estimulou uma redução nos níveis de todas as citocinas estudadas em ambos os tempos de

tratamento (48 e 72h). Contrariamente, o controle positivo, concanavalina A (5 µg/mL), apresentou uma tendência biológica ao aumento da produção das citocinas, em relação aos macrófagos não tratados.

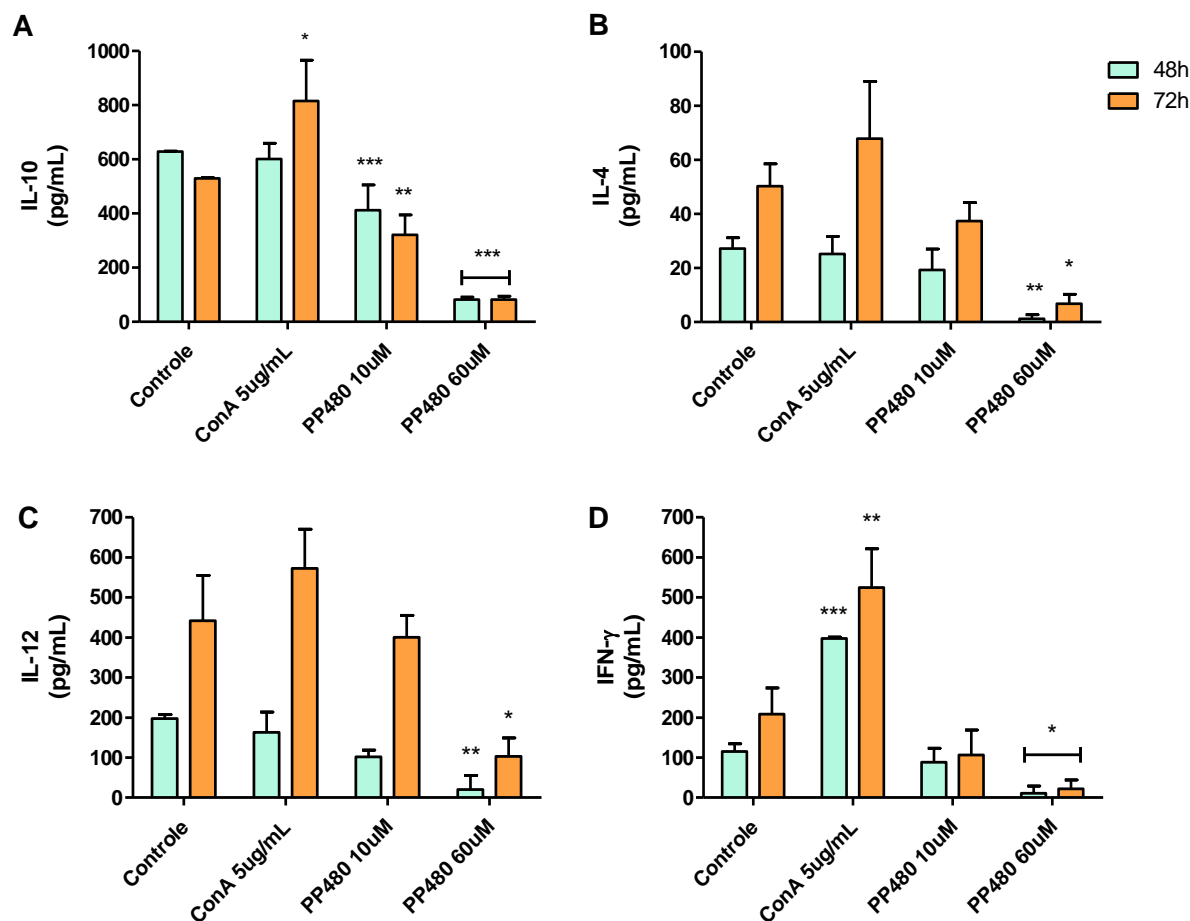


Figura 35 - Avaliação dos níveis de citocinas em macrófagos peritoneais infectados com promastigotas de *L. (L.) infantum*, após 48 e 72h de tratamento com **PP480** (10 e 60 µM), utilizando os kits BD OptEIA Mouse ELISA (absorbância 450 nm). Macrófagos não tratados e tratados com concanavalina A (5 µg/mL) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. **(A)** IL-10, **(B)** IL-4, **(C)** IL-12 e **(D)** INF-γ. *** $p < 0,0002$, ** $0,0025$ e * $0,05$ em relação ao controle.

4.7 Determinação do Perfil Farmacocinético *in vivo*

O perfil farmacocinético do composto **PP480** em ratos Wistar foi avaliado após administração intraperitoneal, utilizando cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Por meio de um método analítico previamente validado, foi possível a determinação de diferentes parâmetros, incluindo: Tempo de meia vida ($T_{1/2}$); Tempo

máximo (T_{max}); Concentração plasmática máxima (C_{max}); Área sob a curva do tempo zero ao tempo da última concentração mensurável (AUC_{0-t}), estimada pela regra trapezoidal linear; Área sob a curva do tempo zero ao infinito (AUC_{0-inf}), calculada através da equação $AUC_{0-t} + (C_{last}/kel)$, onde C_{last} é referente a última concentração mensurável e kel é a constante da taxa de eliminação aparente; Porcentagem de área sob a curva extrapolada do tempo da última concentração mensurável ao infinito (AUC_{extrap}); Tempo médio de residência (MRT).

Os perfis médios de concentração plasmática por tempo de seis ratos (3 fêmeas e 3 machos) tratados com dose única do composto **PP480** (5 mg/kg) estão apresentados na **Figura 36**. Já os parâmetros farmacocinéticos correspondentes estão compilados na **Tabela 6**. Considerando os resultados de tempo de meia vida ($T_{1/2}$), foi possível constatar que nos ratos machos, o composto foi eliminado mais lentamente (31,43h), permanecendo mais tempo no plasma do que nas fêmeas (10,72h). Estes dados podem ser corroborados pelos valores de MRT, também discrepantes entre machos (41,08h) e fêmeas (12,75h). Levando em consideração os valores de C_{max} e T_{max} , foi possível verificar que as fêmeas atingem o dobro das concentrações (0,20 $\mu\text{g/mL}$) dosadas nos machos (0,10 $\mu\text{g/mL}$) em um tempo inferior (0,50h versus 1,50h). Por fim, a exposição sistêmica (AUC_{0-t}) também foi inferior para machos (0,65 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ versus 0,98 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$).

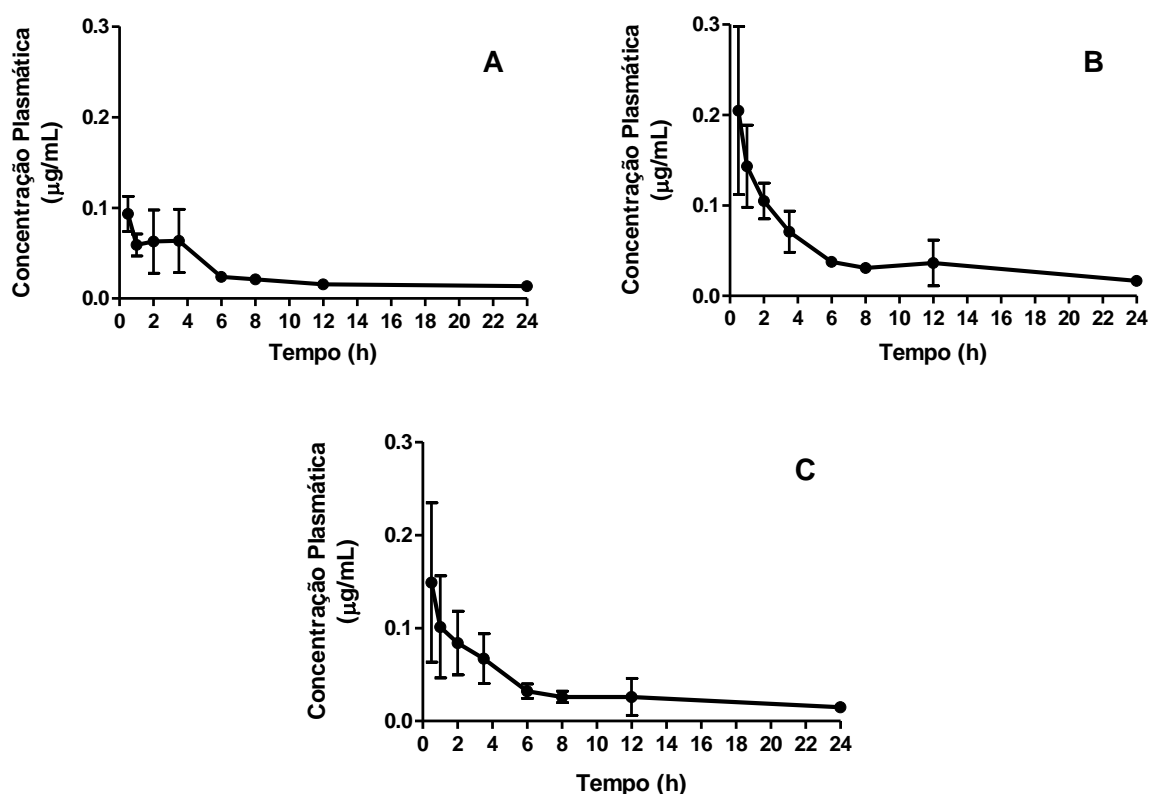


Figura 36 - Perfis médios de concentração plasmática por tempo após administração do composto **PP480** (5 mg/kg) em seis ratos Wistar (3 fêmeas e 3 machos), por via intraperitoneal. **(A)** Machos, **(B)** Fêmeas e **(C)** A+B. Cada ponto está representado pela média \pm desvio padrão.

Tabela 6 - Parâmetros farmacocinéticos após administração do composto **PP480** (5 mg/kg) em seis ratos Wistar (3 fêmeas e 3 machos), por via intraperitoneal.

Parâmetros	Machos (Média \pm DP)	Fêmeas (Média \pm DP)	Machos + Fêmeas (Média \pm DP)
$T_{1/2}$ (h)	31,43 \pm 21,05	10,72 \pm 4,44	21,08 \pm 17,72
T_{max} (h)	1,50 \pm 1,73	0,50 \pm 0,00	1,00 \pm 1,22
C_{max} (µg/mL)	0,10 \pm 0,00	0,20 \pm 0,09	0,15 \pm 0,08
AUC_{0-t} (µg/mL*h)	0,65 \pm 0,11	0,98 \pm 0,36	0,81 \pm 0,30
AUC_{0-inf} (µg/mL*h)	1,3 \pm 0,35	1,24 \pm 0,39	1,27 \pm 0,34
AUC_{extrap} (%)	0,55 \pm 0,28	0,78 \pm 0,05	0,66 \pm 0,22
MRT (h)	41,08 \pm 27,00	12,75 \pm 3,40	26,92 \pm 23,18

DP: Desvio Padrão; Tempo de meia vida ($T_{1/2}$); Tempo máximo (T_{max}); Concentração plasmática máxima (C_{max}); Área sob a curva do tempo zero ao tempo da última concentração mensurável (AUC_{0-t}); Área sob a curva do tempo zero ao infinito (AUC_{0-inf}); Porcentagem de área sob a curva extrapolada do tempo da última concentração mensurável ao infinito (AUC_{extrap}); Tempo médio de residência (MRT).

5 DISCUSSÃO

Doenças tropicais negligenciadas, como a leishmaniose visceral, causam cerca de 17% das mortes do mundo e geram um grande impacto econômico e social (Lee *et al.*, 2019). Embora caracterize a forma mais grave de seu complexo de doenças, por ser endêmica principalmente em populações de baixa renda, a LV não recebe a atenção necessária em termos de novas terapias. Por esse motivo, dispõe de um arsenal quimioterápico reduzido e com diversos efeitos adversos (Jain e Jain, 2018; Ibarra-Meneses *et al.*, 2020). Diante deste cenário, a busca por alternativas terapêuticas seguras e acessíveis é indispensável.

Na pesquisa por novas quimioterapias, os produtos naturais representam uma fonte promissora de novos protótipos farmacêuticos. Neste contexto, diversos metabólitos secundários isolados de animais, plantas e microrganismos apresentaram atividade contra os parasitas de *Leishmania*, dentre eles: alcalóides, fenilpropanóides, saponinas, flavonóides, lignóides, naftoquinonas e iridóides. Além disso, fármacos já utilizados na clínica, como anfotericina B e paromomicina, possuem origem de fontes naturais (Tiwari *et al.*, 2018; Varela e Fernandes, 2020).

No que se refere a atividade anti-*Leishmania* de neolignananas, diversos dados são reportados na literatura (Costa *et al.*, 2016, Pereira *et al.*, 2017). Dentre eles, o 2,3-desidrobenzofurano demonstrou significativa atividade em *L. (L.) amazonensis*, apresentando um CE₅₀ de 1,0 µM em promastigotas e 1,4 µM em amastigotas (Oliveira *et al.*, 2017). Já a análise da licarina A comprovou *in vitro* a atividade contra amastigotas de *L. (L.) major*, com um valor de CE₅₀ de 4,7 µg/mL (Néris *et al.*, 2013). Em outros estudos, foi evidenciada a potente atividade anti-*L. (L.) amazonensis* de análogos de isoxazol, derivados das neolignananas veraguensina, grandisina e machilina G, com valores de CE₅₀ variando entre 0,4 e 25 µM (Neves *et al.*, 2019).

Em estudo prévios, nosso grupo descreveu pela primeira vez, a atividade anti-*Leishmania (L.) donovani* e anti-*Trypanosoma cruzi* de neolignananas isoladas de galhos e folhas de *Nectandra leucanta* (Lauraceae) (Costa-Silva *et al.*, 2015; Grecco *et al.*, 2017a, 2017b). Posteriormente, utilizando uma dessas neolignananas como protótipo, desidrodieugenol B, quatro compostos semissintéticos foram preparados e suas atividades contra amastigotas de *L. (L.) infantum* foram descritas (Amaral *et al.*, 2019).

Por fim, visando favorecer alterações moleculares inéditas, foi desenvolvida a síntese total do desidrodieugenol B (Sear *et al.*, 2020).

No presente estudo, também utilizando desidrodieugenol B como protótipo, foi preparada uma série de 57 novos compostos, sendo 55 sintéticos e 2 semissintéticos. Dentre eles, 19 (**CES435**, **CES436**, **CES448**, **CES476**, **CES509**, **CES512**, **PP480**, **SN27**, **SN28**, **SN39**, **SN52**, **SN63**, **HA043**, **HA075**, **HA077**, **HA078**, **HA171**, **MA001** e **MA002**) apresentaram atividade contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*, sendo apenas 7 deles (**CES476**, **CES509**, **CES512**, **SN27**, **SN28**, **SN52** e **HA171**) citotóxicos nas concentrações testadas em fibroblastos murinos.

Há uma necessidade crescente de ferramentas eficientes para predição de propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas logo nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos. Estes métodos preditivos têm sido amplamente utilizados por empresas farmacêuticas e grupos acadêmicos, a fim de auxiliar a otimização estrutural na fase de “*hit to lead*”, identificando os compostos mais promissores e reduzindo futuras falhas terapêuticas *in vivo* (Balaña-Fouce *et al.*, 2019, Han *et al.*, 2019). Tendo isso em vista, o composto mais seletivo da série, **PP480**, foi avaliado *in silico* por filtros selecionados através do servidor SwissADME. Os resultados obtidos indicam que esta neolignana possui alta absorção gastrointestinal e solubilidade moderada, características que influenciam diretamente na biodisponibilidade oral. Além disso, verificou-se que este composto é permeável à barreira hematoencefálica. A capacidade de atravessar essa barreira é um parâmetro extremamente importante, visto que uma dosagem sistêmica do composto, pode resultar em efeitos adversos e toxicidade no sistema nervoso (Monteiro-Neto *et al.*, 2020). Entretanto, compostos que atuam como substrato da glicoproteína-P, como o **PP480**, têm sua entrada no cérebro impedida, uma vez que essa proteína transportadora é capaz de modular o efluxo de xenobióticos através das barreiras celulares (Alavijeh *et al.*, 2005; Szakács *et al.*, 2008). Outra particularidade da P-gp, é sua capacidade de influenciar o metabolismo de fármacos, desempenhando um papel complementar ao das moléculas do citocromo P450, uma vez que prolonga a exposição de compostos à essas enzimas metabolizadoras por meio de repetidas exclusões e reabsorções na célula. No que se refere ao citocromo P450, esta superfamília de enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos, conta com cinco isoformas principais (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4).

Quando inibidas, estas enzimas podem induzir efeitos adversos e toxicidade devido ao maior acúmulo sistêmico do composto e de seus metabolitos (Szakács *et al.*, 2008; Daina *et al.*, 2017). A neolignana **PP480** foi então avaliada *in silico* quanto a sua interferência na atividade do citocromo P450 e os resultados demonstraram que apenas uma isoenzima (CYP2D6) foi considerada como possível alvo para inibição, não sendo observada promiscuidade.

Ao longo dos anos, a descrição de filtros estabelecendo limites para propriedades físico-químicas foi realizada por diversos autores, com intuito de auxiliar na seleção de compostos com comportamento farmacocinético adequado e um perfil semelhante ao de fármacos orais já aprovados (*drug-likeness*). Dentre os filtros mais conhecidos, está a “regra” dos cinco de Lipinski, composta por quatro critérios ideais, dos quais, para melhor biodisponibilidade oral, no mínimo dois devem estar dentro dos limites determinados (Lipinski *et al.*, 1997; Meanwell, 2016). O derivado **PP480** foi avaliado *in silico* quanto a seu perfil *drug-likeness*, apresentando resultados favoráveis, com parâmetros aceitáveis pelos filtros de Lipinski e Egan. A análise também sugere, que otimizações moleculares relacionadas à flexibilidade, devem melhorar a segurança e biodisponibilidade do composto e que parâmetros de lipofilicidade e tamanho devem ser monitorados em futuros derivados. Adicionalmente, essa neolignana não demonstrou semelhanças a compostos de interferência (PAINS). Cerca de 5% dos fármacos aprovados pela FDA, incluindo produtos naturais, contêm subestruturas PAINS. Esses compostos podem apresentar reatividade com nucleófilos biológicos, exibir interferências físico-químicas, como formação de micelas, ou possuir propriedades fotocrômicas, interferindo na sinalização dos bioensaios normalmente utilizados, produzindo atividades falso-positivas (Baell, 2016).

De acordo com o DNDi, para ser considerado um *hit* para leishmaniose visceral, um composto deve: **I.** ser obtido por uma via sintética de até 8 etapas; **II.** apresentar um CE₅₀ em amastigotas menor que 10 µM; **III.** exibir um índice de seletividade de pelo menos 10; **IV.** dispor de um perfil de ADMET *in silico* adequado e **V.** não conter alertas estruturais (Don e Ioset, 2014; Katsuno *et al.*, 2015). Com base nesses critérios e nos resultados obtidos, o composto **PP480** pode ser classificado como um *hit* para LV e por esse motivo foi selecionado como objeto para estudos mais aprofundados.

Diversos ensaios celulares podem ser realizados para determinação de efeitos citotóxicos, a fim de auxiliar na seleção de compostos químicos seguros e com melhor índice terapêutico. Dentre eles, a avaliação da atividade hemolítica usando eritrócitos é comumente empregada, podendo ser utilizada para comprovar a seletividade do composto e sua ação na membrana plasmática celular, possivelmente permitindo a correlação com dados *in vivo* (Castro Oliveira *et al.*, 2017). No presente estudo, a atividade hemolítica do derivado **PP480** foi avaliada em eritrócitos de camundongos BALB/c e os resultados demonstraram que essa neolignana não promove hemólise em nenhuma das concentrações testadas, de modo similar a outros derivados de desidrodieugenol B (Amaral *et al.*, 2019).

A compreensão do mecanismo de ação de um composto é fundamental no processo de desenvolvimento de fármacos, tanto para otimização molecular, visando o incremento da potência, seletividade e de parâmetros farmacocinéticos, quanto para a exclusão de possíveis efeitos toxicológicos (Aulner *et al.*, 2019; Davis, 2020). Considerando os resultados favoráveis obtidos até o presente momento com a neolignana **PP480**, seu mecanismo de ação foi investigado em promastigotas de *L. (L.) infantum*, utilizando diferentes abordagens de espectrofluorimetria e citometria de fluxo.

A membrana plasmática é imprescindível para a sobrevivência celular, tendo em vista que é a barreira responsável pelo transporte de nutrientes e outros íons entre o ambiente intra e extracelular. Em tripanossomatídeos, é ainda responsável pela interação com o hospedeiro, uma vez que este mecanismo é dependente das proteínas contidas na superfície celular. Além disso, nestes parasitas, esta membrana é constituída de ergosterol, diferentemente do hospedeiro mamífero que possui colesterol como principal esteroide, tornando-se assim, um alvo fundamental a ser estudado (Chattopadhyay e Jafurulla, 2011; De la Serna *et al.*, 2016). Como exemplo, é possível citar a anfotericina B, um dos tratamentos mais aplicados na clínica das leishmanioses, que tem sua ação na membrana plasmática. Este fármaco interage com o ergosterol, induzindo a formação de poros que possibilitam o extravasamento de pequenas moléculas pela bicamada lipídica, desequilibrando a homeostase celular (Saha *et al.*, 1986; No, 2016). No presente trabalho, foi avaliada a ação do composto **PP480** na membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum*. De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que esta neolignana não induz alterações

na permeabilidade da membrana. Resultados semelhantes com derivados semissintéticos de desidrodieugenol B foram reportados anteriormente em *Trypanosoma cruzi* e *L. (L.) infantum* (Amaral *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2019).

Outro parâmetro relevante na avaliação da membrana plasmática é seu potencial elétrico, resultante da movimentação de íons através da membrana e mantido especialmente por bombas H⁺-ATPase, diferentemente das Na⁺, K⁺-ATPase, comumente encontradas em mamíferos. Um equilíbrio iônico apropriado é necessário para o controle do volume celular, manutenção da osmolaridade e regulação da homeostase do pH e de metais pesados. A ligação de compostos a proteínas da membrana pode afetar esta dinâmica molecular e causar alterações extremamente prejudiciais a célula, causando um desequilíbrio iônico e podendo levar a formação de poros transmembrana (Morth *et al.*, 2011; Venkatesh *et al.*, 2017; Meade, 2019). Aplicando citometria de fluxo, foi possível constatar que o derivado **PP480** promove despolarização da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum*, efeito este, mantido até o tempo máximo estudado. Dessa forma, é possível sugerir que tais alterações são resultantes da entrada do composto no parasita, que pode estar gerando alterações no fluxo íons através da ligação a proteínas de transporte específicas como H⁺-ATPases. Estudos da literatura também reportaram a ação de produtos naturais, incluindo neolignanas, no potencial da membrana plasmática de parasitas de *Leishmania* (Das *et al.*, 2017; Alcazar *et al.* 2021).

A mitocôndria é responsável por inúmeros processos metabólicos, sendo vital para o crescimento e diferenciação celular. Além de desempenhar um papel crucial na sobrevivência, essa organela vem sendo extensamente estudada em tripanosomatídeos, visto que estes apresentam uma única mitocôndria, diferentemente dos mamíferos que apresentam milhares em suas células. Outra característica destes parasitas é a presença de uma região específica para o DNA mitocondrial condensado, denominada cinetoplasto, que representa cerca de 15% do DNA total e está disposta próximo ao flagelo. Neste contexto, a busca por compostos que tenham como alvo terapêutico essa organela vem sendo abordado como uma estratégia promissora para a clínica das leishmanioses (Menna-Barreto e Castro, 2014; Sundar e Singh, 2018, Brindha *et al.*, 2021). Em pesquisas anteriores, foram descritos diversos compostos com ação na mitocôndria de tripanosomatídeos (Martins *et al.*, 2016; Wulsten *et al.*, 2017). Particularmente, as neolignanas derivadas de

desidrodieugenol B e a eupomatenóide-5 são conhecidas por induzir a despolarização da membrana mitocondrial de parasitas de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (Garcia *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2019). Resultados similares foram obtidos a partir do tratamento de promastigotas de *L. (L.) infantum* com o composto **PP480**, que demonstrou uma significativa despolarização do potencial da membrana mitocondrial.

O potencial elétrico é resultado de um gradiente eletroquímico gerado pela cadeia respiratória, sendo fundamental no processo de produção de trifosfato de adenosina (ATP). Variações no mesmo, podem ocasionar um aumento da permeabilidade de prótons na membrana mitocondrial, acarretando falhas na fosforilação oxidativa e consequentes prejuízos ao metabolismo, deficiência energética e morte do parasita (Perry *et al.*, 2011; Rajendran *et al.*, 2016). Tendo isto em vista, alterações na cadeia bioenergética de promastigotas de *L. (L.) infantum* foram analisadas, constatando que após 2h de tratamento com **PP480**, já há uma redução significativa dos níveis de ATP nos parasitas.

A mitocôndria também é a fonte majoritária de espécies reativas de oxigênio (ROS). Durante o funcionamento da cadeia respiratória, sob condições normais, são gerados ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (Lejay *et al.*, 2012; Reczek e Chandel, 2015). Portanto, alterações mitocondriais afetam diretamente a produção dessas espécies, que em excesso, podem induzir estresse oxidativo e interferir em vias metabólicas, causando danos celulares irreversíveis (Menna-Barreto e Castro, 2014; Vázquez *et al.*, 2017). O presente estudo demonstrou uma diminuição nos níveis de ROS em promastigotas de *L. (L.) infantum* após o tratamento com o composto **PP480**. Sendo assim, é possível inferir que as falhas mitocondriais causadas pelo composto resultam em um colapso da cadeia respiratória, levando a uma diminuição da produção de energia celular e consequente queda dos níveis de espécies reativas de oxigênio.

Os íons de cálcio (Ca^{2+}) desempenham um importante papel na sinalização celular, sendo essenciais para a modulação de múltiplas vias metabólicas e enzimas-chave (Ramakrishnan e Docampo, 2018). A entrada em excesso pela membrana plasmática ou a falha em algum dos mecanismos de regulação, leva ao desequilíbrio nas concentrações de cálcio citosólico, fazendo com que a mitocôndria exerça um papel indispensável no tamponamento deste íon de forma a controlar seus níveis

intracelulares (Docampo e Huang, 2015; Docampo e Moreno, 2021). No entanto, a capacidade de captação de Ca^{2+} por essa organela é limitada e variações acentuadas podem acarretar a formação de canais de alta condutância que levam a dissipação do potencial da membrana mitocondrial (Benaim *et al.*, 2020; Scarpelli *et al.*, 2021).

Logo, com o intuito de determinar a causa da alteração mitocondrial observada, foram investigados os níveis de cálcio em promastigotas de *L. (L.) infantum* após tratamento com a neolignana **PP480**. Os resultados demonstraram que em apenas 20 minutos, o composto induz um aumento exacerbado nos níveis de Ca^{2+} , possivelmente, liberando-o das reservas intracelulares, uma vez que o meio extracelular não contém cálcio, impossibilitando o influxo transmembrana. Portanto, pode-se sugerir que a disfunção mitocondrial causada pela neolignana **PP480**, possa ser decorrente de uma elevação dos níveis deste íon. Porém, uma ação direta na mitocôndria não pode ser totalmente descartada. É importante mencionar, que a despolarização da membrana plasmática, pode também ser resultado dos níveis elevados de cálcio intracelular, considerando que diversos canais localizados nesta membrana são responsáveis pela captação e liberação de Ca^{2+} (Docampo e Huang, 2015; Benaim *et al.*, 2020).

Tendo em vista os altos níveis de cálcio observados após o tratamento com a neolignana **PP480**, a etapa seguinte para a compreensão do mecanismo de ação, foi avaliar se essa modificação poderia ser atribuída a alterações nos acidocalcissomos. Essas organelas são os principais reservatórios de cálcio em tripanossomatídeos, diferentemente das células de mamífero, onde o retículo endoplasmático desempenha essa função (Ramakrishnan e Docampo, 2018). Os acidocalcissomos exibem um pH ácido que favorece a retenção de Ca^{2+} , uma vez que transportadores $\text{Ca}^{2+} / \text{H}^+$ são responsáveis pelo efluxo deste íon. Portanto, após a alcalinização, estas organelas tendem a internalizar H^+ à medida que liberam cálcio no citosol, como forma de reestabelecer o equilíbrio homeostático (Sundar e Singh, 2018; Benaim *et al.*, 2020). Nos estudos realizados com promastigotas de *L. (L.) infantum*, foi possível constatar que em apenas 20 minutos de tratamento, o composto **PP480** promove a alcalinização dos acidocalcissomos. Portanto, é possível inferir que esta neolignana perturba a função dessas organelas, desencadeando a liberação de Ca^{2+} no citosol. A miltefosina, utilizada na clínica das leishmanioses, exibe o mesmo padrão de ação letal em *L. (L.) donovani*, causando alcalinização dos acidocalcissomos e consequente

aumento de cálcio, com colapso do potencial da membrana mitocondrial (Pinto-Martinez *et al.*, 2018). Além dos acidocalcissomos, outros depósitos de Ca^{2+} , podem estar sendo afetados pelo composto, porém, estudos mais detalhados são necessários para avaliação.

As proteínas são ferramentas valiosas em estudos de resistência medicamentosa, interação parasita-hospedeiro, assim como na identificação de marcadores de diagnóstico (Müller e Hemphill, 2016; Sundar e Singh, 2018). Desde a catálise de reações químicas, ao crescimento e adaptação a diferentes microambientes, proteínas são imprescindíveis para a execução e regulação de diversos mecanismos celulares. As proteínas de membrana, por exemplo, são responsáveis pela formação de canais e bombas, sendo cruciais para o transporte de moléculas e sinalização celular (Alberts *et al.*, 2017). Portanto, devido ao importante papel na viabilidade e infectividade parasitaria, desequilíbrios proteicos levam a consideráveis disfunções no metabolismo celular e podem induzir a morte (Garg *et al.*, 2018). Diante deste cenário, a análise destas macromoléculas se faz essencial para a investigação do mecanismo de ação. Considerando os resultados obtidos, foi possível verificar que o composto **PP480**, induz um aumento nos níveis de proteínas totais em promastigotas de *L. (L.) infantum*. Este efeito pode ser atribuído a um mecanismo de regulação para sobrevivência celular diante de um eventual desequilíbrio metabólico, possivelmente ocasionado pelo colapso bioenergético do parasita.

A técnica espectrométrica de MALDI-TOF/MS, é amplamente utilizada na rotina de diagnóstico para identificação de microrganismos, dispondo de um grande banco de dados com perfis conhecidos de diversos gêneros e espécies (Singhal *et al.*, 2015). No que se refere aos parasitas de *Leishmania*, a técnica foi padronizada, estabelecendo um perfil para determinação de subgênero (Mouri *et al.*, 2014). Recentemente, começaram a surgir também metodologias de aprendizado, denominadas “*machine learning*”, utilizando espectrometria de massas para investigação do mecanismo de ação de fármacos, com ênfase na área de antimicrobianos (van Oosten e Klein, 2020). Neste trabalho, por meio de uma abordagem de MALDI-TOF/MS, foi elucidado o perfil espectral de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com **PP480**, demonstrando alterações expressivas, com reduções e aumentos na intensidade de proteínas específicas. Desta forma, foi

possível complementar a avaliação do mecanismo de ação deste composto e confirmar sua interferência na produção de proteínas. Também foi constatado que as mudanças no perfil proteico desta neolignana, foram evidentemente diferentes daquelas verificadas após tratamento com o fármaco miltefosina, sugerindo mecanismos de ação distintos e oferecendo abertura para a descoberta de novos alvos moleculares.

O ciclo celular é rigidamente controlado por um complexo de proteínas, cujo papel é essencial para sobrevivência parasitária. Sendo assim, compostos que as tenham como alvo ou que causem alguma disfunção na divisão celular, podem gerar graves distúrbios de proliferação, levando o parasita a morte (Sundar e Singh, 2018). O estibogluconato de sódio, utilizado como primeira escolha no tratamento das leishmanioses, atua como inibidor de topoisomerasas, enzimas fundamentais para o processo de replicação do DNA (No, 2016). Adicionalmente, pesquisas anteriores demonstraram que um derivado semissintético de desidrodieugenol B interfere na divisão celular de parasitas de *L. (L.) infantum*, acometendo o mecanismo de replicação de DNA e a mitose (Amaral *et al.*, 2019). Neste estudo, modificações no ciclo celular de promastigotas de *L. (L.) infantum* foram avaliadas por citometria de fluxo e os resultados mostraram que o composto **PP480** interfere somente nas fases SubG₀ e G₀/G₁. O aumento de células na fase SubG₀ indica que o conteúdo de DNA está fragmentado e a diminuição de G₀/G₁, indica que uma menor quantidade de parasitas está no período estacionário, se preparando para a divisão. Deste modo, quando esses dados são avaliados em conjunto, é possível sugerir que o aumento em SubG₀ ocorre às custas de células da fase G₀/G₁, sem mudanças significativas no mecanismo de replicação de DNA e mitose (Fases S e G₂/M). Portanto, é possível que o ciclo celular esteja ocorrendo normalmente nas células viáveis, considerando que o tratamento se deu na Concentração Efetiva 50%. Efeitos semelhantes foram observados anteriormente no tratamento de promastigotas de *L. (L.) donovani* com miltefosina (Paris *et al.*, 2004).

A morte celular programada, denominada como apoptose, é evidenciada por diversos eventos, como a despolarização de membrana mitocondrial, aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e exacerbação de cálcio citosólico. Ademais, a fragmentação do material genético internucleossomal é considerada um indicador extremamente importante neste tipo de morte celular. Já no que diz respeito

a morfologia, a redução do volume celular, condensação da cromatina e formação de vesículas a partir da membrana plasmática, chamadas de corpos apoptóticos, são características observadas (Azami *et al.*, 2018; Menna-Barreto, 2019). Considerando os resultados adquiridos nos estudos mitocondriais e de ciclo celular, uma análise de fragmentação do material genético foi realizada em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com o composto **PP480**. Anteriormente, foram reportados na literatura diversos compostos, incluindo a neolignana licarina A e o fármaco miltefosina, que exibem efeito de fragmentação em parasitas de *Leishmania* (Néris *et al.*, 2013; Saudagar *et al.*, 2014; Cianciulli *et al.*, 2018). Nesta pesquisa, utilizando eletroforese em gel de agarose, foi possível verificar que o derivado sintético estudado, não causa alterações na integridade do material genético dos parasitas. Sendo assim, é possível inferir que a fragmentação do DNA não pode ser atribuída como mecanismo de ação do composto **PP480** e, portanto, o aumento de células com DNA fragmentado (fase subG₀) no estudo de ciclo celular não está relacionado a uma morte do tipo “*apoptose-like*”.

Tendo em vista que a necrose envolve essencialmente a ruptura da membrana plasmática, este tipo de morte celular também pode ser descartado, uma vez que a neolignana **PP480** não induz a formação de poros nesta membrana. Sendo assim, a hipótese remanescente é a de morte celular por autofagia, processo caracterizado pela degradação de constituintes celulares danificados, formando corpos multivesiculares e vacúolos no citoplasma. Este mecanismo representa uma estratégia de sobrevivência a condições adversas, no entanto, em situações de estresse exacerbado, acarreta um desequilíbrio na homeostase celular, desencadeando a sinalização de morte (Basmacıyan e Casanova, 2019; Menna Barreto, 2019; Machado *et al.*, 2021). Através de uma investigação ultraestrutural, por microscopia eletrônica de transmissão, foi possível constatar a vacuolização do citoplasma de promastigotas de *L. (L.) infantum* em todos os tempos de tratamento com o composto **PP480**. Adicionalmente, também foram verificados desarranjos mitocondriais, corroborando os estudos realizados por citometria de fluxo. Resultados similares foram relatados anteriormente após exposição de parasitas de *L. (L.) infantum* a outro derivado da neolignana desidrodieugenol B (Amaral *et al.*, 2019). Nenhuma alteração na membrana plasmática e núcleo foram observadas, reforçando a hipótese de que o composto não induz morte celular por apoptose nem por necrose.

Portanto, o intenso estresse celular exercido por esta neolignana, possivelmente ocasiona a morte celular autofágica.

Complementarmente, os quimioterápicos podem induzir a imunomodulação das células hospedeiras, aumentando a produção de moléculas como citocinas, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis pela defesa contra patógenos intracelulares. Assim, além da ação direta no parasita, os fármacos podem contar com a ativação das células hospedeiras para eliminação da infecção (Loría-Cervera e Andrade-Narvaez, 2020). Neste contexto, considerando a seletividade do composto **PP480** em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*, a influência desta neolignana nos mecanismos de imunomodulação foi estudada através da dosagem de óxido nítrico e de citocinas.

O óxido nítrico promove o controle da infecção de *Leishmania* através da diminuição da atividade metabólica de amastigotas intracelulares, restringindo o crescimento e a sobrevivência dos parasitas (Olekhnovitch e Bousso, 2015). Dentre os produtos naturais explorados na literatura, diversos exibiram uma atividade terapêutica anti-*Leishmania* NO-dependente (Di Giorgio *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2013). Contrariamente, foi observado que o composto **PP480** não induz nenhuma alteração significativa nos níveis desta molécula. Estes resultados corroboram estudos anteriores, nos quais foi constatado que a neolignana desidrodieugenol B e seus derivados, não apresentam mecanismo leishmanicida influenciado pela produção de óxido nítrico na célula hospedeira (Costa-Silva *et al.*, 2015; Amaral *et al.*, 2019).

A primeira linha da defesa imunológica do hospedeiro contra patógenos desconhecidos, é o recrutamento de fagócitos mononucleares, como macrófagos, responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio para eliminação da ameaça. Isto ocorre através da produção de interleucina-12 (IL-12) e, conseqüentemente, de interferon- γ (IFN- γ), citocina conhecida pela ativação das células hospedeiras induzindo a produção destas espécies para eliminação de amastigotas intracelulares. Esta resposta inicial é conhecida como Th1, onde são produzidas citocinas pró-inflamatórias para controle da infecção (Jawed *et al.*, 2019; Saini *et al.*, 2022). No entanto, parasitas de *Leishmania* possuem mecanismos de sobrevivência para se estabelecer no hospedeiro, contornando a resposta imune e modulando a sinalização celular. Desta forma, é estimulada uma resposta do tipo Th2,

com produção das citocinas IL-4, IL-6 e IL-10, com decorrente imunossupressão da resposta Th1 e da atividade leishmanicida. Estudos clínicos com pacientes de leishmaniose visceral ativa, apontam níveis elevados destas citocinas anti-inflamatórias diretamente relacionados a exacerbação da doença (Ibarra-Meneses *et al.*, 2020).

As citocinas desempenham então um papel fundamental na determinação de resistência ou susceptibilidade a leishmaniose, estando presentes ao longo de todo o curso da infecção. Sendo assim, um controle adequado da doença, requer um equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2, uma vez que aumentos acentuados da primeira, podem levar a danos teciduais e da segunda, a exacerbação da doença (No, 2016; Anversa *et al.*, 2018). Anteriormente, estudos com a desidrodieugenol B, demonstram a redução das citocinas IL-6 e IL-10 (Costa-Silva *et al.*, 2015). Efeito semelhante foi observado em um derivado desta neolignana, que apresentou uma atividade imunomodulatória com diminuição, dose-dependente, dos níveis de IL-10 (Amaral *et al.*, 2019). No presente trabalho, após o tratamento com o composto **PP480**, foi constatada a redução de todas as citocinas estudadas, tanto de resposta Th1 (IL-12 e INF- γ), quanto Th2 (IL-4, IL-10). Diante destes resultados, é possível inferir que esta neolignana atua como imunomoduladora completa, com uma resposta anti-inflamatória que pode vir a contribuir para um melhor desfecho da doença. Também é possível sugerir que sua atividade anti-*L. (L.) infantum* seja direta no parasita, independente da ativação da célula hospedeira.

A farmacocinética se caracteriza como o estudo do comportamento de um fármaco no organismo, incorporando processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADMET). Portanto, sua investigação nas etapas iniciais do desenvolvimento de novos quimioterápicos contribui para a compreensão da biodisponibilidade da molécula e é considerada determinante para o êxito de posteriores pesquisas clínicas (Tuntland *et al.*, 2014; Van den Anker *et al.*, 2018). Neste contexto, considerando o potencial leishmanicida promissor e visando futuros estudos de eficácia pré-clínica, foi realizada a investigação do perfil farmacocinético do composto **PP480** em ratos Wistar, após administração em dose única (5 mg/kg), por via intraperitoneal.

A meia-vida plasmática é determinada como o tempo necessário para que a concentração de um fármaco no plasma seja reduzida à metade, refletindo a

frequência na qual o mesmo deve ser administrado (Currie, 2018). No que se refere a este parâmetro, foi possível constatar que animais machos apresentam uma eliminação mais lenta que as fêmeas, com maior permanência do composto **PP480** em seus plasmas. No entanto, a média dos valores é adequada, uma vez que o ideal para um fármaco é apresentar as características necessárias para um esquema posológico de dosagem diária única (Smith *et al.*, 2012). Também é preconizado que os tempos de meia vida plasmática não sejam tão longos a fim de propiciar o desenvolvimento de resistência parasitaria, como no caso da miltefosina, utilizada no tratamento das leishmanioses, que apresenta um $T_{1/2}$ de aproximadamente 126h (Kip *et al.*, 2018; Palić *et al.*, 2022). Em relação a exposição sistêmica e a concentração plasmática máxima, foram obtidos valores abaixo do CE_{50} em amastigotas intracelulares. No entanto, estudos com diferentes doses e vias de administração devem ser suficientes para estimar um regime de administração adequado e prevenir possíveis falhas terapêuticas. Para alguns fármacos, a administração em múltiplas doses, pode levar a ocorrência de acúmulo do mesmo em seu sítio de ação (Scheerans *et al.*, 2015). Os resultados de concentração e tempo máximo, reafirmam a disparidade nas respostas farmacocinéticas dos diferentes sexos, com fêmeas apresentando o dobro da concentração plasmática de **PP480**, em um menor tempo. Fatores intrínsecos como sexo, peso, disfunções metabólicas e polimorfismos genéticos, podem afetar diretamente a exposição sistêmica de um composto no organismo, podendo gerar resultados divergentes entre indivíduos (Tang e Lu, 2009). Entretanto, é possível verificar que em ambos os sexos, o composto **PP480** tem sua concentração máxima atingida em tempos curtos, mas permanece no organismo por tempo suficiente para que seja sugerido um intervalo de dosagem diária para a promoção de sua ação terapêutica.

Em resumo, estes resultados sugerem a neolignana **PP480** como a mais promissora, uma vez que não apresentou toxicidade para as células de mamíferos estudadas e exibiu o maior índice de seletividade em amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. Sua avaliação *in silico* sugere uma alta absorção gastrointestinal, sem similaridades a PAINS e um perfil *drug-likeness* favorável. Desta forma, o composto se enquadra nos critérios estabelecidos pelo DNDi e pode ser considerado um *hit* para leishmaniose visceral. Ademais, através de uma investigação do mecanismo de ação, foi evidenciado que este derivado sintético não causa alteração da permeabilidade da

membrana plasmática de promastigotas, no entanto, ao atravessá-la, induz a despolarização de seu potencial elétrico. No interior do parasita, foi observado um efeito pronunciado nos acidocalcissomos com concomitante extravasamento de cálcio intracelular. Em conjunto, esses efeitos possivelmente induzem um comprometimento mitocondrial e sucessivo colapso da cadeia bioenergética, diminuindo os níveis de ATP e ROS. Também foi constatado que este derivado interfere no perfil proteico, com aumento dos níveis de proteínas totais, possivelmente um mecanismo de sobrevivência parasitaria em resposta ao desequilíbrio metabólico instigado. Entretanto, o composto estudado não acomete diretamente o mecanismo de replicação dos parasitas e não induz danos a integridade do material genético. A nível ultraestrutural, foram confirmados os desarranjos mitocondriais e foi constatada a formação de vacúolos citoplasmáticos. Diante destes resultados, sugere-se que o composto acarrete uma morte celular do tipo autofágica. Adicionalmente, foi possível inferir que esta neolignana tem ação leishmanicida independente da produção de óxido nítrico, com uma resposta anti-inflamatória reduzindo todas as citocinas estudadas. Por fim, este composto apresentou *in vivo* parâmetros farmacocinéticos encorajadores, porém estudos mais detalhados são necessários para comprovar seu potencial para uso terapêutico na clínica da leishmaniose visceral. Portanto, este trabalho reforça a importância de produtos naturais como fonte de novos compostos antiparasitários e sugerem o composto **PP480** como um candidato promissor para futuros estudos pré-clínicos.

6 CONCLUSÕES

1. Dentre os análogos testados, 19 (**CES435, CES436, CES448, CES476, CES509, CES512, PP480, SN27, SN28, SN39, SN52, SN63, HA043, HA075, HA077, HA078, HA171, MA001 e MA002**) apresentaram atividade contra as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*.

2. Os compostos **CES476, CES509, CES512, SN27, SN28, SN52 e HA171** foram os únicos que apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas.

3. A neolignana **PP480** foi a mais potente e seletiva nas condições estabelecidas *in vitro* e, portanto, foi selecionada para estudos detalhados.

4. As análises *in silico* indicam que esta neolignana apresenta alta absorção gastrointestinal, solubilidade moderada, perfil *drug-likeness* favorável e não se assemelha a PAINS. Além disso, sugerem que futuras modificações estruturais devem priorizar a redução de flexibilidade e monitorar parâmetros de lipofilicidade e tamanho.

5. A avaliação de atividade hemolítica indicou que o composto **PP480** não causa hemólise nas concentrações estudadas.

6. A investigação do mecanismo de ação em promastigotas de *L. (L.) infantum*, sugere que nas condições testadas **PP480** não induz a formação de poros na membrana plasmática, no entanto, ao atravessá-la provoca a despolarização de seu potencial elétrico. No citoplasma, o composto provoca alcalinização dos acidocalcissomos com decorrente extravasamento de Ca^{2+} . Na mitocôndria foi possível observar que, possivelmente, devido ao excesso de cálcio, ocorre a despolarização da membrana desta organela e consequente diminuição dos níveis de ATP celular e espécies reativas de oxigênio (ROS). Também foram evidenciadas interferências no perfil proteico com indução de um aumento nos níveis de proteínas totais. Já na avaliação de ciclo celular foi observado um aumento de parasitas na fase subG₀ e consecutiva diminuição da fase G₀/G₁, propondo que o derivado **PP480** não induz alterações no mecanismo de replicação celular. Ademais, foi observado que este derivado não gera a fragmentação do material genético dos parasitas e através de estudos ultraestruturais foram confirmados os desarranjos mitocondriais e verificada a presença de vacúolos no citoplasma. Desta forma, foi possível sugerir que esta neolignana leva os parasitas a uma morte celular do tipo autofágica.

7. O estudo de imunomodulação constatou que a neolignana **PP480** não modifica a produção de óxido nítrico (NO). No entanto, foi observada a redução das citocinas IL-12, INF- γ , IL-4 e IL-10, sugerindo uma resposta imunomoduladora anti-inflamatória.

8. Quanto a determinação do perfil farmacocinético *in vivo*, o composto **PP480** demonstrou permanência no plasma por tempo suficiente para administração de uma dose única diária. Porém, foi observada uma exposição sistêmica abaixo da CE₅₀, sugerindo que estudos mais aprofundados devam ser realizados com diferentes doses e vias de administração.

9. Por fim, os resultados reafirmam o potencial anti-*L. (L.) infantum* de derivados de desidrodieugenol B e apontam o composto **PP480** como o candidato mais promissor para os futuros estudos de eficácia *in vitro*.

APÊNDICE A – VALIDAÇÃO HPLC

Ratos Wistar machos e fêmeas foram obtidos do Laboratório Charles River (L'Arbresle, França) e mantidos em caixas esterilizadas com ambiente controlado, recebendo água e alimento *ad libitum*. Os animais foram adaptados as condições por pelo menos uma semana antes do início dos experimentos. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com a Diretiva Europeia (2010/63/UE) e com a lei portuguesa (Decreto-Lei 113/2013, 2013), além de previamente avaliados pela Autoridade Nacional de Saúde Animal, Fitossanidade e Segurança Alimentar (DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária).

As análises cromatográficas para determinação do perfil farmacocinético do composto **PP480** foram realizadas por HPLC utilizando uma coluna C18 (Purospher Star LiChroCART®, 55 x 4 mm, 3 µm) com eluição gradiente. Desidrodieugenol B (0,8 µg/mL) foi utilizado como padrão interno (PI). Sob as condições cromatográficas estabelecidas, os tempos de retenção dos compostos **PP480** e PI foram de aproximadamente 3,1 e 4,7 min, respectivamente. As seis concentrações de calibração empregadas foram de 0,03, 0,06, 0,5, 1, 3 e 5 µg/mL.

A detecção e quantificação do composto **PP480** nas matrizes de sangue, foi realizada após o processamento das amostras, utilizando uma metodologia de extração líquido-líquido. Para isso, 100 µL de plasma foram enriquecidos com 10 µL de PI (0,8 µg/mL). Posteriormente, 500 µL de hexano foram adicionados e a mistura foi agitada por 1 min em vórtex e então centrifugada a 13400 rpm por 5 min. A fase superior orgânica foi coletada em tubos de vidro e a fase aquosa foi submetida ao procedimento de extração líquido-líquido novamente. Ao final, as amostras orgânicas combinadas foram completamente evaporadas a 60°C sob fluxo de nitrogênio e então reconstituídas em 100 µL de 40:60 ACN:H₂O + ácido ortofosfórico 0,1% (pH 2,08). Por fim, os extratos foram centrifugados a 13400 rpm por 2 min e inseridos em frascos de HPLC para injeção no sistema.

A validação do método foi realizada seguindo as diretrizes para validação de métodos bioanalíticos da Food and Drug Administration e European Medicines Agency (Food and Drug Administration, 2018; European Medicines Agency, 2011). Desta forma, foram adotados os critérios de aceitação dispostos nestes guias para os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite inferior de

quantificação (LLOQ) e estabilidade. Ademais, foram utilizados controles de qualidade de limite inferior de quantificação (QCLLOQ - 0,03 µg/mL), baixo (QC1 - 0,08 µg/mL), médio (QC2 - 2 µg/mL) e alto (QC3 - 5 µg/mL), de acordo com as normas estabelecidas.

A seletividade foi determinada através da análise de interferências cromatográficas nos tempos de retenção do composto **PP480** e PI, em matrizes de plasma branco obtidas de cinco fontes diferentes. Cromatogramas representativos estão dispostos na **Figura 37**, confirmando a ausência de interferentes. Já a linearidade foi estipulada utilizando curvas de calibração preparadas em três dias diferentes, nas faixas de concentração definidas. As curvas de calibração foram construídas utilizando uma regressão linear ponderada $1/x^2$, selecionada por propiciar a menor porcentagem de erro relativo na relação da área do pico (analito/PI) versus concentração nominal (Almeida *et al.*, 2002). As equações de regressão foram representadas por $y = bx + a$, onde x é a concentração nominal do analito e y é a razão entre a área do analito e PI. O LLOQ foi estabelecido como a menor concentração a ser obtida com precisão ($\leq 20\%$) e exatidão ($\pm 20\%$) em 5 amostras diferentes. Para as análises de farmacocinética, concentrações abaixo do LLOQ foram consideradas como 0.

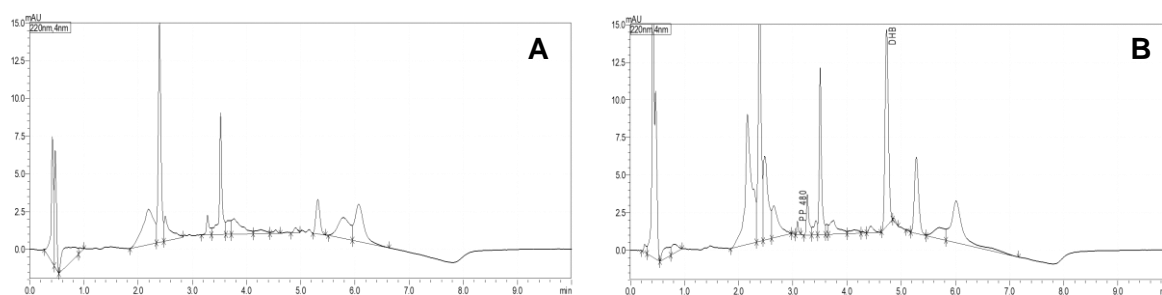


Figura 37 - Cromatogramas de HPLC representativos. **(A)** Plasma de rato branco; **(B)** Plasma de rato enriquecido com **PP480** (0,03 µg/mL - LLOQ) e PI (0,8 µg/mL).

A precisão e exatidão foram definidas pelas porcentagens de coeficiente de variação (CV) e desvio da concentração nominal (BIAS), respectivamente. Estes parâmetros foram verificados interdia em três dias diferente e os critérios de aceitação foram estabelecidos como $\%CV \leq 15$ e $\%BIAS$ de ± 15 . Todas as condições analíticas e os parâmetros de validação estão dispostos na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Condições cromatográficas e de validação para quantificação por HPLC do composto **PP480** em plasma.

Parâmetros	PP480
Fase móvel	A: H ₂ O + ácido ortofosfórico 0,1% (pH 2,08) B: ACN [30% (0 – 1 min); 30 a 65% (1 - 2,5 min); 65% (2,5 - 5 min); 65 a 30% (5 - 7 min); 30% (7 – 10 min)]
Fluxo (mL/min)	1
Temperatura (°C)	25
Comprimento de onda (nm)	220
Volume de injeção (µL)	20
Tempo de corrida (min)	10
Faixa de Calibração (µg/mL)	0,03 - 6
LLOQ (µg/mL)	0,03
Equação de Regressão	y= 0,9249x - 0,0086
Coefficiente de determinação (r²)	0,9991
Precisão interdia (% CV)	≤ 5,0
Exatidão interdia (% BIAS)	- 5,12 a 3,61

ACN: Acetonitrila; LLOQ: limite inferior de quantificação; %BIAS: desvio da concentração nominal; %CV: coeficiente de variação.

A estabilidade foi estabelecida pela comparação de dados antes e após a exposição a diferentes condições, mimetizando o armazenamento e manuseio durante todo processo experimental (**Tabela 8**). Este parâmetro foi determinado em cinco amostras processadas e não processadas dos controles de qualidade QC1 (0,08 µg/mL) e QC3 (5 µg/mL). Resumidamente, as amostras não processadas foram armazenadas a temperatura ambiente por 2h e a 4°C por 6 e 24h. Foi realizado também o congelamento a -20°C destas amostras a longo prazo por 15 e 30 dias, além de três ciclos de congelamento/descongelamento. Já as amostras processadas foram submetidas a duas condições: 2h a temperatura ambiente e 24h a 4°C. Os limites de aceitação da razão entre estabilidade e a concentração do analito na amostra de referência (tempo 0) foram de 85 a 115%.

Tabela 8 – Estabilidade do composto **PP480** em plasma sob condições de manuseio e armazenamento.

Condições	Estabilidade / concentração do analito de referência (%)	
	0,08 µg/mL	5 µg/mL
Amostra Processada		
2h a temperatura ambiente	98,35	100,43
24h a 4°C	99,12	98,84
Amostra Não Processada		
2h a temperatura ambiente	86,54	90,90
6h a 4°C	91,74	95,92
24h a 4°C	87,07	91,65
15 dias a -20°C	85,36	90,53
30 dias a -20°C	92,66	93,24
Congelamento/Descongelação	88,58	97,49

REFERÊNCIAS

Adler-Moore JP, Proffitt RT. Development, Characterization, Efficacy and Mode of Action of Ambisome, A Unilamellar Liposomal Formulation of Amphotericin B. *Journal of Liposome Research*. 1993; 3:429–450.

Akbari M, Oryan A, Hatam G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Trop*. 2017;172: 86-90.

Alavijeh MS, Qaiser MCMZ, Palmer AM. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx*. 2005; 2: 554-571.

Alberts B, *et al*. *Biologia molecular da célula*. 6° ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.

Alcazar W, Alakurtti S, Padrón-Nieves M, Tuononen ML, Rodríguez N, Yli-Kauhalauma J, Ponte-Sucre A. Leishmanicidal Activity of Betulin Derivatives in *Leishmania amazonensis*; Effect on Plasma and Mitochondrial Membrane Potential, and Macrophage Nitric Oxide and Superoxide Production. *Microorganisms*. 2021; 9:320.

Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002; 774(2):215-22.

Alves F, Bilbe G, Blesson S, Goyal V, Monnerat S, Mowbray C, Ouattara GM, Pécoul B, Rijal S, Rode J, Solomos A, Strub-Wourgaft N, Wasunna M, Wells S, Zijlstra EE, Arana B, Alvar J. Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31(4):e00048-18.

Amaral M, Sousa FS, Silva TAC, Junior AJG, Taniwaki NN, Johns DM, Lago JHG, Anderson EA, Tempone AG. A semi-synthetic neolignan derivative from dihydrodieugenol B selectively affects the bioenergetic system of *Leishmania infantum* and inhibits cell division. *Sci Rep*. 2019; 9(1):6114.

Andrade-Neto VV, Cunha-Junior EF, Dos Santos Faioes V, Pereira TM, Silva RL, Leon LL, Torres-Santos EC. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018; 23:967-996.

Anversa L, Tiburcio MGS, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. *Rev Assoc Med Bras*. 2018; 64:281-289.

Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, International Natural Product Sciences Taskforce, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2021; 20(3):200-216.

Aulner N, Danckaert A, Ihm J, Shum D, Shorte SL. Next-generation phenotypic screening in early drug discovery for infectious diseases. *Trends Parasitol.* 2019; 35:559–570.

Azami M, Adermanabadi VR, Khanahmad H, Mohaghegh MA, Zaherinejad E, Aghaei M, Jalali A, Hejazi SH. Immunology and Genetic of *Leishmania infantum*: The Role of Endonuclease G in the Apoptosis. *J Res Med Sci.* 2018; 23: 36.

Baell JB. Feeling Nature's PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS). *J Nat Prod.* 2016; 79:616-628.

Balaña-Fouce R, Pertejo MYP, Domínguez-Asenjo B, Gutiérrez-Corbo C, Reguera RM. Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. *Drug Discov Today.* 2019; 24:1209-1216.

Basmaciyan L, Casanova M. Cell death in *Leishmania* Parasite. 2019; 26:71.

Bekhit AA, El-Agroudy E, Helmy A, Ibrahim TM, Shavandi A, Bekhit AEA. *Leishmania* treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. *Eur J Med Chem.* 2018; 160:229-244.

Benaim G, Paniz-Mondolfi AE, Sordillo EM, Martinez-Sotillo N. Disruption of intracellular calcium homeostasis as a therapeutic target against *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:1-15.

Beutler JA. Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol.* 2009; 86(1): e67.

Brindha J, Balamurali MM, Chanda K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases-Leishmaniasis and Chagas Diseases. *Front Chem.* 2021; 9:622286.

Buck E, Song ZJ, Tschaen D, Dormer PG, Volante RP, Reider PJ. Ullmann diaryl ether synthesis: Rate acceleration by 2,2,6,6-tetramethylheptane-3,5-dione. *Org Lett.* 2002; 4:1623-1626.

Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet.* 2018; 392: 951-970.

Castro Oliveira LG, Brito LM, Moraes Alves MM, Amorim LV, Sobrinho-Júnior EP, Carvalho CE, Franca Rodrigues KA, Arcanjo DD, Graças Lopes Citó AM, Amorim Carvalho FA. *In Vitro* effects of the neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran against *Leishmania amazonensis*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017; 120:52-58.

Centers for Disease Control and Prevention. Parasites. Leishmaniasis. [acesso em 15 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.

Cha Y, Erez T, Reynolds IJ, Kumar D, Ross J, Koytiger G, Kusko R, Zeskind B, Risso S, Kagan E, Papapetropoulos S, Grossman I, Laifenfeld D. Drug repurposing

from the perspective of pharmaceutical companies. *Br. J. Pharmacol.* 2018; 175(2):168-180.

Chang KP, Nacy CA, Pearson RD. Intracellular parasitism of macrophages in leishmaniasis: *in vitro* systems and their applications. *Methods Enzymol.* 1986; 132:603-626.

Chattopadhyay A, Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 416:7-12.

Chicharro C, Granata C, Lozano R, Andreu D, Rivas L. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:2441-2449.

Choi IS, Choi EY, Jin JY, Park HR, Choi JI, Kim SJ. Kaempferol inhibits *P. intermedia* lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide through translational regulation in murine macrophages: critical role of heme oxygenase-1-mediated ROS reduction. *J Periodontol.* 2013; 84:545-555.

Chopra B, Dhingra AK. Natural products: A lead for drug discovery and development. *Phytother Res.* 2021; 35(9):4660-4702.

Cianciulli A, Porro C, Calvello R, Trotta T, Panaro MA. Resistance to apoptosis in *Leishmania infantum*-infected human macrophages: a critical role for anti-apoptotic Bcl-2 protein and cellular IAP1/2. *Clin Exp Med.* 2018; 18(2):251-261.

Clatworthy AE, Romano KP, Hung DT. Whole-organism phenotypic screening for anti-infectives promoting host health. *Nat. Chem. Biol.* 2018; 14:331-341.

Cohen A, Azas N. Challenges and Tools for *In Vitro Leishmania* Exploratory Screening in the Drug Development Process: An Updated Review. *Pathogens.* 2021; 10(12):1608.

Corral MJ, Benito-Peña E, Jiménez-Antón MD, Cuevas L, Moreno-Bondi MC, Alunda JM. Allicin Induces Calcium and Mitochondrial Dysregulation Causing Necrotic Death in *Leishmania*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10:e0004525.

Costa EC, Cassamale TB, Carvalho DB, Bosquiroli LS, Ojeda M, Ximenes TV, Matos MF, Kadri MC, Baroni AC, Arruda CC. Antileishmanial activity and structure-activity relationship of triazolic compounds derived from the neolignans Grandisin, Veraguensin, and Machilin G. *Molecules.* 2016; 21:1-11.

Costa-Silva TA, Grecco SS, Sousa FS, Lago JH, Martins EG, Terrazas CA, Varikuti S, Owens KL, Beverley SM, Satoskar AR, Tempone AG. Immunomodulatory and antileishmanial activity of phenylpropanoid dimers isolated from *Nectandra leucantha*. *J Nat Prod.* 2015; 78:653-57.

Croft SL. *Leishmania* and other intracellular pathogens: selectivity, drug distribution and PK-PD. *Parasitology.* 2018; 145(2):237-247.

Currie GM. Pharmacology, Part 2: Introduction to Pharmacokinetics. *J Nucl Med Technol.* 2018; 46(3):221-230.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017; 7:1-13.

Das A, Jawed JJ, Das MC, Sandhu P, De UC, Dinda B, Akhter Y, Bhattacharjee S. Antileishmanial and immunomodulatory activities of lupeol, a triterpene compound isolated from *Sterculia villosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 50:512-522.

Davis RL. Mechanism of Action and Target Identification: A Matter of Timing in Drug Discovery. *iScience.* 2020; 23(9):101487.

De la Serna JB, Schütz GJ, Eggeling C, Cebecauer M. There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 4:106.

Di Giorgio C, Lamidi M, Delmas F, Balansard G, Ollivier E. Antileishmanial activity of quinovic acid glycosides and cadambine acid isolated from *Nauclea diderrichii*. *Planta Med.* 2006; 72:1396-1402.

Docampo R, Huang G. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. *Cell Calcium.* 2015; 57:194-202.

Docampo R, Moreno SN. Calcium signaling in intracellular protist parasites. *Curr Opin Microbiol.* 2021; 64:33-40.

Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 1995; 310:1005-1012.

Dolai S, Yadav RK, Pal S, Adak S. Overexpression of mitochondrial *Leishmania major* ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative stress-induced programmed cell death and protein damage. *Eukaryot Cell.* 2009; 8:1721-1731.

Don R, Ioset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology.* 2014; 141:140-146.

DrugBank. [acesso em 18 de setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/>.

Duarte ML, Mariano ON, Takakura CF, Everson D, Corbett CE. A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. *Ultrastruct Pathol.* 1992; 16:475-482.

European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation: EMA/275542/2014. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2011. p1-23.

Ferreira DD, Sousa FS, Costa-Silva TA, Reimão JQ, Torrecilhas AC, Johns DM, Sear CE, Honorio KM, Lago JHG, Anderson EA, Tempone AG. Dehydrodieugenol B derivatives as antiparasitic agents: Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019; 176:162-174.

Ferreira TC. Relevância de Ensaios Fenotípicos com Diversas Espécies de *Leishmania* na Descoberta Inicial de Fármacos. [Tese de Doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2019.

Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation: Guidance for industry. *Biopharmaceutics*, 2018. p1–44.

Garcez FR, Garcez WS, Hamerski L, Miguita C H. Phenylpropanoids and other bioactive constituents from *Nectandra megapotamica*. *Quím. Nova*. 2009; 32:407-411.

Garcia FP, Lazarin-Bidóia D, Ueda-Nakamura T, Silva SO, Nakamura CV. Eupomatenoid-5 isolated from leaves of *Piper regnellii* induces apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013:940531.

Garg G, Singh K, Ali V. Proteomic approaches unravel the intricacy of secreted proteins of *Leishmania*: An updated review. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2018; 1866(8):913-923.

Gottlieb OR. Chemosystematics of the lauraceae. *Phytochemistry*. 1972; 11(5):1537-1570.

Grecco SS, Costa-Silva TA, Jerz G, Sousa FS, Alves Conserva GA, Mesquita JT, Galuppo MK, Tempone AG, Neves BJ, Andrade CH, Cunha RL, Uemi M, Sartorelli P, Lago JH. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of dehydrodieugenol isolated from *Nectandra leucantha* (*Lauraceae*) and its methylated derivative against *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*. 2017a; 24:62-67.

Grecco SS, Costa-Silva TA, Jerz G, Sousa FS, Londero VS, Galuppo MK, Lima ML, Neves BJ, Andrade CH, Tempone AG, Lago JHG. Neolignans from leaves of *Nectandra leucantha* (*Lauraceae*) display *in vitro* antitrypanosomal activity via plasma membrane and mitochondrial damages. *Chem Biol Interact*. 2017b; 277:55-61.

Grecco SS, Lorenzi H, Tempone AG, Lago JHG. Update: biological and chemical aspects of *Nectandra* genus (*Lauraceae*). *Tetrahedron: Asymmetry*. 2016; 27:793-810.

Grecco SS, Martins EG, Girola N, Figueiredo CR, Matsuo AL, Soares MG, Bertoldo BC, Sartorelli P, Lago JH. Chemical composition and *in vitro* cytotoxic effects of the essential oil from *Nectandra leucantha* leaves. *Pharmaceutical Biology*. 2015; 53:133-137.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol.* 1990; 144:278-283.

Hailu T, Yimer M, Mulu W, Abera B. Challenges in visceral leishmaniasis control and elimination in the developing countries: A review. *J Vector Borne Dis.* 2016; 53:193-198.

Han Y, Zhang J, Hu CQ, Zhang X, Ma B, Zhang P. *In silico* ADME and Toxicity Prediction of Ceftazidime and Its Impurities. *Front Pharmacol.* 2019; 10:434.

Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011; 162(6):1239-1249.

Ibarra-Meneses AV, Moreno J, Carrillo E. New strategies and biomarkers for the control of visceral leishmaniasis. *Trends in Parasitology.* 2020; 36:29-38.

Jain V, Jain K. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discov Today.* 2018; 23:161-170.

Jawed JJ, Dutta S, Majumdar S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. *Biomed Pharmacother.* 2019; 117:109098.

Jones NG, Catta-Preta CMC, Lima APCA, Mottram JC. Genetically Validated DrugTargets in *Leishmania*: Current Knowledge and Future Prospects. *ACS Infect. Dis.* 2018; 4:467-477.

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, Mowbray CE, Schmatz D, Warner P, Slingsby BT. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov.* 2015; 14:751-758.

Kip AE, Schellens JHM, Beijnen JH, Dorlo TPC. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2018; 57(2):151-176.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *J Biol Chem.* 2009; 284:15496-15504.

Lago JHG, Tempone AG. Natural products as a source of new drugs against *Leishmania*. In: *Drug discovery for leishmaniasis.* Londres: Royal Society of Chemistry; 2018. p179 -198.

Lee SM, Kim MS, Hayat F, Shin D. Recent Advances in the discovery of novel antiprotozoal agents. *Molecules.* 2019; 24:1-45.

Lejay A, Charles AL, Zoll J, Bouitbir J, Thaveau F, Piquard F, Geny B. Skeletal muscle mitochondrial function in peripheral arterial disease: usefulness of muscle biopsy. *Muscle Biopsy.* 2012; 2012:133-154.

Lima ML, Abengózar MA, Nácher-Vázquez M, Martínez-Alcázar MP, Barbas C, Tempone AG, López-González A, Rivas L. Molecular Basis of the Leishmanicidal Activity of the Antidepressant Sertraline as a Drug Repurposing Candidate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62:e01928-18.

Lindoso JAL, Moreira CHV, Cunha MA, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV AIDS (Auckl).* 2018; 10:193-201.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1997; 23:3-25.

Lombardo F, Desai PV, Arimoto R, Desino KE, Fischer H, Keefer CE, Petersson C, Winiwarter S, Broccatelli F. *In silico* absorption, distribution, metabolism, excretion, and pharmacokinetics (ADME-PK): utility and best practices. An industry perspective from the international consortium for innovation through quality in pharmaceutical development. *J Med Chem.* 2017; 60(22):9097-9113.

Loría-Cervera EN, Andrade-Narvaez F. The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. *Acta Trop.* 2020; 207:105456.

Luque-Ortega JR, Rivas L. Characterization of the leishmanicidal activity of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol.* 2010; 618:393-420.

Machado PA, Gomes PS, Midlej V, Coimbra ES, Guedes HLM. PF-429242, a Subtilisin Inhibitor, Is Effective *in vitro* Against *Leishmania infantum*. *Front Microbiol.* 2021; 12:583834.

Macías-Villamizar VE, Cuca-Suárez LE, Coy-Barrera ED. Genus *Nectandra*: "phytochemistry and biological activity". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2015; 14:317-342.

Marsden PD. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1985; 18:187-198.

Martins LF, Mesquita JT, Pinto EG, Costa-Silva TA, Borborema SE, Galisteo Junior AJ, Neves BJ, Andrade CH, Shuhaib ZA, Bennett EL, Black GP, Harper PM, Evans DM, Fituri HS, Leyland JP, Martin C, Roberts TD, Thornhill AJ, Vale SA, Howard-Jones A, Thomas DA, Williams HL, Overman LE, Berlinck RGS, Murphy PJ, Tempone AG. Analogues of marine guanidine alkaloids are *in vitro* effective against *Trypanosoma cruzi* and selectively eliminate *Leishmania (L.) infantum* intracellular amastigotes. *J Nat Prod.* 2016; 79:2202-2210.

Mazire P, Agarwal V, Roy A. Road-map of pre-clinical treatment for Visceral Leishmaniasis. *Drug Dev Res.* 2022; 83(2):317-327.

McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM.* 2014; 107:7-14.

Meade JC. P-type transport ATPases in *Leishmania* and *Trypanosoma*. *Parasite*. 2019; 26:69.

Meanwell NA. Improving drug design: an update on recent applications of efficiency metrics, strategies for replacing problematic elements, and compounds in nontraditional drug space. *Chem Res Toxicol*. 2016; 29:564-616.

Menna-Barreto RFS, Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *BioMed Research International*, 2014; 2014:1-14.

Menna-Barreto RFS. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death and Disease*. 2019; 10:1-93.

Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral. Situação Epidemiológica: Dados. Gráfico e mapas dos casos de Leishmaniose Visceral. [acesso em 11 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/lv-graficos-e-mapas.pdf>.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume 3. Brasília; 2017a.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília; 2017b.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília; 2014.

Monteiro-Neto V, Souza CD, Gonzaga LF, Silveira BC, Sousa NCF, Pontes JP, Santos DM, Martins WC, Pessoa JFV, Carvalho Júnior AR, Almeida VSS, Oliveira NMT, Araújo TS, Maria-Ferreira D, Mendes SJF, Ferro TAF, Fernandes ES. Cuminaldehyde Potentiates the Antimicrobial Actions of Ciprofloxacin Against *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. *PLoS One*. 2020; 15:e0232987.

Morth JP, Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Andersen JP, Vilsen B, Palmgren MG, Nissen P. A structural overview of the plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12:60-70.

Mouri O, Morizot G, Van der Auwera G, Ravel C, Passet M, Chartrel N, Joly I, Thellier M, Jauréguiberry S, Caumes E, Mazier D, Marinach-Patrice C, Buffet P. Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(6): e2841.

Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative

stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem.* 2002; 277:24717-24727.

Müller J, Hemphill A. Drug target identification in protozoan parasites. *Expert Opin Drug Discov.* 2016; 11:815-824.

Nag S, Baidya ATK, Mandal A, Mathew AT, Das B, Devi B, Kumar R. Deep learning tools for advancing drug discovery and development. *3 Biotech.* 2022; 12(5):110.

Neal RA. The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 1968; 62:54-62.

Néris PL, Caldas JP, Rodrigues YK, Amorim FM, Leite JA, Rodrigues-Mascarenhas S, Barbosa-Filho JM, Rodrigues LC, Oliveira MR. Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania (Leishmania) major* associated with immunomodulation *in vitro*. *Exp Parasitol.* 2013; 135:307-313.

Neves AR, Trefzger OS, Barbosa NV, Honorato AM, Carvalho DB, Moslaves IS, Kadri MCT, Yoshida NC, Kato MJ, Arruda CCP, Baroni ACM. Effect of isoxazole derivatives of tetrahydrofuran neolignans on intracellular amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: A structure-activity relationship comparative study with triazole-neolignan-based compounds. *Chem Biol Drug Des.* 2019; 94:2004-2012.

Newcomer VD, Sternberg TH, Wright ET, Reisner RM. Current status of amphotericin B in the treatment of the systemic fungus infections. *J Chronic Dis.* 1959; 9:353-374.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020; 83:770-803.

No JH. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop.* 2016; 155:113-23.

Olekhovitch R, Bousso P. Induction, propagation, and activity of host nitric oxide: lessons from *Leishmania* infection. *Trends Parasitol.* 2015; 31:653-664.

Oliveira LGC, Brito LM, Alves MMM, Amorim LV, Sobrinho-Júnior EP, Carvalho CE, Rodrigues KAF, Arcanjo DD, Lopes Citó AMG, Carvalho FAA. *In vitro* effects of the neolignan 2,3-dihydrobenzofuran against *Leishmania Amazonensis*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017; 120:52-58.

Palić S, Beijnen JH, Dorlo TPC. An update on the clinical pharmacology of miltefosine in the treatment of leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents.* 2022; 59(1): 106459.

Paris C, Loiseau PM, Bories C, Bréard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:852-859.

Pereira MDP, da Silva T, Aguiar ACC, Oliva G, Guido RVC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Uliana SRB, Lopes LMX. Chemical composition, antiprotozoal and cytotoxic activities of indole alkaloids and benzofuran neolignan of *Aristolochia cordigera*. *Planta Med.* 2017; 83:912-920.

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques.* 2011; 50:98-115.

Pinho N, Wiśniewski JR, Dias-Lopes G, Saboia-Vahia L, Bombaça ACS, Mesquita-Rodrigues C, Menna-Barreto R, Cupolillo E, de Jesus JB, Padrón G, Cuervo P. In-depth quantitative proteomics uncovers specie-specific metabolic programs in *Leishmania (Viannia)* species. *Plos Negl Trop Dis.* 2020; 14:e0008509.

Pinto-Martinez AK, Rodriguez-Durán J, Serrano-Martin X, Hernandez-Rodriguez V, Benaim G. Mechanism of Action of Miltefosine on *Leishmania donovani* Involves the Impairment of Acidocalcisome Function and the Activation of the Sphingosine-Dependent Plasma Membrane Ca²⁺ Channel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62:e01614-17.

Pirintsos S, Panagiotopoulos A, Bariotakis M, Daskalakis V, Lionis C, Sourvinos G, Karakasiliotis I, Kampa M, Castanas E. From Traditional Ethnopharmacology to Modern Natural Drug Discovery: A Methodology Discussion and Specific Examples. *Molecules.* 2022; 27(13):4060.

Rajendran M, Dane E, Conley J, Tantama M. Imaging adenosine triphosphate (ATP). *Biol Bull.* 2016; 231:73-84.

Ramakrishnan S, Docampo R. Membrane Proteins in Trypanosomatids Involved in Ca²⁺ Homeostasis and Signaling. *Genes.* 2018; 9:304.

Rea A, Tempone AG, Pinto EG, Mesquita JT, Rodrigues E, Silva LG, Sartorelli P, Lago JH. Soulmamarin isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) induces plasma membrane permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and mitochondrial dysfunction. *Plos Negl Trop Dis.* 2013; 7:e2556.

Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 33:8-13.

Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, Dos Santos CCP, Frézard FJG, da Silva SM. Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. *Biomed Res Int.* 2018; 2018:3296893.

Ruiz-Postigo JÁ, Jain S, Mikhailov A, Maia-Elkhoury AN, Valadas S, Warusavithana S, Osman M, Lin Z, Beshah A, Yajima A, Gasimov E. Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap. *Weekly Epidemiological Record.* 2021; 35:401-419.

Rycker M, Wyllie S, Horn D, Read KD, Gilbert IH. Anti-trypanosomatid drug discovery: progress and challenges. *Nat Rev Microbiol.* 2022.

Saha AK, Mukherjee T, Bhaduri A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1986; 19(3):195-200.

Saini I, Joshi J, Kaur S. Unwelcome prevalence of leishmaniasis with several other infectious diseases. *Int Immunopharmacol.* 2022; 110:109059.

Saudagar P, Dubey VK. Molecular mechanisms of *in vitro* betulin-induced apoptosis of *Leishmania donovani*. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 90(2):354-360.

Scarpelli PH, Pecenin MF, Garcia CRS. Intracellular Ca²⁺ signaling in protozoan parasites: an overview with a focus on mitochondria. *Int J Mol Sci.* 2021; 22:1-12.

Scheerans C, Heinig R, Mueck W. Proposal for defining the relevance of drug accumulation derived from single dose study data for modified release dosage forms. *Biopharm Drug Dispos.* 2015; 36(2):93-103.

Sear EC, Pieper P, Amaral A, Romanelli MM, Costa-Silva TA, Haugland MM, Tate JA, Lago JHG, Tempone AG, Anderson EA. Synthesis and Structure-Activity Relationship of Dehydrodieugenol B Neolignans against *Trypanosoma cruzi*. *ACS Infect Dis.* 2020; 6:2872-2878.

Serrano-Martín X, Garcia-Marchán Y, Fernandez A, Rodriguez N, Rojas H, Visbal G, Benaim G. Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53:1403-1410.

Sharma M, Chauhan K, Shivahare R, Vishwakarma P, Suthar MK, Sharma A, Gupta S, Saxena JK, Lal J, Chandra P, Kumar B, Chauhan PM. Discovery of a new class of natural product-inspired quinazolinone hybrid as potent antileishmanial agents. *J Med Chem.* 2013; 56:4374-4392.

Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015; 6:791.

Smith DA, Allerton C, Kalgutkar AS, van de Waterbeemd H, Walker DK. Pharmacokinetics. In: *Pharmacokinetics and metabolism in drug design.* Alemanha: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2012. p19-40.

Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J Protozool.* 1958; 5:269-73.

Sundar S, Singh B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Ther Targets.* 2018; 22:467-486.

Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol.* 2017; 7:170165.

Swinney DC, Anthony J. How were new medicines discovered?. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10:507-519.

Szakács G, Váradi A, Özvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discovery Today.* 2008; 13:379-393.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto M. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 1986; 93:157-165.

Tang W, Lu AYH. Drug metabolism and pharmacokinetics in support of drug design. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(19):2170-83.

Tempone AG, Melhem MSC, Prado FO, Motoie G, Hiramoto RH, Antoniazzi MM, Haddad CFB, Jared C. Amphibian secretins for drug discovery studies: a search for a new antiparasitic and antifungal compounds. *Letters in Drug Design & Discovery.* 2007; 4:67-73.

Teponno RB, Kusari S, Spitteller M. Recent advances in research on lignans and neolignans. *Nat Prod Rep.* 2016; 33:1044-1092.

The Plant List. Lauraceae. [acesso em 13 de agosto de 2022]. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lauraceae/>.

Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, Dzobo K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6):1578.

Tiwari N, Gedda MR, Tiwari VK, Singh SP, Singh RK. Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem.* 2018; 18:26-41.

Tuntland T, Ethell B, Kosaka T, Blasco F, Zang RX, Jain M, Gould T, Hoffmaster K. Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery and development at Novartis Institute of Biomedical Research. *Front Pharmacol.* 2014; 5:174.

UFRGS. Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. *Nectandra leucantha*. [acesso em 11 de março de 2020]. Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4384.

Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology.* 2018; 145:464-480.

Unger C, Damenz W, Fleer EA, Kim DJ, Breiser A, Hilgard P, Engel J, Nagel G, Eibl H. Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*. *Acta Oncol.* 1989; 28:213-217.

Valero NNH, Uriarte M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitol Res.* 2020; 119(2):365-384.

Van den Anker J, Reed MD, Allegaert K, Kearns GL. Developmental Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J Clin Pharmacol.* 2018; 58 Suppl 10:S10-S25.

Van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis: Recent advances in diagnostics and treatment regimens. *Infect Dis Clin North Am.* 2019; 33:79-99.

Van Oosten LN, Klein CD. Machine Learning in Mass Spectrometry: A MALDI-TOF MS Approach to Phenotypic Antibacterial Screening. *J Med Chem.* 2020; 63(16):8849-8856.

Varela MT, Fernandes JPS. Natural Products: Key Prototypes to Drug Discovery Against Neglected Diseases Caused by Trypanosomatids. *Curr Med Chem.* 2020; 27(13):2133-2146.

Vázquez K, Paulino M, Salas CO, Zarate-Ramos JJ, Vera B, Rivera G. Trypanothione Reductase: A Target for the Development of Anti- *Trypanosoma cruzi* Drugs. *Mini Rev Med Chem.* 2017; 17(11):939-946.

Venkatesh M, Barathi VA, Goh ETL, Anggara R, Fazil MHUT, Ng AJY, Harini S, Aung TT, Fox SJ, Liu S, Yang L, Barkham TMS, Loh XJ, Verma NK, Beuerman RW, Lakshminarayanan R. Antimicrobial activity and cell selectivity of synthetic and biosynthetic cationic polymers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61:e469-417.

Vincent F, Loria PM, Weston AD, Steppan CM, Doyonnas R, Wang YM, Rockwell KL, Peakman MC. Hit Triage and Validation in Phenotypic Screening: Considerations and Strategies. *Cell Chem Biol.* 2020; 27(11):1332-1346.

World Health Organization. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization, 2017.

World Health Organization. WHO guideline for the treatment of visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in East Africa and South-East Asia. Geneva: World Health Organization, 2022.

Wulsten IF, Costa-Silva TA, Mesquita JT, Lima ML, Galuppo MK, Taniwaki NN, Borborema SET, Costa FB, Schmidt TJ, Tempone AG. Investigation of the anti-*Leishmania (Leishmania) infantum* activity of some natural sesquiterpene lactones. *Molecules.* 2017; 22:685.

Yow MD, Yow EM. Kanamycin, neomycin and paromomycin. *Pediatr Clin North Am.* 1961; 8:1043-1056.

Zanon MMF, Goldenberg R, Moraes PLR. The genus *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) in Paraná State, Brazil. *Acta Botanica Brasilica*. 2009; 23:22-35.

Zhang L, Song J, Kong L, Yuan T, Li W, Zhang W, Hou B, Lu Y, Du G. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. *Pharmacol Ther*. 2020; 216:107686.