



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTELA MARIANA GUIMARÃES LOURENÇO**

**SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE  
ANÁLOGOS FLAVONOÍDICOS INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASE  
PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Campo Grande – MS

2024

**ESTELA MARIANA GUIMARÃES LOURENÇO**

**SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE  
ANÁLOGOS FLAVONOÍDICOS INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASE  
PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Dênis Pires de Lima

Coorientadores: Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carla Cardozo Pinto de Arruda

Campo Grande – MS

2024

**ESTELA MARIANA GUIMARÃES LOURENÇO**

**SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE  
ANÁLOGOS FLAVONOÍDICOS INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASE  
PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas.

---

Presidente: Prof. Dênis Pires de Lima, Dr. – Orientador, UFMS

---

Examinador Interno: Prof. Everton do Nascimento Alencar, Dr., UFMS

---

Examinadora Interna: Prof<sup>a</sup>. Thalita Bachelli Riul, Dr<sup>a</sup>, UFMS

---

Examinador Externo: Prof. Alisson Meza Novais, Dr., UFAM

---

Examinador Externo: Prof. Lucas Bleicher, Dr., UFMG

Campo Grande – MS

2024

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mariza Lourenço e João Maria Lourenço, pelo apoio incondicional, carinho, conforto e total compreensão dos meus desejos e objetivos. Aos meus irmãos, João Vitor Lourenço e Gabriela Lourenço, pela amizade e por me fazerem forte. À Ivonete Lima pelo carinho que demonstra todos os dias. À minha família, não apenas agradeço, como oferto e dedico este trabalho.

Ao Prof. Dr. Dênis Pires de Lima por ter me recebido carinhosamente em seu laboratório e, desde então, ter me ensinado e orientado com toda sua dedicação. Agradeço também pelo apoio, confiança e compreensão que foram essenciais durante minha estadia em Campo Grande, pela generosidade de me apresentar à caminhos acadêmicos futuros e, acima de tudo, pela grande amizade em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa por todo apoio, por sempre apostar em mim, por todos os convites nos mais diversos projetos de pesquisa e pelo tempo investido para minha formação como pesquisadora durante todo o mestrado e doutorado. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Arruda pela amizade, pelas conversas e conselhos, por acreditar no projeto, por todas as correções e sugestões de texto, por me receber em seu laboratório e pelo incentivo contínuo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Alda Teixeira pela confiança, ensinamentos, apoio e colaboração nos ensaios de citometria de fluxo. Ao Prof. Dr. Wagner Júdice e Me. Juliana Di Lório pela realização dos testes de inibição enzimática *in vitro* e pela colaboração em projetos complementares. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mônica Kadri e Me. Illuska Bonfá pela realização do ensaio de determinação da concentração de óxido nítrico. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Renata Trentin e Me. Melquesedeque Monteiro pela colaboração nos testes de citotoxicidade. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Silvana Langassner por todos os ensinamentos. Ao Prof. Dr. Marco Utrera, Prof. Dr. Adilson Beatriz, Prof. Dr. Jean Pierre Oses, Prof. Dr. Jamal Rafique e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Micheletti pelas ideias, sugestões e fornecimento de reagentes e materiais.

À Dr<sup>a</sup>. Adriana Guercio e Me. Maria Paula Fialho pela colaboração na escrita do protocolo de projeto enviado à CEUA, pela supervisão durante o estudo e pelo curso de Boas Práticas em Experimentação Animal ministrado. Aos demais membros da equipe do Biotério Central (UFMS) pelo cuidado e fornecimento de animais para o estudo.

À Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Petrone e Dr<sup>a</sup>. Luciana Ravaglia pela ajuda e disposição para realização das análises de RMN de alta resolução.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Rafaela Salgado pelo apoio, paciência, recepção no estágio realizado na Universidade Federal de Minas Gerais e confiança para o início de projetos futuros. À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jordana dos Reis e Felipe Clarindo pela colaboração na realização dos testes antivirais. Ao Prof. Dr. Ricardo José Alves e a Dr<sup>ª</sup>. Rosângela Pereira por toda atenção e generosidade durante meu processo de mudança para realização do estágio.

Ao Laboratório de Síntese e Transformação de Moléculas Orgânicas (SINTMOL - UFMS), o LP4, por todos os ensinamentos durante o período de doutorado. À Rosane Cezar, Felipe Bley, Igor Villanova, William Corrêa, Giovanna Azevedo, Cassio Morais, Richard Morais, Martinho de Souza, Climei Rodrigues, Nilson Fernandes, Manuella Salustino e Lyvia de Moura pelas conversas, brincadeiras, amizade e todo o suporte durante os experimentos. À Michell Lôpo pelo auxílio na aquisição de solventes e materiais. À Jéssica dos Santos, Maria Eduarda Cardoso e Jonas Rodrigues pela confiança, apoio e dedicação em todas as etapas do projeto.

Ao Laboratório de Parasitologia Humana (UFMS) pelo papel essencial ao longo dos testes biológicos. Em especial, à Amarith das Neves e Fernanda da Silva pela ajuda nos cuidados aos animais, colaboração nos experimentos mais longos e amizade sincera que tornou tudo mais fácil.

Ao Laboratório de Modelagem Molecular e Planejamento de Fármacos (UFMG) por todo o acolhimento. À Viviane Santos, Luiza Barreto, Lucas Diniz, Beatriz Murta, Júlia Andrade, Lucas Vilar, Talita Bernardes, Maria Claudia, Ana Maria, Maria Fernanda e Débora pelas longas conversas, conselhos, ensinamentos, amizade e recepção.

À Ana Catarina Melo, Paulo Henrique, Rita Yanka, Letícia Gondin, Philip Rudland, Fernanda Santos, Ariane Teixeira, Samara Alves, Giovanna Galvão, Pedro Ivo, Luiza Abrantes, Thais Lins, Teresa Carvalho, Ysla Kallena, Andreza Geovana, Arthur Venâncio e Elton Viana. Todos, independente do lugar, me trouxeram conforto e confiança nos momentos em que mais precisei.

Ao Instituto de Química (INQUI - UFMS), Instituto de Biociências (INBIO - UFMS), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN – UFMS) e Instituto de Ciências Biológicas (ICB – UFMG) pelo acesso aos equipamentos multiusuário e treinamentos de capacitação. Aos técnicos e demais servidores por tornarem possível a utilização de toda a estrutura disponível para pesquisa.

À CAPES, FUNDECT-MS e Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGFARM – UFMS) pelo auxílio financeiro fornecido.

*Simplicity is the ultimate sophistication*  
(Leonardo da Vinci)

## RESUMO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) abrangem um grupo diverso e extenso de doenças infecciosas que podem ser causadas por vários agentes etiológicos. Em geral, as DTNs atingem particularmente continentes tropicais como África, Ásia e Américas e os maiores números epidemiológicos estão associados à vulnerabilidade social. Estima-se que esse grupo de doenças representa risco para aproximadamente 2 bilhões de pessoas em todo mundo, resultando em consequências significativas à saúde, economia. Dentre as DTNs, os números epidemiológicos das leishmanioses são particularmente alarmantes no Brasil. Esse grupo de doenças pode ser causado por diversas espécies do parasito *Leishmania* que são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de insetos flebotomíneos. Tal forma de transmissão agrava ainda mais o controle desse grupo de doenças no Brasil, uma vez que o flebotomíneo vetor é considerado endêmico em todas as regiões do país. Mesmo sendo considerada um grave problema público de saúde, o combate às leishmanioses ainda sofre com as consequências de um esquema terapêutico antigo, caro e capaz de gerar vários efeitos adversos. Nesse contexto, diferentes ferramentas de descobrimento de fármacos vêm sendo discutidas para permitir a busca por novos protótipos eficientes e de baixo custo. Dentre elas, o uso de compostos multialvo e inibidores de fatores de virulência do parasito se destacam. Os flavonoides representam uma grande fonte de compostos bioativos com essas características, contudo os baixos rendimentos de isolamento desses compostos são obstáculos para sua utilização clínica. O presente estudo teve como objetivo a síntese de análogos de flavonoides com potencial antileishmania através de métodos simples, versáteis e de baixo custo. Os compostos obtidos foram submetidos à teste de inibição enzimática frente à diferentes isoformas de cisteíno proteases de *Leishmania*. Experimentos conduzidos *in vitro* demonstraram uma relação entre a inibição enzimática e a destruição das formas amastigotas intracelulares do parasito através do aumento da produção de óxido nítrico. Adicionalmente, estudos *in silico* permitiram a exploração de possíveis modos de interação entre os compostos e a enzima, auxiliando na elaboração de uma relação estrutura-atividade. Ensaio de citometria de fluxo demonstraram também uma despolarização da membrana mitocondrial de *Leishmania* após 48 h de tratamento com os compostos, confirmando a característica multialvo dos derivados de flavonoide. As moléculas foram ainda submetidas à testes de citotoxicidade que demonstraram altos  $CC_{50}$  e, conseqüentemente, relevantes índices de seletividade. Estes resultados são relevantes para a validação das cisteíno proteases como um alvo de combate ao parasito, além de permitirem uma maior compreensão sobre o potencial antileishmania de análogos de flavonoides.

**Palavras-chave:** Síntese orgânica, flavonoides, leishmaniose, cisteíno proteases.

## ABSTRACT

Neglected tropical diseases (NTDs) encompass a diverse and extensive group of infectious diseases that can be caused by several etiological agents. NTDs particularly affect tropical continents such as Africa, Asia, and the Americas, and the most relevant epidemiological numbers are associated with social vulnerability. This group of diseases is estimated to represent a risk to approximately two billion people worldwide, with significant consequences for health, the economy. Among NTDs, the epidemiological numbers of leishmaniasis are particularly alarming in Brazil. This group of diseases can be caused by numerous species of the *Leishmania* parasite that are transmitted by the bite of infected females of phlebotomine sand flies. This form of transmission further aggravates the control of this group of diseases in Brazil, since sand flies are endemic in all regions of the country. Although considered a serious public health problem, the fight against leishmaniasis still suffers from the consequences of an old and expensive therapeutic treatment that cause several side effects. In this context, different drug discovery tools have been explored to allow the search for new efficient and low-cost prototypes. Among them, the use of multitarget compounds and inhibitors of parasite virulence factors stand out. Flavonoids represent a great source of bioactive compounds with these features; however, the low isolation yields of these compounds are obstacles for their clinical use. The present study aimed to synthesize flavonoid analogues with antileishmanial potential using simple, versatile, and low-cost methods. The compounds obtained were subjected to enzymatic inhibition tests against different isoforms of *Leishmania* cysteine proteases. *In vitro* assays demonstrated a relationship between enzymatic inhibition and the combat against parasite amastigotes by increasing nitric oxide production. Additionally, *in silico* studies allowed us to explore possible modes of interaction between the compounds and the enzyme, assisting the elaboration of a structure-activity relationship. Flow cytometry assays also demonstrated a depolarization of the *Leishmania* mitochondrial membrane after 48 h of treatment with the compounds, confirming the multitarget characteristic of the flavonoid derivatives. The molecules were also subjected to cytotoxicity tests that demonstrated a high CC<sub>50</sub> and, consequently, a relevant selectivity index. The results findings relevant for the validation of cysteine proteases as a target to combat the parasite, in addition to allowing a greater understanding of the antileishmanial potential of flavonoid analogues.

**Keywords:** Organic synthesis, flavonoids, leishmaniasis, cysteine proteases.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Porcentagem de entidades químicas aprovadas pelo FDA entre 2000-2011 divididas pela doença alvo. Fonte: Adaptado de Goupil; Mckerrow (2014) .....	27
<b>Figura 2:</b> Número de casos registrados de leishmanioses no Brasil entre 2001-2021. Fonte: Adaptado de OPAS (2022).....	32
<b>Figura 3:</b> Fórmula estrutural proposta para íons 364 Da e 365 Da identificados por ESI (-)-MS em soluções aquosas de Glucantime® e Pentostam®, respectivamente. Fonte: Adaptado de Frézard; Demicheli; Ribeiro (2009) .....	34
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do antibiótico polieno anfotericina B. Fonte: Autoria própria .....	36
<b>Figura 5:</b> Proposta de interação entre a AmB e os esteróis presentes na membrana celular. Fonte: Chattopadhyay; Jafurulla (2011) .....	36
<b>Figura 6:</b> Estrutura química da pentamidina. Fonte: Autoria própria .....	37
<b>Figura 7:</b> Estrutura química da miltefosina. Fonte: Autoria própria .....	38
<b>Figura 8:</b> Estrutura química da paramomicina. Fonte: Autoria própria .....	40
<b>Figura 9:</b> Ciclo de vida das espécies patogênicas do gênero Leishmania. Fonte: Autoria própria.....	43
<b>Figura 10:</b> Distribuição por classes de novas entidades moleculares aprovadas pela FDA de 2015 a 2017. Fonte: Adaptado de Ramsay et al. (2018).....	45
<b>Figura 11:</b> Estrutura química do núcleo flavilium. Fonte: (Lourenço et al., 2023) .....	47
<b>Figura 12:</b> Núcleo básico das subclasses de flavonoides. Fonte: Adaptado de De rijke et al. (2006).....	48
<b>Figura 13:</b> Estrutura química básica dos flavonóis. Fonte: Autoria própria .....	50
<b>Figura 14:</b> Interação de LUMO (E) e HOMO (NU) com diferentes energias e formação de orbitais moleculares $\sigma$ e $\sigma^*$ . Fonte: Adaptado de J. P. Clayden; N. Greeves; S. Warren (2012) .....	53
<b>Figura 15:</b> Diagramas de orbitais moleculares de Br e alcenos (A e C, respectivamente) e suas representações moleculares (B e D, respectivamente). Fonte: Adaptado de J. P. Clayden; N. Greeves; S. Warren (2012).....	54
<b>Figura 16:</b> Estrutura química básica das chalconas. Fonte: Autoria própria.....	61

<b>Figura 17:</b> Deslocalização eletrônica do ânion enolato (A) e formação do íon enolato através das formas tautoméricas ceto e enol do composto acetaldeído em meio alcalino. Fonte: Adaptado de J. P. Clayden; n. Greeves; s. Warren (2012).....	61
<b>Figura 18:</b> Formação de íon de uma cetona em meio ácido. Fonte: Adaptado de (J. P. Clayden; N. Greeves; S. Warren, 2012) .....	62
<b>Figura 19:</b> Primeira etapa de reação CSC (A), seu complexo (B) e a deslocalização eletrônica do íon enolato no meio reacional (C). Fonte: Adaptado de Enchev; Mehandzhiyski (2017); J. P. Clayden; N. Greeves; S. Warren (2012).....	63
<b>Figura 20:</b> Etapas reacionais 2 e 3 (A) e configurações Z e E das chalconas (B e C, respectivamente). Fonte: adaptado de Enchev; Mehandzhiyski (2017); Gomes et al. (2017) .....	64

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> O mecanismo proposto para o rearranjo de Baker-Venkataraman (1 → 6). Fonte: Adaptado de Ameen; Snape (2015).....	51
<b>Esquema 2:</b> Esquema de retróssíntese para obtenção de flavonóis com base no rearranjo de Baker-Venkataraman. Fonte: Adaptado de Fougerousse; Gonzalez; Brouillard (2000) .....	52
<b>Esquema 3:</b> Síntese de flavonóis através da metodologia de Karl Von Auwers. Fonte: Adaptado de Kshatriya; Jejurkar; Saha (2018).....	52
<b>Esquema 4:</b> Mecanismo reacional da metodologia para obtenção de flavonóis de Karl von Auwers. Fonte: Adaptado de Kshatriya; Jejurkar; Saha (2018).....	55
<b>Esquema 5:</b> Síntese de flavonóis através da metodologia de Algar-Flynn-Oyamada. Fonte: Adaptado de Oyamada (1935).....	56
<b>Esquema 6:</b> Mecanismos propostos para obtenção de derivados de flavonol através da reação AFO. Fonte: Adaptado de Bhattacharyya; Hatua (2014).....	57
<b>Esquema 7:</b> Formação de auronas através da reação de Algar-Flynn-Oyamada. Fonte: Adaptado de Bhattacharyya; Hatua (2014) .....	59

## LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
OMS	Organização Mundial de Saúde
ODM	Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
CP	Cisteíno proteases
CPB	Cisteíno protease B
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
USAID	Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional
AOD	Assistência Oficial ao Desenvolvimento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
UBS	Unidades Básicas de Saúde
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
LC	Leishmaniose Cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
AmB	Anfotericina B
FGI	Interconversão de Grupos Funcionais
FGA	Adição de Grupos Funcionais
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
Síntese AFO	Síntese de Algar-Flynn-Oyamada
DFT	Teoria Do Funcional Da Densidade
CSC	Condensação de Claisen-Schmidt

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL .....	15
2	OBJETIVOS .....	21
2.1	Objetivos gerais .....	21
2.2	Objetivos específicos .....	21
	CAPÍTULO I: Análise do contexto envolvido no aumento dos números epidemiológicos das leishmanioses e suas alternativas de tratamento .....	22
	REUMO .....	23
	ABSTRACT .....	24
1	O cenário preocupante das doenças tropicais negligenciadas .....	25
2	Um grupo de doenças duplamente negligenciado .....	28
3	A população brasileira é fortemente atingida pelas DTNs .....	30
4	As leishmanioses .....	32
5	O atual tratamento contra as leishmanioses .....	34
5.1	Os antimoniais pentavalentes .....	34
5.2	Anfotericina B .....	35
5.3	Pentamidina .....	37
5.4	Miltefosina .....	38
5.5	Paromomicina .....	39
6	A indústria farmacêutica e a descoberta de fármacos antileishmania .....	40
7	A complexidade das leishmanioses e o tratamento multialvo .....	42
8	A fitoquímica como fonte de novos compostos multialvo .....	45
8.1	Flavonoides .....	47
9	A síntese de análogos flavonoídicos como novos agentes antileishmania .....	49
9.1	Rearranjo de Baker-Venkataraman e a obtenção de compostos <i>flavonol-like</i> .....	50
9.2	A metodologia sintética de Karl von Auwers .....	52
9.3	A síntese de flavonóis através da metodologia de Algar-Flynn-Oyamada (AFO) .....	55
10	Escolha de um método de síntese .....	59
11	Síntese de chalconas através da condensação de Claisen-Schmidt .....	60
	REFERÊNCIAS .....	65
	CAPÍTULO II: Descoberta e síntese de novos análogos flavonoidicos inibidores de cisteíno proteases: um avanço para a obtenção de potenciais protótipos voltados ao tratamento de leishmaniose .....	80
	RESUMO .....	81
	ABSTRACT .....	82

Artigo publicado no periódico <i>Microorganisms</i> .....	83
CAPÍTULO III: Validação das cisteíno proteases como um alvo de combate à forma amastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> e investigação de outros potenciais mecanismos de ação por trás da atividade antileishmania dos análogos sintéticos de flavonoides....	84
RESUMO .....	85
ABSTRACT .....	86
Artigo publicado no periódico <i>ACS Infectious Diseases</i> .....	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS: Conclusões e Perspectivas .....	88
CONCLUSÕES .....	89
PERSPECTIVAS .....	90
REFERÊNCIAS .....	92
ANEXO 1 .....	95
Certificado de aprovação de projeto pela Comissão De Ética No Uso De Animais/CEUA Da Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul/UFMS .....	96
ANEXO 2 .....	98
Material Suplementar do artigo publicado no periódico <i>Microorganisms</i> .....	98
ANEXO 3 .....	99
Material Suplementar do artigo publicado no periódico <i>ACS Infectious Diseases</i> ...	99
APÊNDICE .....	100
Outros projetos desenvolvidos durante o período de doutorado (2020-2024) .....	100
a) Modelagem molecular como ferramenta para descoberta e otimização de protótipos;.....	100
b) Uso da citometria de fluxo para investigar possíveis mecanismos de ação de agentes antiparasitários;.....	103
c) Identificação de novos protótipos para o tratamento da infecção por COVID-19.....	104

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) abrangem um grupo diverso e extenso de doenças infecciosas que atingem particularmente continentes tropicais como África, Ásia e Américas (Ferreira; De Moraes; Andricopulo, 2022). Por se tratar de um grupo heterogêneo de doenças marcadas por diferentes manifestações clínicas, o número de agentes etiológicos é alto. Parasitas, bactérias, fungos, ectoparasitas ou vírus podem ser causadores das DTNs. Como resultado, o número de pessoas infectadas ou sob risco de infecção é alarmante, o que torna as DTNs um preocupante problema de saúde pública (Borlase et al., 2022). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as DTNs representam risco para aproximadamente 2 bilhões de pessoas em todo mundo, resultando em consequências significativas à saúde, economia e âmbito social (Engels; Zhou, 2020; Warusavithana et al., 2022). Apesar da gravidade das DTNs ser reconhecida, a crescente prevalência e incidência dessas doenças demonstram que seu combate não é totalmente eficaz (Toor et al., 2021). Por isso, diversas iniciativas e objetivos internacionais foram criados visando a elaboração de novas estratégias para o combate desse grupo de doenças.

A importância do combate às DTNs foi inicialmente exposta pelas Nações Unidas em 2000 através da elaboração dos 8 Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) (Vanderslott, 2019). Os ODMs visavam principalmente o combate às consequências causadas pela pobreza extrema e influenciaram a criação de diversas ações como a organização “*Drugs for Neglected Diseases Initiative*” (Álvarez-Rodríguez et al., 2022). Contudo, os avanços não significativos nos anos posteriores incentivaram a adequação das metas e a criação dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). As ODS surgiram como um plano complexo e multidisciplinar para o desenvolvimento humano até o ano de 2030. Especificamente, a ODS 3.3 representa o resultado da expansão dos ODMs ao acrescentar o combate de doenças tropicais negligenciadas como um dos principais objetivos para o desenvolvimento sustentável (Fitzpatrick; Engels, 2015; Vanderslott, 2019). Considerando os desafios resultantes da pandemia de COVID-19, a OMS divulgou um novo roteiro de pontos essenciais para o combate das DTNs em 2020. Este roteiro teve como proposta demonstrar as necessidades atuais e direcionar os estudos entre os anos de 2021-2030 (Brindha; Balamurali; Chanda, 2021). As metas descritas reforçam a intercorrelação entre os ODS e incentivam o desenvolvimento de soluções multidimensionais que influenciem positivamente toda a agenda de desenvolvimento sustentável (WHO, 2020).

Dentre as DTNs, os números epidemiológicos das leishmanioses são particularmente alarmantes no Brasil. As leishmanioses formam um grupo de doenças infectoparasitárias vetoriais de amplo espectro marcadas por diferentes formas clínicas. Os pacientes acometidos por essas doenças podem apresentar desde lesões cutâneas com tendência à ulceração (leishmaniose cutânea) até o acometimento de órgãos como fígado, baço e medula óssea (leishmaniose visceral) (Burza; Croft; Boelaert, 2018). A diversidade de sinais e sintomas das leishmanioses comprovam a grande quantidade de espécies do gênero *Leishmania* com potencial patogênico. Todas as espécies do parasita são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de insetos flebotômíneos. Tal forma de transmissão agrava ainda mais o controle desse grupo de doenças no Brasil, uma vez que o flebotômíneo é considerado endêmico em todas as regiões do país (Andrade-Filho et al., 2017). Esse fator, atrelado à falta de políticas públicas eficientes, faz com que o Brasil faça parte do grupo de países responsável por 90% de todos os casos mundialmente registrados de leishmanioses. Especificamente, a leishmaniose cutânea se destaca como a forma clínica mais prevalente no Brasil com casos registrados em todos os Estados (Anversa et al., 2018). A representatividade do país no contexto desse grupo de DTNs não é recente. Entre os anos de 2001 e 2019, a redução da leishmaniose cutânea não foi significativa e, apesar de um intervalo de quase 20 anos, 3,2% dos Estados ainda apresentam incidência crescente de casos e 72,5% não demonstraram alteração (Portella; Kraenkel, 2021). Sendo assim, estudos que visem o combate e tratamento contra as leishmanioses considerando as particularidades da população de um país com tamanha incidência podem representar grande impacto para o desenvolvimento sustentável e a redução dessas DTNs como prevê o ODS 3.3.

O delineamento da pesquisa voltada para a descoberta e desenvolvimento de um novo protótipo depende da análise de uma série de fatores desde a patologia da doença até as características socioeconômicas das populações mais afetadas. Considerando as leishmanioses, o atual tratamento contra essas doenças se destaca como um fator crucial e determinante para aumento do número de casos graves registrados. Os principais medicamentos utilizados na prática clínica em escala global são o antimoniato de *N*-metil glucamina, a anfotericina B na formulação lipossomal, a pentamidina, a paromomicina e a miltefosina (Santiago; Pita; Guimarães, 2021). Apesar das diferenças entre estruturas químicas e mecanismos de ação, esses fármacos apresentam desvantagens preocupantes em comum, que limitam a adesão farmacológica dos pacientes. Dentre os efeitos adversos é possível destacar: dor nas articulações, náuseas, vômitos, dores musculares, febre,



diminuição do apetite, distúrbios cardiorrespiratórios e alterações da função hepática. Além disso, o tratamento se dá por via endovenosa ou intramuscular, gerando dor ao paciente e exigindo a administração periódica em ambiente hospitalar (Oliveira-Ribeiro et al., 2021). O tratamento de um paciente acometido por leishmaniose se torna oneroso. Os fármacos são considerados de alto custo e, atrelado à terapia, o sistema público de saúde precisa custear a administração dos medicamentos em hospital e a assistência dada àqueles que apresentam efeitos adversos durante o tratamento. Embora as desvantagens sejam relevantes, o antimoniato de *N*-metil-glucamina, considerando o fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, é utilizado há mais de 50 anos (Oliveira-Ribeiro et al., 2021; Rath et al., 2003). Isso demonstra que os pacientes e o sistema público de saúde não possuem alternativas mais vantajosas durante esse longo período. Como resultado, a descontinuidade do tratamento é significativa dado aos fatores atrelados à terapia e a oferta dos medicamentos a todos os pacientes é prejudicada pelos altos custos envolvidos.

Esses fatos são incompatíveis com a realidade socioeconômica das populações mais afetadas pelas leishmanioses e dificultam de modo alarmante o tratamento e combate dessas doenças. A maior porcentagem de casos de leishmanioses ocorre em países em desenvolvimento, atingindo os segmentos mais pobres da população global. Nas áreas endêmicas, o aumento do risco de infecção é dado por condições precárias de moradia, falta de saneamento ambiental, alimentação não adequada e pouco acesso a programas e medidas de proteção individual (Weld et al., 2022). Esse cenário é responsável por um ciclo de reinfecção que se inicia pelo risco de contato da população com flebotomíneos infectados e se encerra com a maior quantidade de pacientes acometidos pelas doenças com assistência precária e tratamento por vezes descontinuado. A compreensão desses aspectos demonstra que o combate das leishmanioses até 2030, como prevê a ODS 3.3, depende da descoberta de protótipos eficazes, de baixo custo e que permitam a administração por vias alternativas e mais convenientes.

Sabendo-se da problemática que envolve a atual terapia contra as leishmanioses, é necessário a análise de estratégias que visem direcionar a descoberta e desenvolvimento de um novo protótipo. Os estudos para descoberta de moléculas com potencial antileishmania são principalmente baseados em abordagens fenotípicas ou em alvos farmacológicos. A principal distinção entre elas é o conhecimento prévio acerca de um determinado mecanismo de ação. A abordagem fenotípica consiste no desenvolvimento de um fármaco sem conhecimento prévio sobre seu mecanismo definido ou ação contra a

doença. Em contrapartida, pesquisas baseadas em alvo farmacológico são marcadas pelas investigações de um dado mecanismo de ação como ponto inicial para o estudo aprofundado de uma classe de moléculas. Com o avanço das pesquisas de biologia molecular e a situação emergencial das leishmanioses, a abordagem baseada em alvos farmacológicos tem sido a ferramenta majoritária nas últimas três décadas (Brindha; Balamurali; Chanda, 2021). Contudo, em meio a grande quantidade de alvos contra os parasitos do gênero *Leishmania*, diversos protótipos não reproduzem sua atividade enzimática quando submetidos a testes *in vitro* e/ou *in vivo* mais específicos. Por isso, é baixo o número de protótipos antileishmania que progridem para estudos pré-clínicos mais específicos (Oliás-Molero et al., 2021).

Esse desafio é resultado do complexo ciclo de vida e virulência das espécies de *Leishmania*. Ao longo do processo de infecção, os parasitos são submetidos a diversas mudanças ambientais dadas pela diferença entre hospedeiros. Para sobreviver a tais modificações, as espécies de *Leishmania* são capazes de se diferenciar em duas formas altamente especializadas: promastigota e amastigota (Routaray et al., 2022). Dentre essas formas, a amastigota é considerada o alvo farmacológico da doença por ser encontrada em células de mamíferos (Mann et al., 2021). Discrepâncias entre atividades de inibição enzimática de protótipos contra formas promastigotas e amastigotas podem então estar relacionadas às diferenças morfológicas e bioquímicas características de cada forma do parasito. Isso demonstra que o desenho racional de fármacos baseado em um alvo expresso majoritariamente na forma amastigota pode ser uma das chaves para a obtenção de novos fármacos mais eficientes para o tratamento da leishmaniose.

As cisteíno proteases (CP) se destacam nesse contexto, sendo identificadas como fatores de virulência cruciais em diferentes espécies do complexo *L. (L.) mexicana* (Silva-Almeida et al., 2012). Dentre as isoformas da enzima, a cisteíno protease B (CPB) tem uma expressão particularmente elevada na forma amastigota e desempenha um papel fundamental na sobrevivência do parasita no interior das células do hospedeiro (BUXBAUM et al., 2003). A CPB é capaz de modular a atividade imunológica celular contra o parasito através de um “*feedback*” negativo da resposta imune Th1 (De Souza Leao et al., 1995; Olivier; Hassani, 2010; Siqueira-Neto et al., 2018). Especificamente, a CPB presente em *L. (L.) amazonensis* também é capaz de inibir a apresentação do antígeno mediada por moléculas MHC classe II assim como modular a expressão de importantes proteínas do parasito como a gp63 (Casgrain et al., 2016). A influência da CPB do complexo *L. (L.) mexicana* na expressão de fatores de transcrição também foi relatada.

Estudos recentes demonstraram que a CPB é capaz de interferir na expressão de fatores de transcrição da célula hospedeira como STAT-1 e AP-1, além de reduzir a produção de óxido nítrico induzida por IFN- $\gamma$  (Abu-Dayyeh et al., 2010; Silva-Almeida et al., 2012). Esse conjunto de respostas bioquímicas mediadas pela CPB faz com que inibidores dessa enzima sejam capazes de atingir indiretamente vias diferentes e são considerados, portanto, promissores compostos multialvo no tratamento das leishmanioses.

De fato, compilações recentes reportam que a estratégia conhecida como “*multitarget drug*” é cada vez mais utilizada e pode ser uma ferramenta para acelerar a descoberta de protótipos mais seguros e eficientes para o tratamento das leishmanioses (De Carvalho et al., 2020). A utilização de compostos com propriedades multialvo é baseada na complexidade das patologias e, por isso, essa abordagem considera que compostos “*single target*” são insuficientes para gerar todos os efeitos terapêuticos desejados (Ramsay et al., 2018). Portanto, o planejamento racional de fármacos visando a inibição da CPB pode representar um caminho promissor na busca de novas moléculas com propriedades antileishmania e potencial de atuar em múltiplos mecanismos fisiológicos.

Em países marcados por uma grande biodiversidade, como o Brasil, os metabólitos secundários representam uma atrativa fonte de moléculas bioativas com potencial multialvo. Dentre as classes, os flavonoides se destacam como um dos grupos mais diversos de metabólitos secundários, marcados por sua ampla distribuição em plantas e diferentes potenciais terapêuticos (Dias; Pinto; Silva, 2021). Biflavonoides, derivados sintéticos e semissintéticos de flavonoides demonstraram atividade relevante contra rCPB2.8 e rCPB3 (Carter et al., 2021; Gervazoni; Gonçalves-Ozório; Almeida-Amaral, 2018; Lourenço et al., 2023). Além disso, flavonoides como quercetina e fisetina foram relatados por sua capacidade de modular o sistema imunológico do hospedeiro contra o parasito (Carter et al., 2021). Contudo, o processo de isolamento e purificação desses compostos é caro e laborioso. Essas metodologias, por vezes, necessitam de equipamentos de alto custo, resultam em baixos rendimentos e utilizam solventes tóxicos, o que reduz a sustentabilidade do processo. Portanto, a síntese é uma importante alternativa para a obtenção otimizada de análogos de flavonoides.

Neste trabalho, visamos à obtenção de análogos flavonoídicos inibidores de CPB através de métodos sintéticos de baixo custo, escalonáveis e flexíveis. Testes de inibição enzimática *in vitro* em três diferentes isoformas recombinantes de CPB foram realizados como meio de confirmação do potencial farmacológico dos análogos sintéticos. Estudos *in vitro* foram realizados em formas promastigota e amastigota de *L. (L.)*

---

*amazonensis* para investigação da influência de inibição de CPB sobre as formas do parasito. Considerando o potencial multialvo dos compostos, análises de citometria de fluxo foram realizadas com o intuito de investigar outros potenciais alvos farmacológicos e a citotoxicidade foi avaliada em duas linhagens celulares. Por fim, os compostos com maior similaridade estrutural e diferença de atividade biológica foram analisados em ensaios *in silico* com o objetivo de investigar uma possível relação-estrutura atividade da série de moléculas.

Para uma melhor organização dos resultados, os dados foram distribuídos em três capítulos. O capítulo I engloba uma ampla revisão de literatura utilizada para a formulação dos questionamentos científicos que motivaram o delineamento experimental do estudo. Os capítulos II e III contemplam os resultados experimentais divulgados por meio de artigos científicos nos periódicos *Microorganisms* (FI = 4.5) e *ACS Infectious Diseases* (FI = 5.3), respectivamente. Os resultados expressivos podem contribuir para a validação da CPB como alvo antileishmania, além de ampliar a compreensão dos mecanismos de ação dos flavonoides contra o parasita, auxiliando estudos futuros que visam a descoberta de tratamentos mais eficiente contra as leishmanioses.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Sintetizar análogos flavonoídicos com potencial antileishmania e inibidores de CPB através de métodos sintéticos de baixo custo, escalonáveis e flexíveis bem como investigar a influência dos compostos sintetizados em outras vias biológicas capazes de combater o parasito.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Obtenção de análogos flavonoídicos utilizando métodos sintéticos escalonáveis e de baixo custo;
- b) Caracterização inequívoca dos compostos sintetizados por metodologias espectroscópicas;
- c) Triagem e determinação de  $CI_{50}$  dos análogos flavonoídicos frente a diferentes isoformas de cisteína protease recombinantes: rCPB2.8, rCPB3, rH84Y;
- d) Avaliação do mecanismo de ação cinético dos análogos mais ativos contra as três isoformas de CPB simultaneamente;
- e) Delineamento de uma relação estrutura-atividade através de simulações de *docking* molecular;
- f) Avaliação do potencial citotóxico dos compostos sintéticos em linhagem de células NIH/3T3;
- g) Determinação da  $CI_{50}$  dos compostos frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- h) Avaliação do potencial citotóxico dos compostos sintéticos em macrófagos peritoneais;
- i) Determinação da produção de óxido nítrico de macrófagos infectados e tratados com os análogos flavonoídicos em diferentes concentrações;
- j) Investigação da influência dos compostos sintetizados em mecanismos de ação antileishmania adicionais.

---

**CAPÍTULO I: Análise do contexto envolvido no  
aumento dos números  
epidemiológicos das  
leishmanioses e suas  
alternativas de tratamento**

---

## RESUMO

O movimento de combate às doenças tropicais negligenciadas (DTNs) foi iniciado no ano de 2000 após a elaboração dos 8 Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) pelas Nações Unidas. A ODM 6 declarou o “combate à AIDS, tuberculose, malária e outras doenças” como meta para a quebrar o ciclo de pobreza extrema em determinados países. Entretanto, a iniciativa gerada pela ODM 6 favoreceu o desenvolvimento de pesquisas em torno da AIDS, tuberculose e malária, que ficaram conhecidas como “as três grandes enfermidades”. Enquanto isso, os esforços destinados ao grupo de enfermidades englobadas pelas Nações Unidas como “outras doenças” ficaram em segundo plano. As graves consequências do texto divulgado através da ODM 6 foram observadas a curto e longo prazo. Doenças como leishmaniose atingiram números alarmantes de incidência e prevalência em diversos países. No Brasil, a falta de informação, deficiência de políticas públicas, dificuldades no acesso ao tratamento adequado e o clima tropical foram os fatores que tornaram o país parte do grupo responsável por 90% de todos os casos mundiais. Embora as leishmanioses sejam reconhecidas como um grave problema de saúde pública, os medicamentos utilizados na prática clínica são antigos, tóxicos e de alto custo. Após mais de duas décadas desde o início do movimento de combate às DTNs ter sido iniciado, a dificuldade de obtenção de um novo tratamento mais eficaz é questionável. É, portanto, evidente a necessidade de assumir novas estratégias para a descoberta de potenciais protótipos. Para isso, a investigação de fatores patogênicos envolvidos no ciclo da doença não parece ser suficiente. Por ser um grupo de DTNs com alto fator social envolvido, um novo medicamento precisa ser efetivo contra o agente etiológico da doença e atender às necessidades dos pacientes acometidos.

**Palavras-chave:** leishmanioses, ODM 6, DTNs

---

## ABSTRACT

The movement for combating neglected tropical diseases (NTDs) was started in 2000 after the elaboration of the 8 Millennium Development Goals (MDGs) by the United Nations. MDG 6 postulated 'combating AIDS, tuberculosis, malaria, and other diseases' as a goal to break the cycle of extreme poverty in different countries. However, the initiative released by MDG 6 favored the development of research involving AIDS, tuberculosis, and malaria, which became known as "the three great diseases". Meanwhile, efforts to combat other diseases encompassed by the United Nations as 'other diseases' were in the background. The serious consequences of the text released through MDG 6 were observed in the short and long term. Diseases such as leishmaniasis have reached alarming numbers of incidence and prevalence in several countries. In Brazil, lack of information, poor public policies, difficulties in accessing adequate treatment, and the tropical climate were the factors that made the country part of the group responsible for 90% of all cases worldwide. Although leishmaniasis is recognized as a serious public health problem, the drugs used in clinical practice are old, toxic and expensive. After more than two decades since the beginning of the movement to combat NTDs, the difficulty in obtaining a new, more effective treatment is questionable. It is, therefore, evident the need to assume new strategies for the discovery of potential prototypes. However, investigating the pathogenic factors involved in the disease cycle does not appear to be sufficient. Since leishmaniasis is a group of NTDs with a high social factor involved, the new drug must be effective against the etiological agent of the disease and meet the needs of affected patients.

**Keywords:** leishmaniasis, ODM 6, NTDs



## **1 O cenário preocupante das doenças tropicais negligenciadas**

A economia de um país e o modo como seus recursos são geridos afeta diretamente na qualidade de vida de sua população. Ao longo do tempo, o modo de desenvolvimento global resultou em uma marcante e crescente diferença socioeconômica entre países. As nações com avanços considerados precários no âmbito social e econômico eram denominadas como países subdesenvolvidos (Lange, 2012). Apesar do termo se encontrar em desuso desde a década de 1990, o cenário desses países não sofreu alterações consideráveis. Incentivada pelos preocupantes problemas socioeconômicos, as Nações Unidas promoveram uma mobilização em massa com o objetivo de formular prioridades sociais no ano de 2000. A agenda visava principalmente o combate às consequências causadas pela pobreza extrema. As prioridades estabelecidas foram reunidas em 8 objetivos distintos, denominados de Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODMs) (Sachs, 2012). Em meio à resolução das ODMs, um grupo de economistas coordenado pelo pesquisador Jeffrey Sachs promoveu um evento conhecido como Comissão de Macroeconomia e Saúde. O relatório exposto pela comissão é considerado um documento histórico que liga a saúde à pobreza global ao demonstrar o modo como doenças como malária e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) aprisionaram populações que vivem em países de baixa e média renda em um ciclo de pobreza (Das; Samarasekera, 2011; Sachs, 2001). As conclusões desse relatório foram incluídas na ODM 6 que objetivava “Combater a AIDS, a malária e outras doenças” (Molyneux et al., 2021).

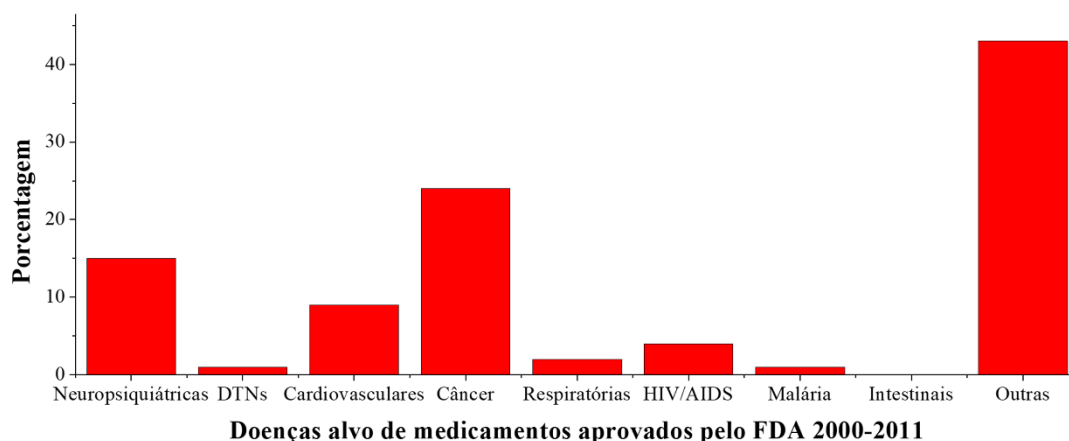
Após a divulgação da ODM 6, o Fundo Global de Combate à AIDS, tuberculose e malária foi formado como um instrumento de apoio aos países para atingir a meta estabelecida. O alto incentivo do fundo de investimento resultou em um aumento abrupto de pesquisas sobre essas doenças que passaram a ser denominadas como “as três grandes enfermidades” (Makam; Matsa, 2021). Contudo, a chamada do Fundo Global e a meta descrita pela ODM 6 diminuiu a atenção dada a diversas importantes enfermidades que estavam englobadas pelas políticas públicas como “outras doenças” (Molyneux et al., 2021). Dada essa circunstância, em 2003, Peter Hotez e colaboradores citaram pela primeira vez o termo “Doenças Tropicais Negligenciadas” (DTNs). A elaboração de um termo sem referência a nenhuma doença específica foi uma estratégia para contrabalancear o protagonismo dado às três grandes enfermidades. O estudo tratou as DTNs como uma “pandemia crônica” e, baseado na Comissão de Macroeconomia e

Saúde, observou-se que as maiores prevalências e incidências ocorrem em continentes tropicais como África, Ásia e Américas (Smith; Taylor, 2016; Winkler et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que as doenças discutidas durante a elaboração das ODMs coincidiam em relação à baixa exploração pelos órgãos de pesquisa e indústrias farmacêuticas (Weng; Chen; Wang, 2018). Essa prática, considerada como um negligenciamento, foi enfatizada na elaboração do termo.

O termo DTN logo passou a ser amplamente divulgado e diversos incentivos foram criados em reconhecimento à escassez de pesquisas sobre esse grupo de doenças. Prontamente, uma dinâmica foi estabelecida entre pesquisadores e, principalmente, líderes do Congresso dos EUA e do Parlamento do Reino Unido. Essa interação buscava captar fundos de investimento específicos que apoiassem a ampliação da doação de medicamentos com potencial de impacto rápido direcionados às DTNs (Hotez et al., 2006; Molyneux; Hotez; Fenwick, 2005). Iniciativas não governamentais importantes também foram criadas como a organização “*Drugs for Neglected Diseases Initiative*”, fundada ainda em 2003 (Ioset; Chang, 2011). Em resposta aos esforços globais, a Organização Mundial de Saúde (OMS) criou, em 2005, um departamento voltado ao combate das DTNs e reconheceu uma série de doenças como parte do grupo de enfermidades a serem combatidas. Para a OMS, além do acesso a medicamentos, seriam necessários recursos para apoiar os ministérios da saúde dos países mais acometidos pelas DTNs. A Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional (USAID) respondeu a preocupação citada pela OMS em 2006 através da elaboração de um programa que arrecadou US\$ 100 milhões ao longo de 5 anos para os países mais afetados. Os primeiros anos após a criação das ODMs foram, portanto, marcados por um movimento político-científico visando o combate às doenças tropicais negligenciadas (Molyneux et al., 2021).

Infelizmente, todos esses mecanismos de alerta não resultaram em mudanças significativas no cenário das DTNs. Entre os anos de 2003 e 2007, a Assistência Oficial ao Desenvolvimento (AOD) revelou que apenas 0,6% dos fundos de investimento destinados à saúde eram atribuídos às doenças negligenciadas. O relatório divulgado pela AOD também demonstrou que o protagonismo fornecido à AIDS, tuberculose e malária continuava presente. Considerando todo o fundo de investimento destinado às DTNs, 37% eram atribuídos ao combate das três grandes enfermidades (Liese; Houghton; Teplitskaya, 2014). Um dos indicativos da falta de investimentos persistente é a deficiência na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos visando o tratamento das

DTNs. No período de 2000-2011, ano no qual foi encerrado o programa desenvolvido pela USAID, apenas quatro novas entidades químicas foram aprovadas para o tratamento das doenças tropicais negligenciadas. Esse número representa apenas 1% de todas as aprovações do FDA nesse período (**Figura 1**) (Goupil; Mckerrow, 2014). Contudo, os dados mais alarmantes da primeira década de combate às DTNs após a criação da ODM 6 foram divulgados pelo Estudo Global de Carga de Doenças em 2010. Segundo o estudo, as DTNs foram responsáveis por 26,06 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade em todo mundo (Mitra; Mawson, 2017). Essa divulgação científica reforçou a relevante influência das DTNs no ciclo de pobreza como divulgado pela Comissão de Macroeconomia e Saúde. Além disso, demonstrou que o combate e tratamento destinado a esse grupo de doenças ainda estava longe de resultar na erradicação das DTNs.



**Figura 1:** Porcentagem de entidades químicas aprovadas pelo FDA entre 2000-2011 divididas pela doença alvo.

Fonte: Adaptado de Goupil; Mckerrow (2014)

Nos anos seguintes, as estatísticas e números epidemiológicos relacionados a esse grupo de doenças não sofreram alterações relevantes. Em 2014, foi estimado que aproximadamente 1,7 bilhão de pessoas em 185 países necessitaram de tratamento em massa ou individual. Destes, 1,1 bilhão residiam em países emergentes e se enquadravam nos fatores que classificam a pobreza extrema. Em determinadas regiões, o número de pessoas acometidas pelas DTNs pode representar até 60% da população do país (Bangert et al., 2017). Em meio à situação emergencial, uma nova agenda foi criada pelas Nações Unidas em 2015. Os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) surgiram como um plano complexo e multidisciplinar para o desenvolvimento humano até o ano de 2030. Para isso, a elaboração das metas foi baseada na expansão das ODMs e incluiu fatores relacionados à mudança climática, desigualdade econômica, inovação, consumo

sustentável, paz e justiça (Joshi; Quadir; Yadav, 2021). Especificamente, a ODS 3.3 se dedicou a tornar como meta o combate efetivo das DTNs e incentivou a criação de soluções multidimensionais que influenciem positivamente toda a agenda de desenvolvimento sustentável (WHO, 2020).

Após a divulgação da ODS 3.3, o combate às doenças negligenciadas foi marcado por um importante avanço entre os anos 2015-2019. Durante esse período, mais de 1 bilhão de pessoas receberam tratamento todos os anos, atingindo aproximadamente 60% do total de 1,7 bilhão de pacientes estimados pela OMS em 2014 (Cohen et al., 2016; WHO, 2019). O progresso inédito do tratamento e combate das DTNs foi repentinamente paralisado com o surgimento da pandemia da doença respiratória COVID-19. A doença foi responsável por aproximadamente 14,9 milhões de mortes apenas entre os anos de 2020 e 2021 (WHO, 2022a). Contudo, a pandemia foi decretada como encerrada pela OMS somente no início de 2023, o que demonstra que o número de mortes ainda é crescente (The Lancet, 2023). Além da letalidade do agente etiológico da COVID-19, uma grande crise socioeconômica global foi instaurada. Doenças que possuem em seu ciclo de transmissão um forte componente social, como as DTNs, sofreram um aumento abrupto no número de casos registrados. Relatórios recentes indicaram também a disseminação desse grupo de doenças em áreas onde antes não eram endêmicas (Hotez; Fenwick; Molyneux, 2021). Esse novo retrocesso no contexto de combate às DTNs fez com que a OMS divulgasse um relatório visando demonstrar as necessidades atuais e direcionar os estudos das DTNs entre os anos 2021-2030 (Brindha; Balamurali; Chanda, 2021). Contudo, a instabilidade histórica do cenário desse grupo de doenças negligenciadas deixa clara a necessidade de desenvolver novas estratégias analisando todas as anteriormente traçadas.

## **2 Um grupo de doenças duplamente negligenciado**

No mesmo ritmo em que novos casos de DTNs eram registrados, o índice de pobreza também sofreu grandes aumentos. Considerando as metas estabelecidas pelos ODMs, o número de pessoas vivendo em condições de pobreza extrema após a primeira década deveria ser de aproximadamente 500 milhões (Hotez; Fenwick; Molyneux, 2021). Contudo, em 2019 foi estimado que 650 milhões de pessoas viviam em condições precárias, o que representava cerca de 8,4% da população global. Em 2020, um ano após o início da pandemia de COVID-19, o combate à pobreza sofreu um novo e alarmante retrocesso. Esse período foi marcado por um aumento de mais de 100 milhões de pessoas

atingindo índices englobados na pobreza extrema (Homi Kharas, 2020). As consequências socioeconômicas provocadas pela pandemia demonstraram de forma explícita a relação entre a economia e as DTNs, reafirmando o postulado pela Comissão de Macroeconomia e Saúde. De forma prática, o período pandêmico demonstrou que o combate eficiente às DTNs precisa ser acompanhado pela redução do número de pessoas vivendo em condições precárias.

A compreensão da participação das DTNs no ciclo da pobreza extrema depende da análise de dois fatores: como as condições precárias de vida influenciam na transmissão das doenças; e como os casos registrados impactam na qualidade de vida de uma população. A OMS engloba 20 diferentes enfermidades no grupo das DTNs, o que reflete em um alto número de possíveis agentes etiológicos (Weld et al., 2022). Parasitos, bactérias, fungos, ectoparasitas ou vírus podem ser causadores dessas doenças e cada um desses agentes possui um ciclo de vida particular (Borlase et al., 2022). Doenças como AIDS, tuberculose e hanseníase são transmitidas de forma direta, o que implica que não há necessidade de um hospedeiro intermediário no ciclo de transmissão. Áreas urbanas, por suas características definidoras de aglomeração populacional, resultam em condições propícias à geração e disseminação de doenças infecciosas de contágio direto como as DTNs citadas (Anugwom; Anugwom, 2023). Atrelado a esse fator intrínseco à urbanização, condições precárias de moradia e falta de saneamento básico contribuem também para o surgimento e proliferação de vários hospedeiros intermediários como flebotomíneos, triatomíneos e caramujos (Chastonay; Chastonay, 2022). Estes hospedeiros participam do ciclo de vida de diversos agentes etiológicos das DTNs com transmissão indireta como malária, leishmanioses, doença de Chagas e esquistossomose. Com a falta de políticas públicas e poucos programas de educação sobre saúde, as populações que vivem sob essas condições ficam propícias a diversos riscos sem o conhecimento adequado, aumentando consideravelmente a transmissão das DTNs nessas regiões (Ocholaid; Karanja; Elliott, 2021).

Um novo caso de DTN representa um grande impacto socioeconômico para essas populações. Dadas as condições precárias e, por vezes, difícil acesso à rede pública de saúde, o diagnóstico e início do tratamento são tardios (Winkler et al., 2018). Ao iniciar a terapia, os pacientes se deparam com uma dura realidade: os medicamentos utilizados contra as DTNs são comumente tóxicos e geram muitos efeitos adversos (Mengarda et al., 2022; Muchiri et al., 2023). Além disso, parte desses medicamentos são administrados por via endovenosa e/ou intramuscular, causando desconforto e exigindo

acompanhamento hospitalar periódico (Mitra; Mawson, 2017). Esse conjunto de fatores atrelados ao tratamento das DTNs é incompatível com a realidade dos pacientes acometidos que acabam por descontinuar a terapia. O resultado disso é o agravamento do quadro da doença e consequente diminuição da capacidade de trabalho desses pacientes. Com a menor produtividade, as ofertas de emprego se tornam escassas, diminuindo a renda *per capita* de uma população que já possui problemas econômicos graves (WHO, 2022b). A alarmante realidade vivenciada por essas pessoas demonstra como uma população também pode ser negligenciada. Enquanto isso, as Unidades Básicas de Saúde (UBS) locais também sofrem com consequências diretas provocadas por essas doenças. O grande número de casos registrados sobrecarrega as UBS que enfrentam a dificuldade de distribuição de medicamentos em massa dado o valor do tratamento que, de forma geral, é alto.

Outra grave consequência do tratamento farmacológico inadequado e utilizado em massa é a resistência adquirida aos fármacos pelos agentes etiológicos. Pelo menos 11 das 20 enfermidades compreendidas como DTNs apresentam resistência à terapia medicamentosa (Akinsolu et al., 2019). Apesar do surgimento da resistência ao tratamento atual, os medicamentos onerosos utilizados na prática clínica contra as DTNs permanecem os mesmos há décadas (De Assis; Rabello; Cota, 2021). Os fatores socioeconômicos e farmacológicos deixam claro que a busca por novas terapias eficientes, acessíveis e voltadas às necessidades do paciente e características das doenças pode representar uma ferramenta crucial para quebrar o ciclo provocado pelas DTNs (Weld et al., 2022).

### **3 A população brasileira é fortemente atingida pelas DTNs**

O Brasil é marcado por sua ampla diversidade de recursos naturais que representam 14% de toda a biocapacidade mundial (Ahmed; Le; Shahzad, 2022). A biodiversidade distribuída em todo o amplo território fez com que o país emergente atraísse atenções no âmbito econômico. Desde 2013, o Brasil se destacou na América Latina e Caribe ao atingir 34% de toda a população da região. Ainda nesse período, foi considerado um dos países com mais rápido crescimento econômico, sendo a segunda maior economia no Hemisfério Ocidental (Hotez; Fujiwara, 2014). Contudo, a história da economia no Brasil não é linear. Apesar da capacidade de altas taxas de crescimento, o país tem enfrentado desafios significativos em seus esforços de promover um crescimento robusto e sustentável. Consequentemente, seu desempenho econômico a longo prazo tem

sido pouco relevante. A instabilidade do crescimento econômico no Brasil atraiu atenção científica substancial e diversos estudos apontaram causas significantes para o fenômeno como inflação, balanço de restrições de pagamento, liberalização financeira e comercial, mudança estrutural e instabilidade política (Doré; Teixeira, 2022).

A redução do poder de compra e qualidade de vida da população são alguns dos reflexos da inexistência de um crescimento econômico linear. A crise econômica mais recente advinda da pandemia de COVID-19 fez com que o país caísse no ranking do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), chegando ao 87º lugar em 2022 (Nu, 2022). O quadro geral demonstrado pelo IDH se torna ainda mais preocupante ao analisar determinados estratos socioeconômicos. Historicamente, o Brasil é um país marcado pelas desigualdades sociais. Em 2021, a negligência sofrida pelas populações de determinadas regiões ficou ainda mais evidente. O contingente de pessoas com renda domiciliar *per capita* de até 497 reais mensais atingiu cerca de 29,6% de toda a população do país, o que representa 62,9 milhões de pessoas. Em comparação ao ano de 2019, houve um aumento de 9,6 milhões de brasileiros atingindo o índice de pobreza extrema. Apenas esse aumento representa praticamente toda a população de um pequeno país como Portugal (Neri, 2022). Esse marcante retrocesso socioeconômico representou problemas graves ao país.

O aumento dos índices de prevalência e incidência de doenças como as DTNs é uma das consequências do retrocesso socioeconômico após o período da pandemia de COVID-19. Os casos de DTNs no Brasil são mundialmente relevantes desde o início do movimento visando ao combate dessas doenças e algumas são registradas em todo o território do país. O grande número de casos faz com que o Brasil seja o maior foco de DTNs em toda a América Latina. Mesmo antes da crise socioeconômica, em 2018, o número de mortes relacionadas a essas doenças era estimado entre 8.000-10.000 anualmente (Martins-Melo et al., 2018). Ainda assim, a verdadeira carga de DTN é considerada subestimada no Brasil (Martins-Melo et al., 2016).

A diversidade dos seis biomas brasileiros (Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal) e as condições climáticas características também afetam na relevância em termos epidemiológicos de determinadas DTNs no país. Em geral, as doenças que dependem de um hospedeiro intermediário como leishmanioses, dengue, filariose e doença de Chagas são altamente registradas no Brasil (Hotez, 2014). Dentre elas, a doença de Chagas e as leishmanioses se destacam pela letalidade. Apesar do número de pacientes acometidos pela doença de Chagas ter chegado a 1,9 milhões, a

redução da transmissão dessa doença tem apresentado avanços, o que reduziu o número de novos casos (Bern et al., 2011). Em contrapartida, o Brasil ainda faz parte do grupo de países responsável por 90% de todos os casos mundialmente registrados de leishmanioses. Especificamente, a leishmaniose cutânea se destaca como a forma clínica mais prevalente no Brasil, com casos registrados em todos os Estados (Anversa et al., 2018). Vale ressaltar que o flebotômíneo responsável pela transmissão dessas doenças é endêmico em todas as regiões do país, dificultando a redução do número de novos casos (Andrade-Filho et al., 2017). Dessa forma, as leishmanioses no país ainda necessitam de grande atenção por parte de políticas públicas de saúde e centros de pesquisa.

#### 4 As leishmanioses

Os altos índices epidemiológicos das leishmanioses se repetem em diversas regiões do mundo. Esse grupo de doenças está presente em mais de 90 países, sendo os primeiros casos registrados em regiões da África, Ásia e Brasil (Costa-Da-Silva et al., 2022). Rapidamente, os índices de incidência atingiram números alarmantes. Estima-se que 12 milhões de pessoas são acometidas pelas leishmanioses. Contudo, o número exato de pacientes é impreciso uma vez que, por ano, aproximadamente 1,5-2 milhões de novos casos são registrados (Benallal et al., 2022). O conhecimento sobre a gravidade da doença e representatividade do Brasil em seu ciclo epidemiológico não foram suficientes para um combate efetivo contra as leishmanioses. Considerando um intervalo de 18 anos, entre 2001-2019, 3,2% dos Estados ainda apresentam incidência crescente de casos e 72,5% não demonstraram alteração (Portella; Kraenkel, 2021). Além disso, embora o número geral de novos casos tenha reduzido entre 2001-2021 (Figura 2), a porcentagem de letalidade das leishmanioses em 2021 foi de 9,5%, a maior já registrada desde 2012 (Opas, 2022).



**Figura 2:** Número de casos registrados de leishmanioses no Brasil entre 2001-2021.  
Fonte: Adaptado de Opas (2022)



Diversos fatores que envolvem as leishmanioses as tornam doenças de difícil combate e tratamento. Os agentes etiológicos da doença são protozoários parasitos da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Diversas espécies foram identificadas como parte desse gênero e, dentre elas, 20 são responsáveis por provocar doenças em humanos (WHO, 2016). Apesar da transmissão antroponótica ser rara, existem alguns casos registrados de transmissão através de transfusões sanguíneas, transferência placentária e contato com agulhas contendo resquícios de sangue de pacientes infectados (Yadav et al., 2023). Contudo, a maioria dos casos de transmissão das 20 espécies de *Leishmania* se dá através da picada de fêmeas infectadas de insetos vetores. Esses insetos pertencem à ordem Diptera, Família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e podem ser encontrados em dois gêneros distintos: *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Akhoundi et al., 2016). No Brasil, o gênero encontrado é o *Lutzomyia*, sendo o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* identificado em todos os Estados (Andrade-Filho et al., 2017). Esse fator é um dos motivos responsáveis pelo registro das leishmanioses em todo o território brasileiro. Entretanto, essa classificação de vetores da leishmaniose divulgada durante décadas é controversa. Em 2003, o pesquisador Galati propôs um reagrupamento das espécies de flebotomíneos americanos em 22 gêneros diferentes (Galati; Marassá; Andrade, 2003). As diferenças da nova classificação filogenética proposta por Galati e colab. (2003) não resultaram em modificação do cenário de contaminação propício do Brasil, uma vez que a maior parte dos vetores citados no estudo são encontrados no país (Shimabukuro; Galati, 2011).

Dada a quantidade de espécies do gênero *Leishmania* patogênicas para os hospedeiros humanos, as leishmanioses são marcadas por seu amplo espectro clínico. Os pacientes acometidos por essas doenças podem apresentar desde lesões cutâneas com tendência à ulceração (leishmaniose cutânea) até o acometimento de órgãos como fígado, baço e medula óssea (leishmaniose visceral) (Burza; Croft; Boelaert, 2018). A leishmaniose cutânea, a forma clínica mais prevalente da doença, pode ainda ser encontrada com manifestações únicas, múltiplas, difusas ou sob forma mucosa. De modo geral, a leishmaniose cutânea é caracterizada por uma lesão no local da picada do flebotomíneo vetor, apresentando forma arredondada, ulcerada e de fundo granuloso (Abadías-Granado et al., 2021). A depender da interação imunológica do hospedeiro, essas lesões podem se distribuir em múltiplos locais podendo ou não ser ulceradas (forma múltipla e difusa, respectivamente). A leishmaniose cutânea em sua forma mucosa é definida pela evolução das ulcerações que causam destruição parcial ou total de

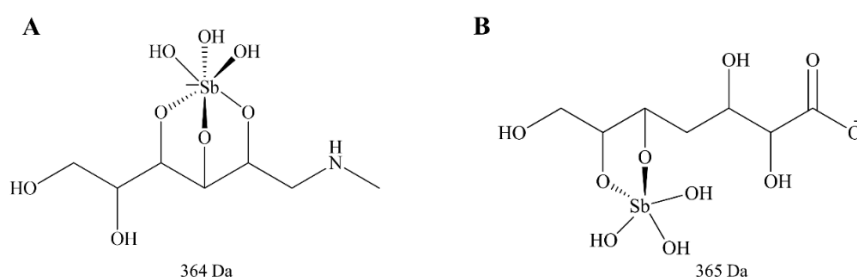
membranas mucosas, aumentando as chances de infecções secundárias e dificultando o tratamento (Jaimes, 2022).

## 5 O atual tratamento contra as leishmanioses

Ainda não existem vacinas disponíveis para a população humana visando o combate das leishmanioses e as intervenções são essencialmente medicamentosas. Os fármacos utilizados na prática clínica global são: o antimoniato de *N*-metil-glucamina, a anfotericina B na formulação lipossomal, a pentamidina, a miltefosina e a paromomicina (Santiago; Pita; Guimarães, 2021).

### 5.1 Os antimoniais pentavalentes

Os antimoniais são utilizados como agentes terapêuticos há séculos. O primeiro registro do uso dessa classe de compostos para o tratamento de leishmaniose cutânea (LC) foi ainda em 1913. Os relatos positivos fizeram com que essas moléculas fossem também empregadas na terapia de leishmaniose visceral (LV) nos anos seguintes. Entretanto, a alta toxicidade e instabilidade química fez com que os antimoniais trivalentes parassem de ser utilizados na terapia dessas doenças. A necessidade de novos fármacos para o tratamento da LC e LV incentivaram a descoberta e desenvolvimento dos antimoniais pentavalentes em 1920. Os novos fármacos geravam menor quantidade de efeitos adversos em relação aos antecessores, além de demonstrar alta eficiência, evitando o óbito de diversos pacientes acometidos pelas leishmanioses no século XX (Haldar; Sen; Roy, 2011). A importância dessa descoberta foi reconhecida através da premiação do Nobel de 1929 e atraiu grande interesse dos pesquisadores. O antimoniato *N*-metil-glucamina (Glucantime<sup>®</sup>) e o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>), sintetizados em 1937 e 1945, respectivamente (Goodwin, 1995; Schmidt, 1937) continuam sendo considerados os medicamentos de primeira escolha para o tratamento desse grupo de DTNs há seis décadas (Figura 3).



**Figura 3:** Fórmula estrutural proposta para íons 364 Da e 365 Da identificados por ESI (-)-MS em soluções aquosas de Glucantime<sup>®</sup> e Pentostam<sup>®</sup>, respectivamente.  
Fonte: Adaptado de Frézard; Demicheli; Ribeiro (2009)

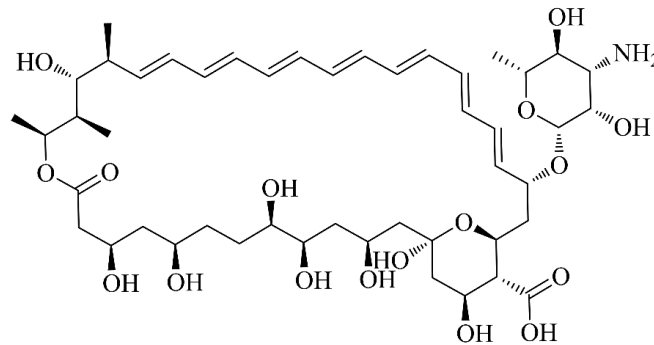
As pesquisas em torno dos antimoniais pentavalentes não foram suficientes para eliminar alguns efeitos adversos associados a esses fármacos. Administrados por via endovenosa ou intramuscular, os antimoniais pentavalentes são associados a mialgia, anorexia, febre, além de alterações hepáticas, cardiovasculares e renais (Marques et al., 2019). A toxicidade desses fármacos é relacionada com seu perfil farmacocinético. Após a administração, a meia-vida do Pentostam<sup>®</sup> ou Glucantime<sup>®</sup> é de apenas 2 horas e a maior parte (81-97%) é excretada num período de 6-8 horas. Dessa forma, são necessárias altas e repetidas doses para que os almejados efeitos terapêuticos sejam alcançados. Apesar da curta meia-vida e alta excreção, pequenas quantidades dos antimoniais pentavalentes se acumulam nos tecidos sob sua forma reduzida de antimoniato trivalente, gerando uma toxicidade crescente (Rath et al., 2003; Sharma; Anand, 1997). O uso desses fármacos como primeira escolha dos tratamentos de LC e LV demonstra a necessidade emergencial da descoberta e desenvolvimento de novos compostos bioativos mais seguros.

A utilização desses compostos é justificada pela alta atividade antileishmania da classe. Entretanto, os mecanismos responsáveis por essa bioatividade ainda não foram completamente elucidados. Uma das razões que dificultam a interpretação desses estudos é a reação de oxirredução dos antimoniais pentavalentes em meio fisiológico (Haldar; Sen; Roy, 2011). A participação dos antimoniatos trivalentes ainda não é clara, contudo, a descoberta da sua existência fez com que a hipótese de que os antimoniais agem como um pró-fármaco seja a mais aceita. Outras hipóteses de mecanismo farmacológico desses compostos são: formação de complexos com nucleotídeos e glicoconjugados, inibição da enzima tripanotona redutase e imunomodulação do hospedeiro (Bastos et al., 2016).

## 5.2 Anfotericina B

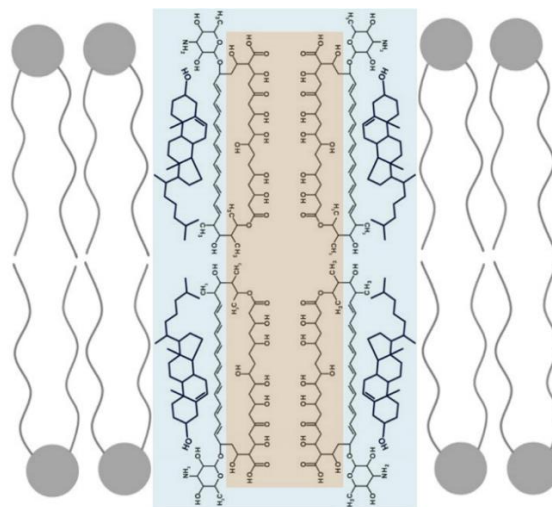
A alta toxicidade relacionada ao acúmulo de antimoniato trivalente nos tecidos fez com que a anfotericina B (AmB) surgisse como uma alternativa promissora para o tratamento de LC e LV (Figura 4). Trata-se de um antibiótico poliênico primeiramente isolado em 1955 a partir de cepas de *Streptomyces nodosus* provenientes da Venezuela (Chattopadhyay; Jafurulla, 2011). Esse fármaco foi amplamente utilizado nos anos posteriores por sua alta atividade antifúngica. Após os primeiros anos de uso, a AmB já era considerada o fármaco de primeira escolha para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas causadas por *Candida albicans* e/ou *Aspergillus fumigatus* (Cohen, 1998). A bioatividade marcante desse fármaco fez com que a AmB fosse apontada como

um potencial agente antiparasitário através de estudos de reposicionamento de fármacos. A hipótese foi confirmada e o uso desse antibiótico na prática clínica demonstrou excelentes resultados, com uma porcentagem de 97% de cura em casos de LV (Chattopadhyay; Jafurulla, 2011; Wasan et al., 2009).



**Figura 4:** Estrutura química do antibiótico poliênico anfotericina B.  
Fonte: Autoria própria

O amplo espectro da AmB é relacionado ao seu mecanismo de ação. Acredita-se que esse antibiótico consegue interagir com esteróis presentes em membranas celulares, levando à formação de canais transmembrânicos (Figura 5). A formação de poros na membrana celular induz o aumento da permeabilidade a íons e pequenas moléculas, o que gera uma instabilidade da homeostase citoplasmática e posterior morte celular (Hartsel; Bolard, 1996). Essa hipótese de mecanismo de ação é fundamentada através da característica anfifílica da AmB que permite a interação com esteróis da bicamada lipídica (Chattopadhyay; Jafurulla, 2011). Entretanto, as etapas de interação desse fármaco com a membrana celular são complexas e estudos de dinâmica molecular vêm sendo utilizados para elucidar o mecanismo de ação proposto (Umegawa et al., 2022).

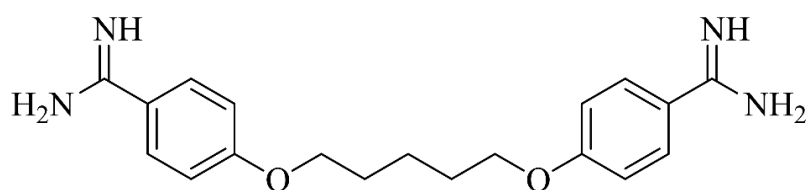


**Figura 5:** Proposta de interação entre a AmB e os esteróis presentes na membrana celular.  
Fonte: CHATTOPADHYAY; JAFURULLA (2011)

Por outro lado, o mecanismo de ação mais aceito para a AmB apresenta grandes desvantagens práticas. A membrana celular do mamífero também possui esteróis, sendo o colesterol considerado determinante para a estabilidade da bicamada lipídica (Zhang et al., 2019). Em meio fisiológico, a AmB interage sem seletividade com os esteróis presentes nas células do paciente e do parasito e/ou fungo. Como resultado, a administração desse fármaco gera graves efeitos adversos como náusea, febre, tremores, hemólise, bem como problemas cardíacos, renais e hepáticos agudos (Kamiński, 2014; Kumari et al., 2022). De modo a minimizar os efeitos adversos, vários estudos tiveram como objetivo o desenvolvimento de um carreador ou formulação com potencial seletivo apenas para os esteróis dos agentes patogênicos. Por meio desses esforços, a anfotericina B incorporada em lipossomas carreadores demonstrou grande potencial antileishmania e redução de efeitos adversos. O AmBisome® é fortemente indicado pela OMS como alternativa para o tratamento de LC e LV, contudo, o alto custo desse medicamento ainda é considerado um fator limitante para sua implementação em massa (Chan Margaret, 2017).

### 5.3 Pentamidina

Assim como os outros fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses, a descoberta da pentamidina não é recente. Por volta de 1930, um análogo da insulina contendo grupamentos guanidina foi desenvolvido. A sintalina demonstrou alta potencial antiprozoário frente a infecções causadas por diferentes espécies do gênero *Trypanosoma*. Essa descoberta gerou grande interesse no estudo de moléculas aromáticas contendo grupamentos nitrogenados. A pentamidina é um exemplo desses compostos, sendo uma diamidina aromática simétrica conectados entre si por uma cadeia hidrocarbônica alifática (Figura 6). Esse composto, assim como a sintalina, demonstrou resultados de inibição relevantes frente aos protozoários *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (No, 2016).



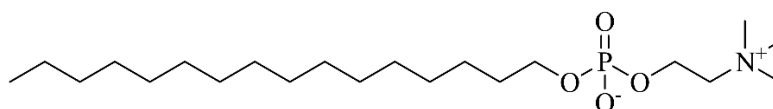
**Figura 6:** Estrutura química da pentamidina.  
Fonte: Autoria própria

Quando utilizado para o tratamento das leishmanioses, a pentamidina apresentou atividades importantes principalmente em casos de LC com taxas de efetividade de 31.2-96% (Gadelha et al., 2015; Heleine et al., 2023). Por isso, a pentamidina passou a ser utilizada como um fármaco de segunda escolha para o tratamento de LC em casos nos quais os antimoniais pentavalentes não geram respostas adequadas (Gadelha et al., 2015). Embora seja um fármaco descoberto por volta da década de 1940, o mecanismo de ação responsável pelo efeito antiparasitário da pentamidina ainda não foi completamente esclarecido. As principais hipóteses são relacionadas à alteração do transporte de membrana ao inibir a reação de poliaminas bem como interferência na síntese de DNA e posterior disfunção mitocondrial (No, 2016).

Após intensa utilização em casos de LC, relatos de resistência dos parasitos aos fármacos reduziram sua taxa de eficácia nos tratamentos (No, 2016). Reações adversas como náusea, dor de cabeça, hipertensão, erupções na pele, disfunção renal e hepatotoxicidade também marcaram o uso desse fármaco. Além disso, a formulação farmacêutica comercial da pentamidina é administrada por via endovenosa, resultando em incômodo para o paciente e altos custos para o hospital (Oliveira et al., 2011). Somados, esses aspectos fizeram com que o uso da pentamidina na prática clínica fosse reduzido a partir da década de 2000.

#### 5.4 Miltefosina

A miltefosina é o exemplo de fármaco mais recente utilizado para o tratamento das leishmanioses. Trata-se de um análogo alquilfosfocolínico inicialmente desenvolvido para o tratamento de metástase de câncer de mama (Figura 7). Esse agente antineoplásico teve sua atividade contra espécies de *Leishmania* elucidadas *in vitro* e, posteriormente, testes *in vivo* provaram sua alta eficácia (Palić; Beijnen; Dorlo, 2022). Esses resultados atrelados à alta biodisponibilidade oral da molécula fizeram com que a OMS, Asta médica e o governo da Índia iniciassem o financiamento de estudos clínicos de fase II e III. Em 2002, a miltefosina se tornou o primeiro fármaco de administração oral disponível para o tratamento das leishmanioses (Sundar et al., 2012).



**Figura 7:** Estrutura química da miltefosina.

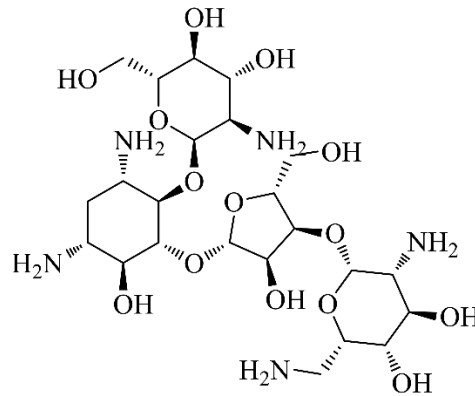
Fonte: Autoria própria

Em termos estruturais, a miltefosina é uma molécula menor e obtida com maior facilidade de síntese em comparação à anfotericina B. Contudo, esses dois fármacos possuem características anfifílicas como semelhança. De fato, a cadeia hidrocarbônica alifática presente na estrutura da miltefosina faz com que esse fármaco apresente alta afinidade aos esteróis como colesterol e/ou ergosterol (Azzouz et al., 2005). Sendo assim, seu mecanismo de ação antileishmania é associado a distúrbios do metabolismo e composição da membrana celular do parasito. Além disso, estudos posteriores demonstraram também que esse fármaco é capaz de combater indiretamente o parasito atuando em vias imunomodulatórias do hospedeiro (Palić; Beijnen; Dorlo, 2022).

A alta biodisponibilidade oral é rara e altamente desejada entre os fármacos antileishmania. A miltefosina foi, portanto, o único tratamento com apresentação oral aprovado pelo FDA visando, principalmente, o tratamento da LV (Palić; Beijnen; Dorlo, 2022; Sunyoto; Potet; Boelaert, 2018). Entretanto, trata-se de uma molécula com diversos efeitos reprodutivos indesejados, sendo reportados graves casos de teratogenicidade relacionados à sua administração. Conseqüentemente, o uso da miltefosina é contraindicado para o tratamento de pacientes grávidas, limitando sua aplicação clínica (Sundar et al., 2012).

### 5.5 Paromomicina

A paromomicina é um outro exemplo de fármaco que não foi inicialmente desenvolvido para o tratamento das leishmanioses. Esse antibiótico aminoglicosídeo isolado de cepas de *Streptomyces krestomuceticus* é utilizado para o tratamento de infecções do sistema gastrointestinal por seu amplo espectro frente às bactérias (No, 2016) (Figura 8). Sua atividade antileishmania foi comprovada na década de 1960 através de testes *in vitro*. Ao ser submetida a experimentos posteriores, os estudos clínicos de fase IV demonstraram 94,6% de eficácia no tratamento da LV, o que solidificou seu uso também contra essa doença (Sundar et al., 2007). Por sua baixa biodisponibilidade oral, a formulação farmacêutica desenvolvida para esse fármaco é administrada por via intramuscular (Jamil et al., 2015).



**Figura 8:** Estrutura química da paromomicina.  
Fonte: Autoria própria

Trata-se também de um fármaco antileishmania com mecanismo de ação ainda não completamente elucidado. Capacidade de inibição da síntese proteica, alterações na fluidez da membrana do parasito e indução de disfunções mitocondriais são algumas das hipóteses relacionadas aos prováveis mecanismos antileishmania da paromomicina (No, 2016).

Visando aumentar a comodidade e adesão ao tratamento, formulações tópicas contendo esse fármaco foram desenvolvidas. Estudos clínicos de fase III conduzidos com uma formulação tópica apresentaram um índice de cura de 82% em pacientes acometidos por LV (Ben Salah et al., 2013). As taxas de sucesso com o tratamento da paromomicina são, entretanto, menores quando comparados à fármacos de primeira escolha como antimoniais pentavalentes e AmB. Ao expor cepas de *Leishmania donovani* à paromomicina, parasitas resistentes foram facilmente geradas experimentalmente, demonstrando o potencial para o rápido surgimento de cepas resistentes ao tratamento (Hendrickx et al., 2014). Como resultado, a paromomicina não é o fármaco mais utilizado no tratamento da LC e LV.

## 6 A indústria farmacêutica e a descoberta de fármacos antileishmania

Ao analisar os medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, nota-se facilmente que todos são antigos, tóxicos e de alto custo. Considerando que o movimento de combate às DTNs foi iniciado desde a década de 2000, a utilização de fármacos desenvolvidos ainda no século XX gera diversos questionamentos. A indústria farmacêutica é a principal responsável pelo processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e atribui a suas pesquisas avanços biológicos, químicos e biomédicos (De La Torre; Albericio, 2019). Trata-se de um dos setores industriais mais rentáveis em escala global, movimentando bilhões de dólares



anualmente. Por sua importância econômica, diversos países investem continuamente no desenvolvimento das indústrias farmacêuticas, o que tem resultado em um crescimento de mercado anual de cerca de 5,7% desde 2017 (González Peña; López Zavala; Cabral Ruelas, 2021).

O volume de investimentos nesse setor industrial não reduz a complexidade envolvida na pesquisa das indústrias farmacêuticas. A descoberta de uma substância bioativa inclui etapas de identificação da doença e seus principais aspectos clínicos, seleção de um alvo molecular e sua validação, e testes de eficácia *in vitro* e *in vivo* (Sinha; Vohora, 2017). Os resultados das análises da pesquisa básica são utilizados na posterior otimização dos compostos com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica e biodisponibilidade. Somente após essas etapas, o desenvolvimento do potencial fármaco é iniciado, sendo dividido em ensaios pré-clínicos e clínicos (Steinmetz; Spack, 2009).

A alta taxa de insucessos durante esse processo é outra difícil realidade enfrentada pelas indústrias farmacêuticas. A maioria dos compostos protótipo não reproduz sua eficácia demonstrada *in vitro* e *in vivo* quando submetidos aos testes de fase clínica. Mesmo aqueles com resultados clínicos promissores passam por um complexo processo até a utilização em prática hospitalar. Estima-se que apenas um dentre oito compostos testados clinicamente consiga ser aprovado para comercialização (Mohs; Greig, 2017). Erros na escolha da dose do fármaco e problemas de eficácia e segurança são apenas alguns dentre diversos motivos responsáveis por essa taxa de insucessos significativa (Sacks et al., 2014).

Por todas essas particularidades, a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos se torna um processo longo, complexo e oneroso. Desde a seleção da doença a ser investigada até a introdução de um novo medicamento no mercado farmacêutico, um período aproximado de 12 a 15 anos é necessário (Mohs; Greig, 2017). A combinação do tempo e tecnologias indispensáveis geram altos custos que podem ultrapassar até US\$ 2,6 bilhões. Mesmo com a possibilidade de traçar estimativas, o custo real do processo de desenvolvimento de um fármaco não pode ser orçado de forma precisa, uma vez que existe alto índice de variação (Morgan et al., 2011).

A indústria farmacêutica é um setor comercial e seus produtos são desenvolvidos visando um determinado mercado consumidor. A venda de novos fármacos e demais formulações precisa resultar em um valor capaz de retornar o que foi investido e gerar lucro. Dessa forma, a maior parcela das pesquisas de indústrias farmacêuticas está voltada para encontrar soluções de interesse ou necessidade de uma

grande quantidade de pessoas. Entretanto, a determinação do tamanho de um mercado consumidor depende também de um outro fator crucial: a capacidade de compra da população envolvida. Essa estratégia comercial é facilmente visualizada ao analisar a classe de fármacos com maior índice de crescimento nas últimas décadas. O mercado farmacêutico de medicamentos musculoesqueléticos atingiu altas taxas de expansão, representando 14% de todo o mercado farmacêutico em 2017 (González Peña; López Zavala; Cabral Ruelas, 2021). O aumento da busca por esses fármacos está relacionado ao crescente envelhecimento populacional que é substancialmente maior em grupos de média ou alta renda (Zhang; Xing; Li, 2019). O mercado de fármacos musculoesqueléticos possui então o cenário ideal para as indústrias farmacêuticas, no qual o número de pessoas atingidas é crescente e, em sua maioria, com alto poder aquisitivo.

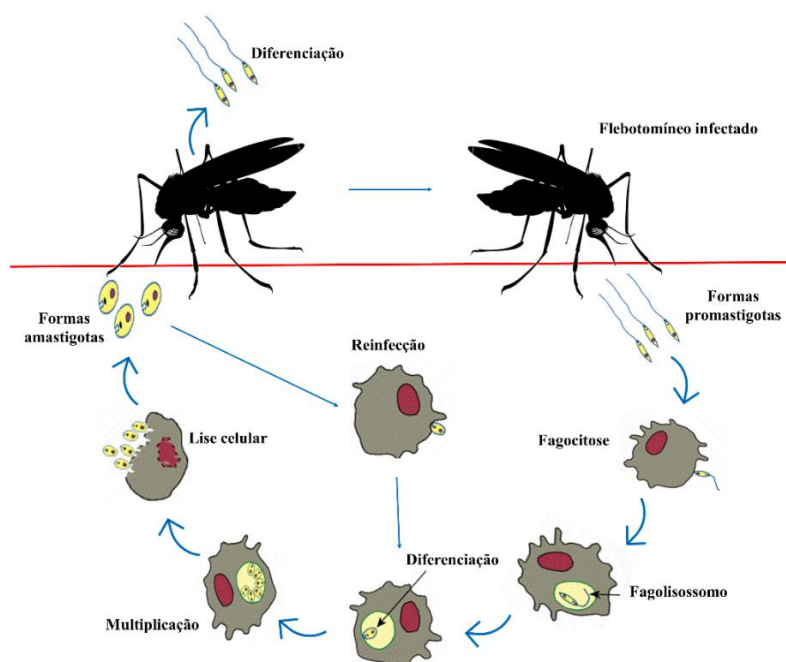
Por outro lado, o mercado de fármacos para o tratamento das leishmanioses é pequeno e incerto. Apesar dos altos números de prevalência, o reduzido poder de compra da maioria das pessoas acometidas e o início do tratamento tardio fazem com que a busca por esses medicamentos seja baixa (Choi et al., 2021). Adicionalmente, a AIDS, tuberculose e malária ainda continuam atraindo a maior parte do interesse das indústrias desde a publicação da ODM 6 (Mukherjee, 2023). Sendo assim, a produção de fármacos para o tratamento das leishmanioses fica limitado a um pequeno grupo de indústrias farmacêuticas, gerando uma centralização comercial. Esses elementos são determinantes para que as grandes indústrias considerem o mercado de fármacos antileishmania pouco lucrativo, o que reduz a busca por novos fármacos (Banjara et al., 2012; Sunyoto et al., 2019).

## **7 A complexidade das leishmanioses e o tratamento multialvo**

O pouco conhecimento acerca do mecanismo de ação dos fármacos antileishmania é outro aspecto que faz do desenvolvimento de novos compostos um desafio. Com os avanços da biologia molecular e metodologias *in silico*, a identificação de um alvo farmacológico é considerada uma etapa inicial da descoberta de fármacos (Lourenço et al., 2020). A compreensão sobre como ocorre o reconhecimento, especificidade e afinidade entre um fármaco e seu alvo molecular é amplamente utilizada no desenho racional e otimização estrutural de novos protótipos (Veljkovic et al., 2011). No contexto das leishmanioses, a dificuldade na identificação de um alvo farmacológico se deve à complexidade dessas doenças e o modo de interação parasita-hospedeiro. Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um aparato bioquímico extremamente

desenvolvido. Por isso, a atuação de um fármaco em um alvo molecular gera diversas respostas biológicas, tornando a identificação da via responsável por todas elas uma difícil tarefa.

O ciclo de vida geral das espécies de *Leishmania* já é bem estabelecido (Figura 9). Inicia-se quando uma fêmea de flebotomíneo adquire os parasitos na forma amastigota durante o repasto sanguíneo de um hospedeiro vertebrado infectado. No trato digestivo do inseto vetor, os parasitos se transformam em formas flageladas conhecidas como promastigotas em resposta adaptativa ao novo ambiente. Posteriormente, as novas formas adaptadas se multiplicam por divisão binária no estômago das fêmeas do inseto. Por meio da motilidade conferida pelos flagelos, os parasitos migram para o esôfago e faringe do hospedeiro intermediário, onde é iniciada a metaciclogênese para a produção de formas promastigotas metacíclicas. Essas formas infectantes de *Leishmania* são inoculadas pelo inseto vetor através de novo repasto sanguíneo. O parasito é então reconhecido pelo sistema imunológico do hospedeiro vertebrado que ativa o sistema complemento e células como os macrófagos se encarregam pela fagocitose. Nesse momento, ocorre um novo processo de adaptação e as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, capazes de sobreviver e se multiplicar no fagolisossomo do macrófago. O processo de multiplicação das formas amastigotas ocorre até a lise da célula hospedeira, gerando a disseminação da infecção (Borghi et al., 2017; Das Chagas et al., 2022; Kaye; Scott, 2011).



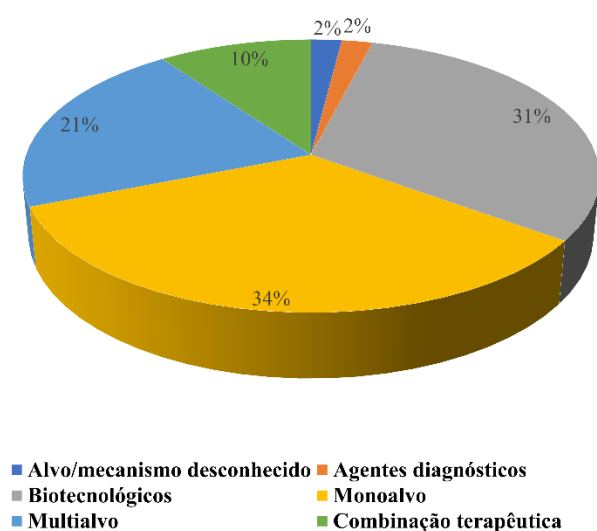
**Figura 9:** Ciclo de vida das espécies patogênicas do gênero *Leishmania*.  
Fonte: Autoria própria

A complexidade da infecção mediada por *Leishmania* é evidenciada quando os mecanismos de sobrevivência do parasito ao evoluído sistema imune dos mamíferos são investigados. De forma geral, o equilíbrio entre as repostas imunológicas do hospedeiro é determinante para o desfecho das leishmanioses (Costa-Da-Silva et al., 2022). A resposta imune inata é a primeira a ser ativada no sítio de infecção. Durante o repasto sanguíneo, formas promastigotas e componentes salivares do flebotomíneo interagem com diversos componentes do plasma sanguíneo do hospedeiro. Em conjunto, o inóculo gera vasodilatação, inibição da coagulação e imunomodulação. De acordo com estudos em camundongos infectados, os neutrófilos são as primeiras células do sistema complemento a serem ativadas e seu papel pode ser benéfico ou prejudicial. Em hospedeiros susceptíveis, a presença dos neutrófilos é persistente, enquanto o recrutamento em animais resistentes retorna aos níveis basais em 72 horas (Filardy; Pires; Dos reis, 2011). Os parasitos desenvolveram ao longo do tempo diversos mecanismos de proteção e sobrevivência às células do sistema complemento como indução da biogênese do fagolisossoma, prevenção do estresse oxidativo e atraso do apoptose de neutrófilos. Em resposta, os neutrófilos infectados produzem uma variedade de quimiocinas e citocinas para o recrutamento de outras células fagocitárias como IL-8 (Charmoy et al., 2016).

Os macrófagos são um exemplo de classe celular recrutada e desempenham um papel fundamental no processo de infecção. No interior dessas células, as formas promastigotas metacíclicas são capazes de se diferenciar em amastigotas e sofrer replicação. Dessa forma, os macrófagos correspondem ao principal reservatório de *Leishmania in vivo* (Costa-Da-Silva et al., 2022). Os fatores de virulência expressos na forma amastigota são a principal ferramenta para garantir a sobrevivência e proliferação do parasito. Dentre eles, a cisteíno protease B (CPB) é capaz de modular a expressão de fatores como STAT-1 e AP-1, além de reduzir a produção de óxido nítrico induzida por IFN- $\gamma$  (Abu-Dayyeh et al., 2010; Silva-Almeida et al., 2012). Esse conjunto de eventos bioquímicos atua como um “*feedback*” negativo da resposta imune Th1, confirmado através de ensaios que demonstram a ausência da produção de IL-12 por macrófagos infectados (Belkaid; Butcher; Sacks, 1998; Siqueira-Neto et al., 2018). A resposta Th1 é considerada fundamental para a resistência à infecção por *Leishmania* e sua inibição favorece o surgimento dos sinais e sintomas desse grupo de doenças (Shahi et al., 2013).

A quantidade de vias biológicas que participam do ciclo de infecção das leishmanioses demonstra que fármacos eficientes devem ser capazes de gerar diversos

efeitos farmacológicos. Nesse contexto, surgiu a estratégia de desenvolvimento de fármacos multialvo. Essa ferramenta se baseia na complexidade de diversas doenças e considera os protótipos que agem em um único alvo insuficientes para alcançar os efeitos terapêuticos desejados (Löscher, 2021). De fato, o estudo de compostos multialvo tem sido relatado como uma importante ferramenta para a descoberta de novos fármacos mais eficientes e seguros para o tratamento das leishmanioses (De Carvalho et al., 2020). De modo geral, esses compostos vêm atraindo cada vez mais atenção nas últimas décadas. Entre os anos de 2015-2017, 23% de todas as novas entidades químicas aprovadas pelo FDA tem características multialvo (Figura 10). Comparando com anos anteriores, houve um aumento significativo da aprovação dessa classe de protótipos (Ramsay et al., 2018).



**Figura 10:** Distribuição por classes de novas entidades moleculares aprovadas pela FDA de 2015 a 2017.  
Fonte: Adaptado de Ramsay et al. (2018)

## 8 A fitoquímica como fonte de novos compostos multialvo

Historicamente, a fitoquímica aplicada à prospecção de produtos naturais é considerada uma importante fonte de moléculas bioativas. O uso de plantas medicinais tem grande valor na medicina popular pela vasta quantidade de constituintes com potencial atividade terapêutica (Kessler; Kalske, 2018). De acordo com a OMS, cerca de 40% da população já fez uso de medicamentos derivados de plantas para o tratamento de diversas doenças (WHO, 2002) Em países emergentes, onde a dificuldade de acesso a medicamentos sintéticos é constante, a utilização de plantas medicinais pode chegar a até 80% (Tsobou; Mapongmetsem; Van Damme, 2016). Essa alta capacidade farmacológica é atribuída à presença de metabólitos secundários que são constituintes químicos produzidos e armazenados em diversas estruturas específicas como vacúolos, glândulas especializadas e tricomas. A produção desses compostos é afetada de forma direta por

fatores ambientais, como mudanças climáticas ou presença de patógenos. Essa influência é explicada pela importante função que os metabólitos secundários exercem na interação entre as plantas e o meio ambiente, sendo responsáveis por vários mecanismos de proteção (Gonçalves; Romano, 2018).

Dada a relevância terapêutica, os metabólitos secundários são utilizados como compostos protótipos há décadas. Em 2018, os produtos naturais representaram 18% de todos as entidades químicas aprovadas pelo FDA (De La Torre; Albericio, 2019). Indiretamente, esses compostos também são responsáveis por quase 50% de todos os fármacos em uso clínico (Patridge et al., 2016). Contudo, a elucidação do perfil químico e farmacológico de fontes naturais ainda deve ser fortemente incentivada. A investigação sistemática da presença de compostos de interesse terapêutico é estimada em apenas 5-15%. Essa porcentagem demonstra que a biodiversidade química dos biomas é ainda pouco explorada como fonte de potenciais protótipos (De Luca et al., 2012; Monteiro, 2017).

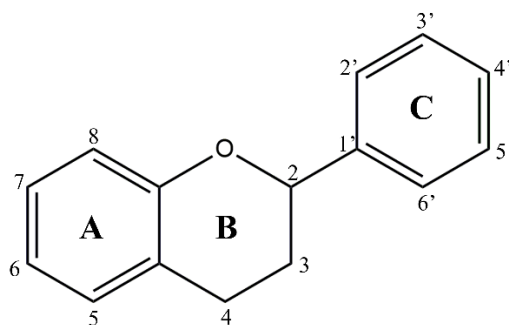
O avanço das pesquisas e interesse em compostos com características multialvo podem representar o incentivo necessário para o aumento dos estudos envolvendo produtos naturais. Os diversos grupos de metabólitos secundários já foram relatados como inibidores de inúmeros alvos moleculares. Essas moléculas são, portanto, capazes de combater diferentes doenças através de uma série de efeitos biológicos (Kessler; Kalske, 2018; Ponticelli et al., 2023). Considerando o tratamento das leishmanioses, flavonoides como apigenina (Fonseca-Silva et al., 2013), quercetina (Fonseca-Silva et al., 2015) e epigallocatequina-3-galato (INACIO et al., 2014) foram amplamente reportadas pela atividade antileishmania frente às formas promastigota e/ou amastigota. Esses compostos foram capazes de aumentar a concentração de espécies reativas de oxigênio, causando disfunção mitocondrial e morte celular. Uma atividade semelhante foi encontrada após o tratamento de formas promastigotas com diferentes concentrações de carajurina e amentoflavona, uma antocianidina e um biflavonoide (Rizk et al., 2022; Silva-Silva et al., 2022). Catequina, epicatequina e fisetina são outros exemplos de compostos que foram capazes de reduzir a parasitemia em animais e modular o sistema imune do hospedeiro (Carter et al., 2021). Diversos mecanismos já foram investigados para justificar a atividade antileishmania relacionadas aos flavonoides. Dentre eles, inibição de alvos como arginase, tirosina aminotransferase, glicoproteína 63, tripanotiona e CPB foram observadas (Khademvatan et al., 2019; Mercado-Camargo et al., 2020; Sasidharan; Saudagar, 2020). Esse conjunto de dados evidencia a importância

do desenvolvimento de novos compostos antileishmania inspirados na estrutura de metabólitos secundários como os flavonoides.

### 8.1 Flavonoides

Os flavonoides fazem parte de um dos maiores e mais diversificados grupos de metabólitos secundários, sendo marcados por sua ampla distribuição nas plantas, e em geral, baixa toxicidade (Saxena; Saxena; Pradhan, 2012). Moléculas pertencentes à classe foram exploradas ao longo dos anos em estudos de isolamento fitoquímico, síntese e semissíntese para a obtenção de protótipos utilizados contra diversas doenças (Uivarosi; Munteanu; Nițulescu, 2019). O interesse relacionado a essa classe é proveniente do alto potencial biológico dessas moléculas, o que as tornam estruturas privilegiadas. Atividades anti-inflamatórias, antiparasitárias, antiproliferativas e antivirais representam apenas alguns dos exemplos da ação dos flavonoides (Boniface; Elizabeth, 2019).

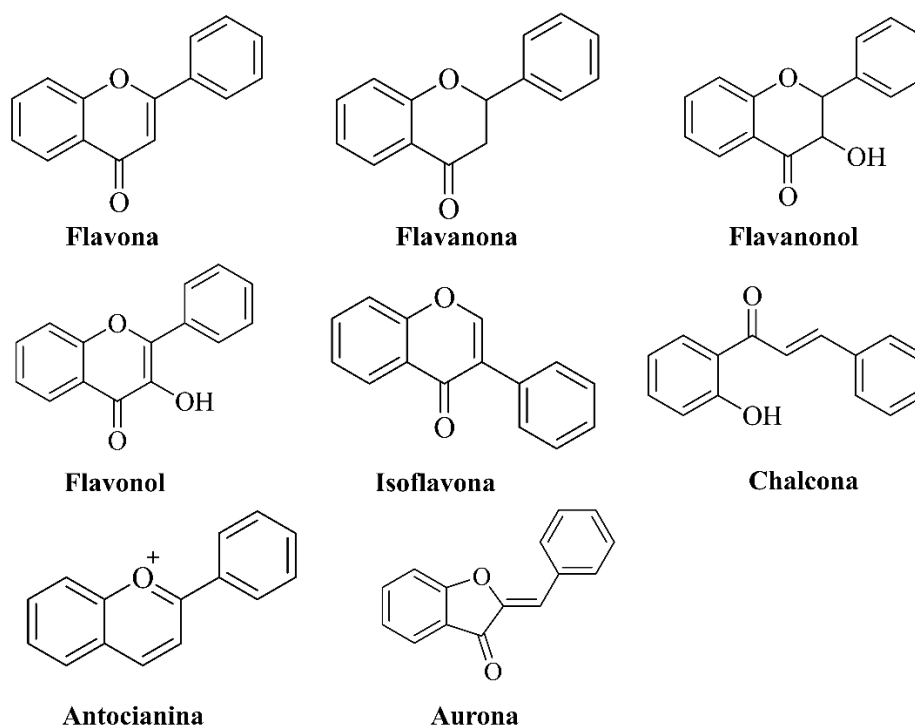
A característica multialvo desses compostos se deve ao grande potencial de variação estrutural reportada para um núcleo básico. O núcleo *flavilium* contém quinze átomos de carbono organizados em três anéis, sendo dois fenólicos (A e C) e um pirano (cadeia heterocíclica B) (Figura 11). A partir desse núcleo fundamental, hidrogenações, hidroxilações, metilações e glicosilações podem ocorrer durante a via de biossíntese dos flavonoides (MACHADO, 2006; PRITHVIRAJ, 2018). Fatores ambientais como aumento do estresse por UV, alterações de salinidade do solo e presença de patógenos são responsáveis pelo direcionamento da biossíntese dessa classe de metabólitos secundários (LIU et al., 2022; WAN et al., 2015).



**Figura 11:** Estrutura química do núcleo *flavilium*.  
Fonte: (Lourenço et al., 2023)

O anel B dos flavonoides é um grande foco de alterações estruturais. Modificações relacionadas à sua insaturação e oxidação são comumente relatadas. A presença ou não de substituintes, como hidroxilas, ligados a esse anel também são marcantes em determinados flavonoides. Considerando a quantidade de possíveis

estruturas a partir do núcleo *flavilium*, o grupo dos flavonoides é dividido nas seguintes subclasses: flavona, flavonol, isoflavona, flavanona, flavanonol, antocianina, aurona e chalconas (De Rijke et al., 2006; Panche; Diwan; Chandra, 2016) (Figura 12).



**Figura 12:** Núcleo básico das subclasses de flavonoides.

Fonte: Adaptado de De Rijke et al. (2006)

No entanto, diversos flavonoides possuem estruturas complexas além de apresentarem desvantagens que dificultam sua eleição como potenciais fármacos. Em meio fisiológico, flavonóis e derivados glicosilados podem sofrer hidrólise pela ação da enzima lactase-florizina hidrolase, encontrada no intestino delgado de mamíferos (Day et al., 2000). A solubilidade de alguns flavonoides também representa um desafio farmacocinético que diminuiu a biodisponibilidade dessas moléculas. Adicionalmente, o isolamento e purificação de metabólitos secundários é considerado um processo laborioso que, por vezes, depende de solventes e métodos tóxicos (Krysa; Szymańska-Chargot; Zdunek, 2022).

Por conseguinte, o uso de produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos enfrenta um declínio apesar das importantes atividades farmacológicas relacionadas (Patridge et al., 2016). Essa redução também se deve ao crescimento da síntese combinatória, planejamento racional de fármacos e processos de triagem de alta produtividade. Combinados, esses fatores levaram a geração de grandes bibliotecas compostas por pequenas moléculas bioativas e, em geral, de reprodução sintética mais viável quando comparada aos produtos naturais (Shen, 2015).



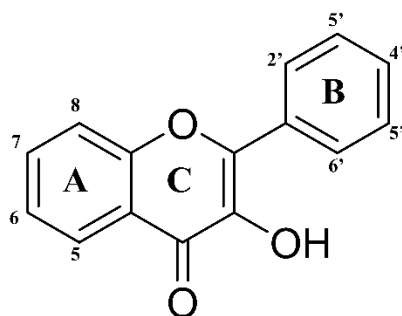
## 9 Síntese de análogos flavonóidicos como novos agentes antileishmania

A síntese orgânica é considerada por muitos uma ciência criativa. O início do planejamento sintético se dá através da escolha de um produto-alvo. Entretanto, os produtos almeçados são, por vezes, complexos e não disponíveis comercialmente. Esses obstáculos são superados através da análise retrossintética que tem como objetivo a simplificação estrutural. Nesse processo, uma determinada molécula-alvo é convertida em estruturas precursoras mais simples que, por sua vez, são novamente simplificadas (Clayden; Greeves; Warren, 2012). Essas etapas são repetidas até a obtenção de materiais de partida pouco complexos e/ou comercialmente disponíveis. O conceito da retrossíntese foi formalizado por E. J. Corey através do livro *The Logic of Chemical Synthesis* e passou a ser o ponto de partida dos estudos sintéticos (Corey, 1991).

Cada etapa retrossintética ocorre a partir da quebra hipotética de determinadas ligações químicas do produto analisado. Contudo, essas quebras conhecidas como desconexões não podem ser aleatórias. O resultado de uma desconexão é a formação de dois ou mais *síntons* que são fragmentos moleculares com polaridades associadas. A análise de cada *sínton* é o que leva à obtenção de moléculas simples que, em conjunto, formam o produto-alvo de cada etapa retrossintética. Sendo assim, a escolha do local de desconexão é crucial, uma vez que é necessário a obtenção de materiais de partida reais capazes de formar a molécula-alvo através de uma reação química possível e conhecida (Clayden; Greeves; Warren, 2012). Considerando as diferentes possibilidades de desconexões em uma mesma estrutura molecular e o grande número de reações químicas elucidadas, nota-se que o caminho gerado pela análise retrossintética não é único. Um produto-alvo pode então ser obtido por diversas reações químicas fruto de diferentes desconexões (Law et al., 2009).

Considerando, o caráter multialvo dos metabólitos secundários e suas atividades relatadas, os flavonóis se destacam como importantes produtos-alvo visando o tratamento da leishmaniose. Além de importantes relatos antileishmania, essa subclasse de flavonoides possui diversas outras atividades associadas (Kamaraj et al., 2022). Os flavonóis também se destacam por serem consideradas moléculas versáteis. A presença de um grupamento hidroxila na posição três do anel C permite diversas modificações estruturais, o que aumenta o número de possíveis análogos provenientes de uma única estrutura básica (Figura 13). A possibilidade de geração de um banco de moléculas

permite a elaboração de estudos de relação estrutura-atividade mais fidedignos. Dessa forma, a versatilidade estrutural dos flavonóis os torna moléculas protótipo ideais. A análise retrossintética dos flavonóis é um exemplo da diversidade de possíveis reações e diferentes estratégias de síntese orgânica para a obtenção de um produto-alvo. O interesse de obtenção desses compostos fez com que novas metodologias sintéticas fossem exploradas ao longo dos anos. Dentre elas, destaca-se: rearranjo de Baker-Venkataraman, síntese de Auwers e reação de Algar-Flynn-Oyamada (Mei; Yuan; Wang, 2015; Pereira; Cidade; Tiritan, 2023).



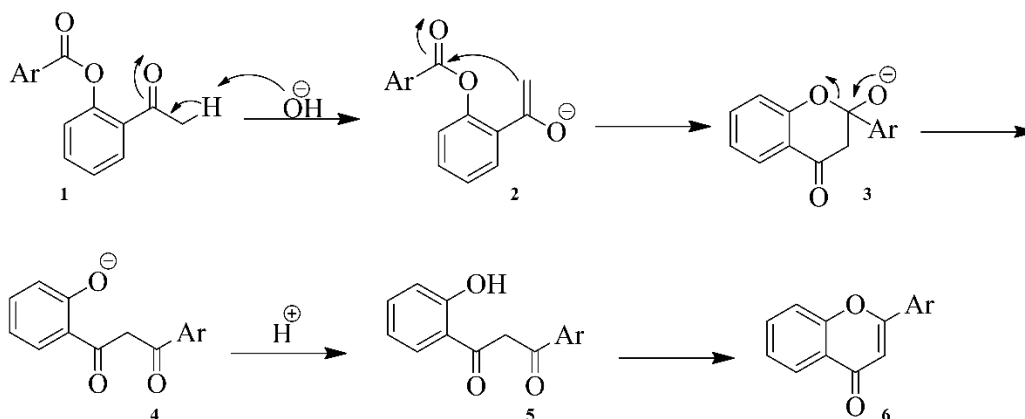
**Figura 13:** Estrutura química básica dos flavonóis.  
Fonte: Autoria própria

### 9.1 Rearranjo de Baker-Venkataraman e a obtenção de compostos *flavonol-like*

Em 1933, o cientista Venkataraman foi responsável pelo desenvolvimento de um importante método para a síntese de flavonas divulgado através do periódico *Current Science* (Kshatriya; Jejurkar; Saha, 2018). Simultaneamente, Wilson Baker delineou uma metodologia semelhante para a obtenção de flavonas e 3-acilcromonas (Baker, 1933). A reação que ambos descreveram separadamente passou a ser conhecida como rearranjo de flavonas de Baker-Venkataraman. A metodologia foi considerada um grande avanço para a síntese de flavonas e foi amplamente utilizada para a obtenção de inúmeras moléculas bioativas. O rearranjo de Baker-Venkataraman continua a ser um dos métodos mais eficazes para síntese desses flavonoides e a partir de sua teoria diversas modificações foram elaboradas para a síntese de novos compostos (Kshatriya; Jejurkar; Saha, 2018).

A obtenção de 1,3-dicetonas a partir de catálise básica de 2-acetoxiacetofenonas é o que marca a reação de rearranjo de flavonas de Baker-Venkataraman. O método atualmente mais aceito como responsável pelo rearranjo é a condensação de Claisen. As condensações tradicionais de Claisen ocorrem intramolecularmente por meio da interação entre os grupos cetona e éster. Nas 2-acetoxiacetofenonas ambas as funcionalidades estão presentes no mesmo anel aromático, tipicamente *orto* entre si. Essa característica estrutural faz com que a condensação de

Claisen consiga ocorrer intramolecularmente (Ameen; Snape, 2015). Posteriormente, a formação da flavona ocorre através de uma ciclização seguida por desidratação comumente realizada através do tratamento de ácidos fortes (Esquema 1).

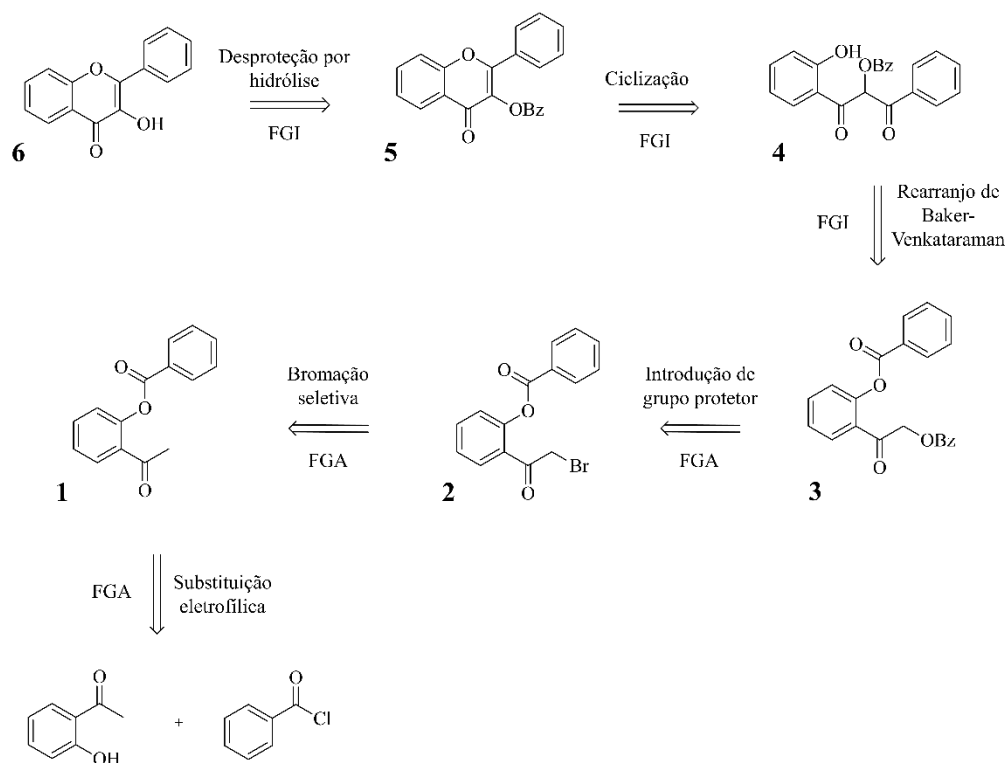


**Esquema 1:** O mecanismo proposto para o rearranjo de Baker-Venkataraman (**1**  $\rightarrow$  **6**).  
Fonte: Adaptado de Ameen; Snape (2015)

De modo detalhado, em um rearranjo clássico de Baker-Venkataraman, ocorre o ataque nucleofílico inicial da base a um dos  $\alpha$ -hidrogênios da metila da cetona aromática (**1**) (Esquema 1). O resultado é a formação do enolato (**2**) que atua no ataque intramolecular ao centro eletrofílico da carbonila do éster para formação do intermediário **3**. Posteriormente, ocorre uma deslocalização eletrônica que favorece a formação do fenolato (**4**) mais estável. Por fim, o produto 1,3-dicetona (**5**) é obtido através de uma extração em meio ácido.

Considerando que o produto almejado após o rearranjo de Baker-Venkataraman é uma flavona, diversos estudos foram incentivados para que modificações permitissem a obtenção de flavonóis. Dentre eles, Fougrouse e colaboradores propuseram a inserção de um grupo protetor para a obtenção da hidroxila característica da estrutura dos flavonóis (Fougrouse; Gonzalez; Brouillard, 2000) (Esquema 2).

Contudo, a metodologia desenvolvida acrescenta 4 etapas a mais que o método clássico de Baker-Venkataraman. Em termos experimentais, isso resulta em um processo laborioso e com menor rendimento global do produto-alvo, reduzindo a sustentabilidade do processo.

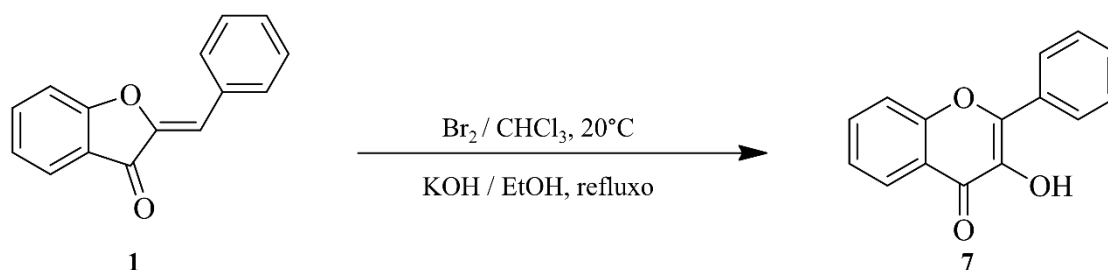


**Esquema 2:** Esquema de retrosíntese para obtenção de flavonóis com base no rearranjo de Baker-Venkataraman.

Fonte: Adaptado de Fougrousse; Gonzalez; Brouillard (2000)

## 9.2 A metodologia sintética de Karl von Auwers

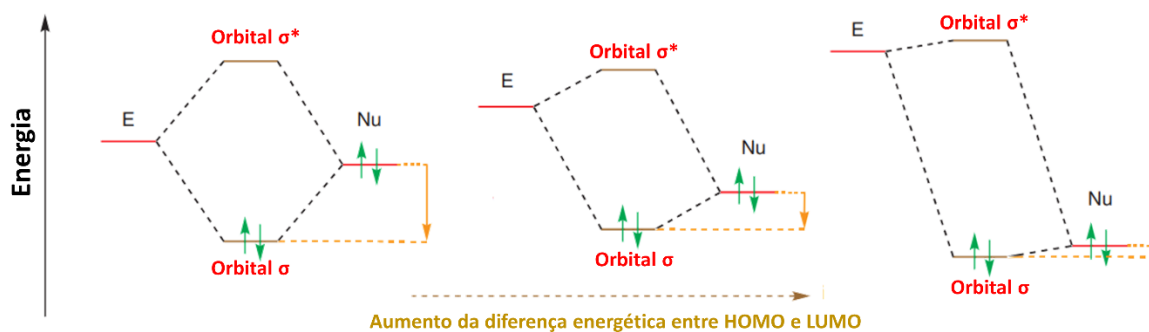
O interesse na obtenção de flavonóis foi divulgado décadas anteriores à elaboração da metodologia do rearranjo de Baker-Venkataraman e, portanto, possui metodologias de síntese mais direcionadas. Em 1908, Karl von Auwers reportou a primeira metodologia de síntese de 3-hidroxi-flavonas. Para isso, o material de partida utilizado foi uma aurona (**1**). Este composto, também classificado como um flavonoide, é submetido à uma bromação em carbonos  $sp^2$  seguido de tratamento com solução etanólica de KOH para obtenção dos flavonóis (**7**) (Kshatriya; Jejurkar; Saha, 2018) (Esquema 3).



**Esquema 3:** Síntese de flavonóis através da metodologia de Karl Von Auwers.  
Fonte: Adaptado de Kshatriya; Jejurkar; Saha (2018)

A bromação, primeira etapa da síntese de Auwers, trata-se de uma reação de adição eletrofílica amplamente conhecida. A molécula de bromo ( $\text{Br}_2$ ) possui coloração castanha e participa de um teste de identificação clássico de alcenos. Ao entrar em contato com esses hidrocarbonetos insaturados, a solução aquosa e castanha de bromo se torna incolor. O resultado do teste de identificação comprova que os alcenos reagem com a solução de  $\text{Br}_2$  formando um novo composto sem coloração, os dibromoalcanos (Clayden; Greeves; Warren, 2012).

A reação química é explicada através da interação entre orbitais moleculares. Nesse tipo de reação, é necessário que um reagente possua um orbital molecular de baixa energia desocupado (LUMO) e o outro composto apresente um orbital molecular ocupado (HOMO). Respectivamente, as moléculas com essas características são reconhecidas como eletrófilo e nucleófilo. O resultado da interação entre o LUMO de um eletrófilo e o HOMO de um nucleófilo é formação de dois novos orbitais moleculares ( $\sigma$  e  $\sigma^*$ ). Em uma reação química bem-sucedida, a ocupação do novo orbital molecular ligante ( $\sigma$ ) representa um aumento de estabilidade pela diminuição energética de  $\sigma$ . Logo, quanto maior a diminuição energética do orbital  $\sigma$  formado, mais favorável é a reação. Para isso, é necessário que LUMO e HOMO dos reagentes envolvidos sejam energeticamente semelhantes (Clayden; Greeves; Warren, 2012) (Figura 14).

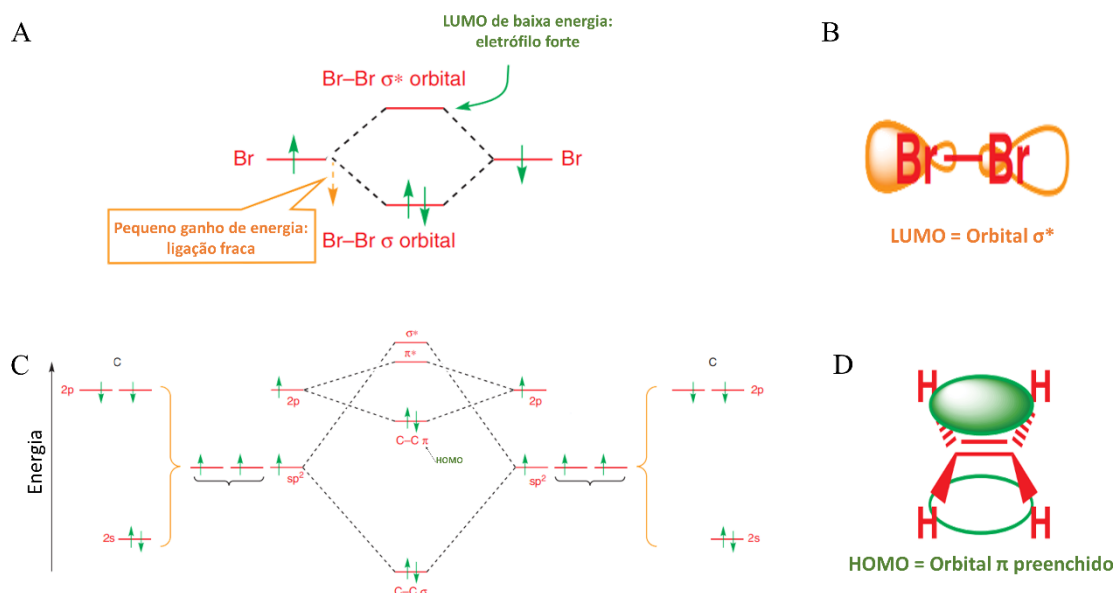


**Figura 14:** Interação de LUMO (E) e HOMO (NU) com diferentes energias e formação de orbitais moleculares  $\sigma$  e  $\sigma^*$ .

Fonte: Adaptado de Clayden; Greeves; Warren (2012)

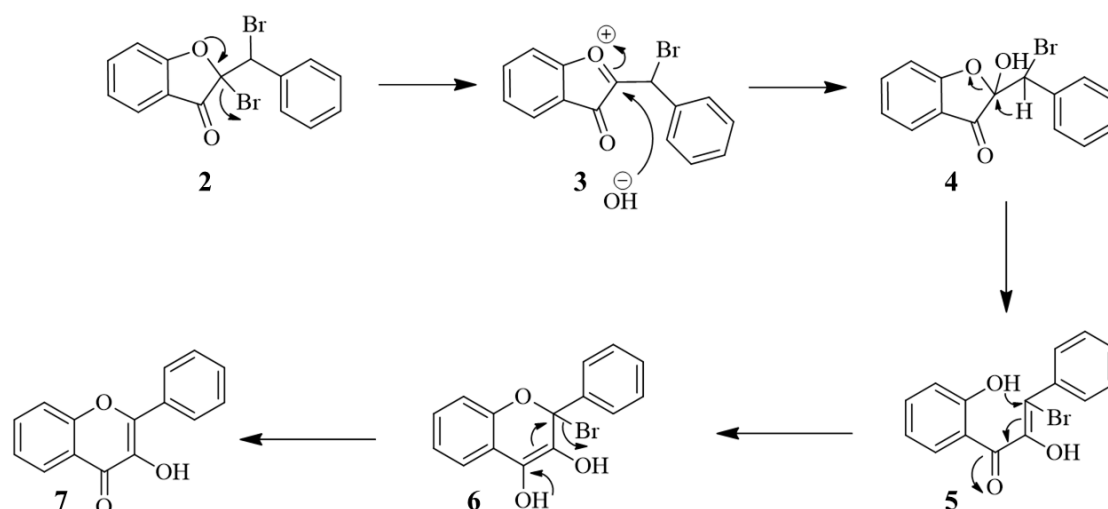
Na reação de adição eletrofílica de alcenos, o  $\text{Br}_2$  atua como eletrófilo. Apesar do bromo ser menos eletronegativo que outros halogênios, seu núcleo é volumoso. Para a formação de ligações moleculares, os orbitais atômicos 4s e 4p são envolvidos. Esses orbitais são grandes e difusos, resultando em uma difícil e ineficiente sobreposição. Dessa forma, o orbital molecular ligante de  $\text{Br}_2$  não possui uma diminuição de energia relevante quando comparado com os orbitais atômicos do bromo, tornando a ligação  $\sigma$  fraca (Figura

15A). Além disso, o orbital molecular antiligante ( $\sigma^*$ ) não possui elevada energia, favorecendo o preenchimento de elétrons e tornando o  $\text{Br}_2$  um forte eletrófilo (Figuras 15A e 15B). Em contrapartida, os alcenos possuem como orbital molecular ocupado de menor energia o  $\pi^*$  e, por isso, podem atuar como nucleófilos em uma reação química (Clayden; Greeves; Warren, 2012) (Figuras 15C e 15D).



**Figura 15:** Diagramas de orbitais moleculares de  $\text{Br}_2$  e alcenos (A e C, respectivamente) e suas representações moleculares (B e D, respectivamente).  
Fonte: Adaptado de Clayden; Greeves; Warren (2012)

Contudo, o produto da bromação dos carbonos  $\text{sp}^2$  da airona não é estável (**2**) e a deslocalização eletrônica envolvendo o oxigênio favorece a eliminação de um dos átomos de bromo. O resultado é a formação de um intermediário no qual a posição  $\alpha$  à carbonila se torna um centro eletrofílico após deslocalização eletrônica envolvendo a ligação dupla do anel diretamente ligado ao benzeno (**3**). A reação de Auwers segue a metodologia *one-pot* e a formação do flavonol depende do ataque nucleofílico ao centro eletrofílico desse intermediário. O nucleófilo que participa dessa etapa é o ânion hidróxido proveniente da dissociação de  $\text{KOH}$  utilizada na segunda etapa da reação (Esquema 4). O ataque nucleofílico em condições alcalinas gera uma  $\alpha, \beta$  cetona insaturada (**5**) que posteriormente sofre ciclização seguida da eliminação do bromo para formação do flavonol.

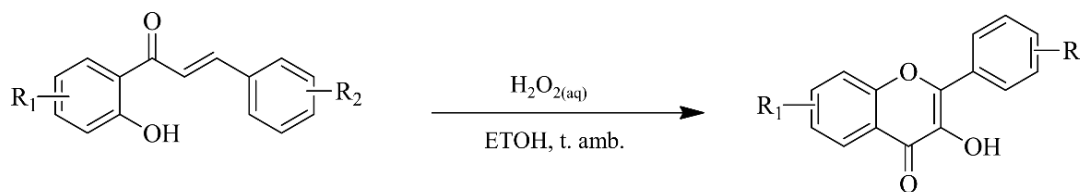


**Esquema 4:** Mecanismo reacional da metodologia para obtenção de flavonóis de Karl von Auwers.  
Fonte: Adaptado de Kshatriya; Jejurkar; Saha (2018)

### 9.3 A síntese de flavonóis através da metodologia de Algar-Flynn-Oyamada (AFO)

A formação *in situ* de uma cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada na metodologia de Auwers demonstrou a possibilidade de utilizar esses compostos como materiais de partida. Inspirados pela ideia, diferentes pesquisadores propuseram uma nova rota sintética mais rápida e fácil para a obtenção de flavonóis (Oyamada, 1935). Assim como as auronas, cetonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas representam um grande subgrupo de flavonoides. Além de amplamente utilizadas como reagentes na síntese orgânica, as chalconas atraem grande interesse na química medicinal por suas diversas atividades terapêuticas e, em geral, baixa toxicidade. Por isso, vários análogos sintéticos e semissintéticos desse subgrupo de flavonoides já foram aprovados para o uso clínico aplicado à diferentes doenças (Zhuang et al., 2017).

A obtenção de flavonóis através da metodologia de Algar-Flynn-Oyamada se baseia na ciclização oxidativa de derivados de chalcona (Oyamada, 1935). Para a ciclização intramolecular é necessário que todos esses derivados utilizados como materiais de partida possuam um substituinte hidroxila na posição *orto* à carbonila. A reação proposta ocorre em meio etanólico sob temperatura ambiente e adição de  $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq.})$  como agente oxidante (Esquema 5). Ao longo do tempo, a versatilidade dessa reação foi confirmada e, por isso, tornou-se o método de obtenção de derivados de flavonóis mais utilizado por grupos de pesquisa e indústrias farmacêuticas (Bhattacharyya; Hatua, 2014).

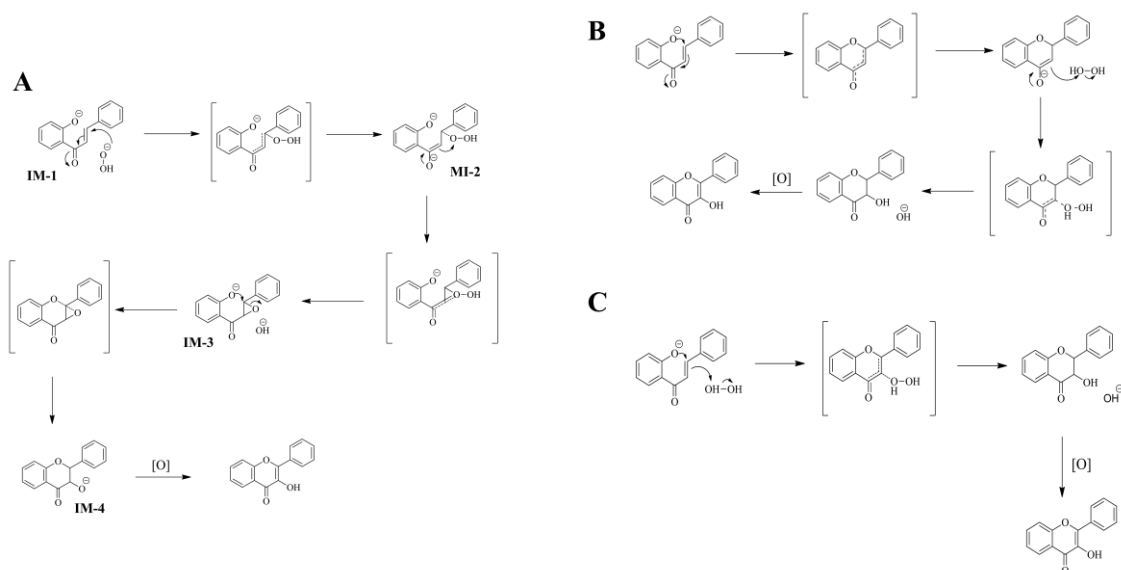


**Esquema 5:** Síntese de flavonóis através da metodologia de Algar-Flynn-Oyamada.  
Fonte: Adaptado de Oyamada (1935)

Através dessa metodologia, a síntese de flavonóis ocorre em apenas uma etapa sintética, mas o mecanismo da obtenção desses compostos é complexo. Após a descoberta da reação de Algar-Flynn-Oyamada em 1935, diversos estudos experimentais e computacionais foram realizados para elucidar as etapas reacionais e intermediários envolvidos na síntese dos flavonóis. Mesmo com o volumoso número de tentativas, o mecanismo reacional ainda não foi totalmente elucidado (Bhattacharyya; Hatua, 2014; Shen et al., 2017).

Inicialmente, acreditava-se que a obtenção de flavonóis pela reação AFO se daria a partir da formação de um epóxido como intermediário chave. Um ataque  $\beta$  seria responsável pela abertura do anel, gerando uma 3-hidroxi-flavonona que sofreria oxidação na etapa final (Bhattacharyya; Hatua, 2014; Gormley; O'sullivan, 1973) (Esquema 6A). Posteriormente, Dean e Podimunag divulgaram uma nova proposta de mecanismo reacional que foi de encontro ao anteriormente postulado. Segundo esse estudo, uma epoxidação de reagentes como 2-hidroxi-chalconas seria improvável (Dean; Podimuang, 1965). Em meios fortemente alcalinos como na reação AFO, os derivados de 2-hidroxi-chalconas são convertidos em ânions, gerando uma repulsão eletrônica ao ânion hidroperóxido. O estudo exposto por Dean e Podimunag propôs então que a formação dos flavonóis ocorreria a partir de uma ciclização intramolecular seguida de oxidação (Bhattacharyya; Hatua, 2014; Dean; Podimuang, 1965) (Esquema 6B). Além disso, uma proposta mais simples de mecanismo foi sugerida, na qual haveria uma ciclização e hidroxilação de forma simultânea (Esquema 6C) (Bhattacharyya; Hatua, 2014).



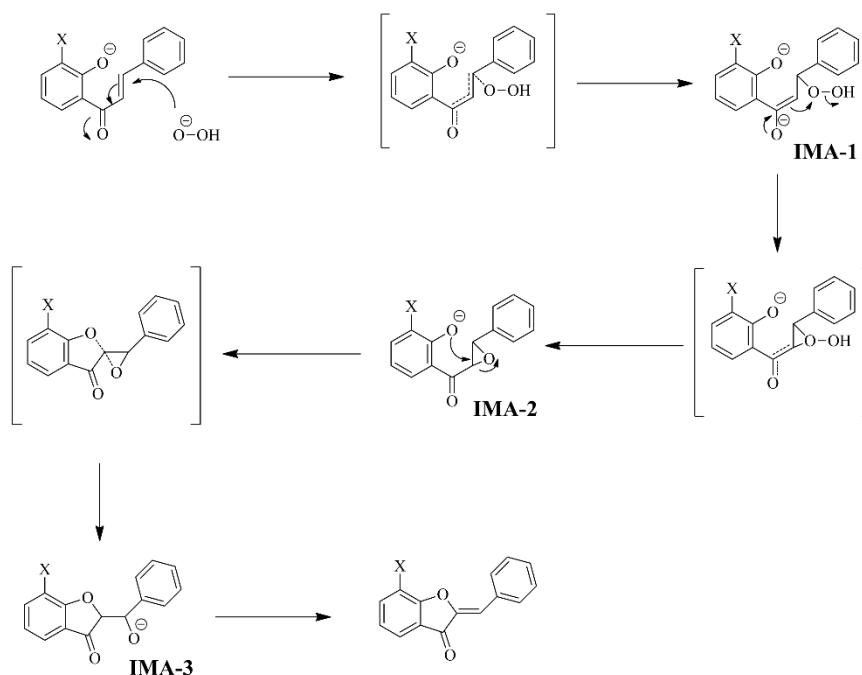


**Esquema 6:** Mecanismos propostos para obtenção de derivados de flavonol através da reação AFO.  
 Fonte: Adaptado de Bhattacharyya; Hatua (2014)

Com os avanços das metodologias de química computacional, os mecanismos reacionais já propostos para a síntese de Algar-Flynn-Oyamada foram analisados. Sendo assim, cada intermediário formado nos diferentes mecanismos foi submetido à cálculos energéticos envolvendo conceitos quânticos como a teoria do funcional da densidade (DFT) (Bhattacharyya; Hatua, 2014). Os resultados corroboraram com a hipótese de Dean e Podimunag, demonstrando que a formação de um epóxido é pouco válida. Nas condições da metodologia da síntese AFO, a obtenção de um epóxido ocorre através de uma adição de Michael. Essas reações são caracterizadas por um ataque nucleofílico, em geral de um carbânion, a um composto carbonil  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado (DAS et al., 2020). Aplicando o conceito à reação AFO, o ânion hidropéroxido atua como um nucleófilo atacando a ligação dupla  $C_{\alpha}=C_{\beta}$  da 2-hidroxicalcona. No estado de transição de formação do epóxido, o íon hidropéroxido, em uma distância de 2,4 Å, causaria um alongamento da ligação  $C_{\alpha}=C_{\beta}$  considerado o estado fundamental da chalcona. O alongamento de 0,01 Å é o suficiente para que a energia necessária para a obtenção do epóxido seja muito alta (56,73 kcal/mol) e a formação do intermediário (**IM-1**) seja desfavorável (Esquema 6A). Para que tal energia seja alcançada seria necessário a utilização de altas temperaturas, o que não é compatível com as condições reacionais determinadas pela síntese AFO. Em contrapartida, o mesmo estudo computacional demonstrou diferenças energéticas pouco relevantes entre os dois outros mecanismos reacionais propostos para a formação de flavonóis (Esquema 6B e 6C) (Bhattacharyya; Hatua, 2014). Consequentemente, ainda existem dois possíveis mecanismos vigentes para

a obtenção de derivados de flavonois e as etapas responsáveis pela formação produto da síntese AFO permanecem pouco conhecidas.

A publicação de outros estudos envolvendo a síntese AFO comprovam a necessidade de uma elucidação mais detalhada do mecanismo da reação. Dentre alguns desses resultados, ao utilizar 2-hidroxicalconas substituídas na posição 6, derivados de flavonois não foram obtidos (Nigam; Jayashree, 2017; Shen et al., 2017). Nesses casos, análogos de auroa foram identificados como os produtos majoritários. Curiosamente, o mecanismo de reação mais aceito para a obtenção das auronas envolve a formação de um epóxido. A abertura do anel após a formação do intermediário epóxido é a etapa que determina a obtenção de auronas ou flavonois. No caso da formação de auronas, a abertura do anel ocorre através de um ataque intramolecular ao carbono  $sp^2$  na posição  $\alpha$  à carbonila. O intermediário formado após essa etapa reacional (**IMA-2**) demonstrou ser aproximadamente 2 vezes menos energético que o obtido a partir do ataque na posição  $\beta$  à carbonila (Esquema 7). Essa diferença energética prova que nos casos em que ocorre a epoxidação via adição de Michael, a auroa é o produto mais provável (Bhattacharyya; Hatua, 2014). É importante destacar que as auronas foram obtidas somente quando metoxila ou metila representavam o grupo substituinte na posição 6 das 2-hidroxicalconas. As dúvidas acerca do mecanismo reacional da metodologia AFO representam um obstáculo para compreender a influência na reatividade imposta por esses grupamentos. Até o momento, acredita-se que a diferença de reatividade está relacionada à doação de densidade eletrônica característica de grupos como metila e metoxila (Nigam; Jayashree, 2017; Pai; B.S, 2022). Além disso, apesar da possibilidade de formação de uma auroa, a maior estabilidade dos flavonois é notória, o que faz com que a síntese AFO ainda seja considerada o método mais rápido e direcional para a obtenção de análogos desse subgrupo de flavonoides (Bhattacharyya; Hatua, 2014).



**Esquema 7:** Formação de auronas através da reação de Algar-Flynn-Oyamada.

Fonte: Adaptado de Bhattacharyya; Hatua (2014)

## 10 Escolha de um método de síntese

A grande quantidade de métodos sintéticos capazes de gerar o mesmo produto alvo faz com que o delineamento experimental se torne uma etapa chave para o estudo. A escolha de uma metodologia deve seguir diferentes aspectos que vão desde a análise da complexidade da síntese até a consideração de um potencial biológico também dos materiais de partida (Schick-Makaroff et al., 2016). Adicionalmente, o uso de métodos sustentáveis é cada vez mais estimulado e a síntese sustentável defendida pela química verde envolve diferentes aspectos. É necessário, portanto, que um composto seja obtido não apenas através do emprego de solventes pouco tóxicos, mas também por metodologias com a menor quantidade de etapas possível e baixo gasto energético (Kar et al., 2022).

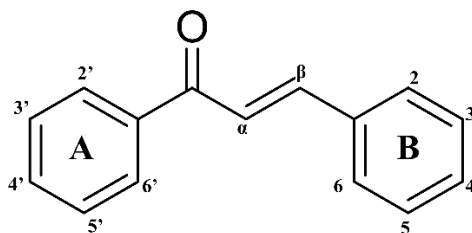
Considerando a obtenção de flavonóis, a síntese AFO é a única na qual a formação do produto alvo ocorre de forma direta, através de apenas uma etapa reacional. Além de reduzir os gastos energéticos, a diminuição de etapas reduz tempo e custos laboratoriais e tem impacto direto no aumento do rendimento global do produto. O alto rendimento de análogos de flavonóis é confirmado por meio da ampla divulgação de estudos que utilizaram a síntese AFO para formação desses derivados (Ahn et al., 2023; Borsari et al., 2019). No contexto das DTNs, a obtenção de compostos potencialmente ativos com menor custo de síntese e altos rendimentos é uma importante ferramenta no

descobrimiento de protótipos mais acessíveis. Assim sendo, a metodologia AFO é, de fato, válida para a síntese de análogos de flavonóis visando o combate às DTNs como as leishmanioses.

Os materiais de partida utilizados na reação também devem ser analisados. Em determinados casos, moléculas mais simples empregadas como reagentes podem apresentar potencial farmacológico assim como os produtos-alvos. É o caso das chalconas, materiais de partida da síntese AFO, que possuem reconhecida atividade antileishmania (Espinoza-Hicks et al., 2019). De modo semelhante ao que acontece com os flavonóis, as chalconas são consideradas multialvo e o mecanismo de ação responsável por sua capacidade antileishmania não é completamente elucidado. Derivados desses compostos já foram reportados como inibidores de alvos como arginase, cisteino proteases e tripanotiona redutase (Ferraro et al., 2016; Garcia et al., 2021; Lourenço et al., 2023; Osman et al., 2022).

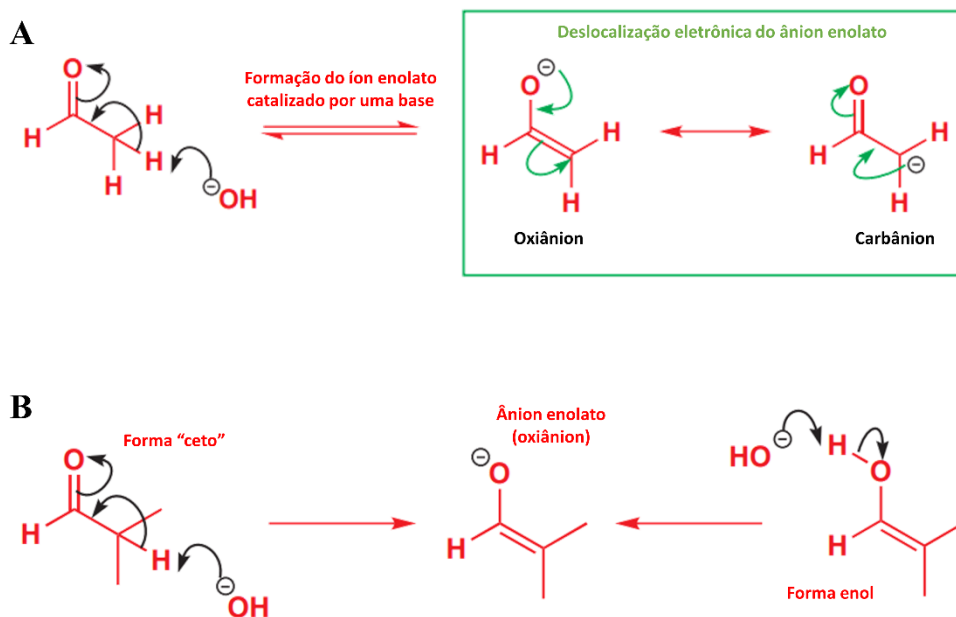
## 11 Síntese de chalconas através da condensação de Claisen-Schmidt

A reação de condensação aldol entre um aldeído e uma cetona em presença de base ou ácido foi relatada pela primeira vez em 1881. A descrição dessa reação de forma independente por dois pesquisadores fez com que ficasse conhecida como condensação de Claisen-Schmidt (CSC) (Claisen; Claparède, 1881; Schmidt, 1881). Entre 2012-2018, uma média de 200 artigos por ano utilizaram a metodologia CSC. O número foi consideravelmente maior que em anos anteriores, demonstrando o aumento do interesse pela síntese de compostos marcados por uma ligação C-C. O exemplo de aplicação mais frequente do método CSC é na formação de chalconas dada a importância sintética e biológica dessas moléculas (Yadav; Wagh, 2020). As chalconas são caracterizadas pela presença de dois anéis aromáticos conectados entre si por um grupo carbonil  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado e já foram obtidas por diversas metodologias sintéticas (Zhuang et al., 2017) (Figura 16). Dentre elas é possível citar: reação de acoplamento de Heck, reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura, reações de Friedel-Crafts, reação de acoplamento de Sonogashira, reação de deuteração e olefinação de Julia-Ko-Cienski. Contudo, a metodologia CSC ainda é considerada o método mais conveniente de obtenção de chalconas por sua facilidade e eficiência de formação de ligações duplas entre átomos de carbono (Yadav; Wagh, 2020).



**Figura 16:** Estrutura química básica das chalconas.  
Fonte: Autoria própria

Uma característica marcante da reação de condensação de CSC é o uso de um reagente contendo  $\alpha$ -hidrogênio. Esses átomos são diretamente ligados ao carbono localizado na posição  $\alpha$  relativa à um grupo carbonila, e, portanto, possuem características específicas como uma acidez incomum ( $pK_a = 19-20$ ). A presença de um carbono e oxigênio, ambos com hibridização  $sp^2$ , faz com que, em ambiente alcalino, o íon enolato seja estabilizado por deslocalização eletrônica com conjugação do orbital  $\pi$  do grupo carbonila (Figura 17A). Assim sendo, o aumento da acidez dos  $\alpha$ -hidrogênios, deve-se a estabilidade do íon enolato que também é a base conjugada do enol formado através do tautomerismo ceto-enol (Figura 17B) (Clayden; Greeves; Warren, 2012).

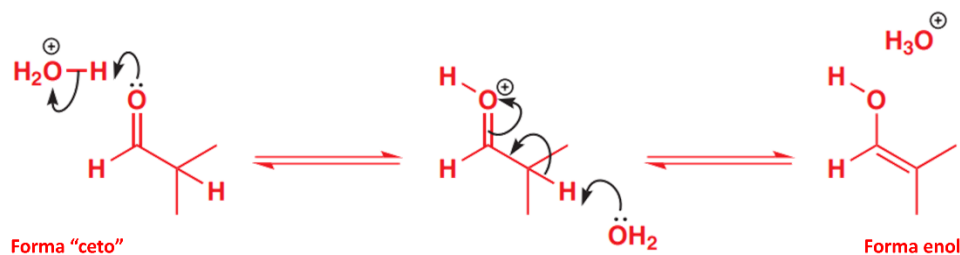


**Figura 17:** Deslocalização eletrônica do ânion enolato (A) e formação do íon enolato através das formas tautoméricas ceto e enol do composto acetaldeído em meio alcalino.

Fonte: Adaptado de Clayden; Greeves; Warren (2012)

A formação de um íon a partir de uma cetona pode também ser catalisada por um ácido de Lewis. Sabendo disso, alguns estudos propuseram modificações nas condições clássicas da reação CSC ao alterarem o catalisador da reação. De modo geral, as reações utilizando catálise ácida apresentaram também rendimentos bons a excelentes

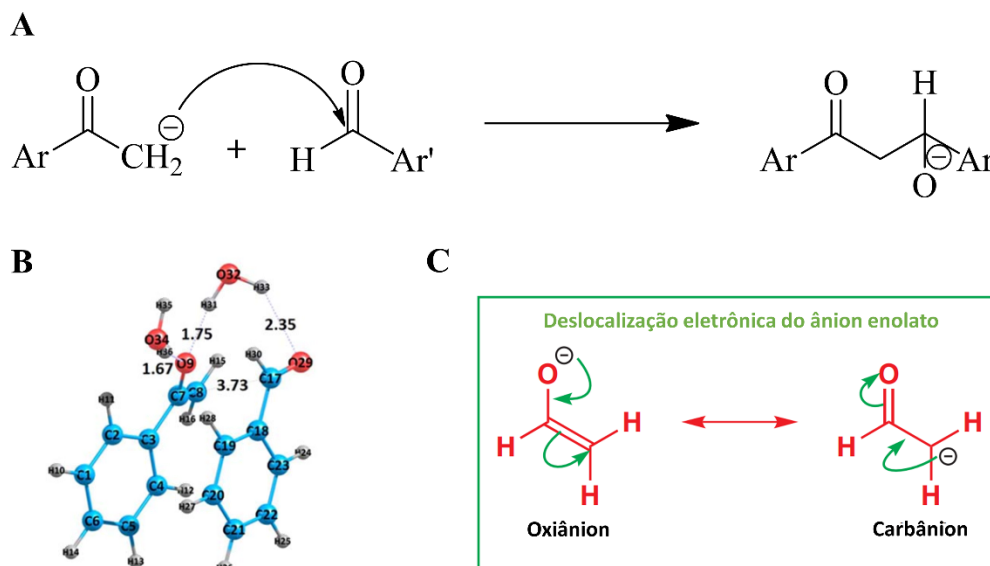
das chalconas sintetizadas (Halpani; Mishra, 2020; Murugesan et al., 2023; Qian; Liu; Lv, 2011). Nesse caso, os  $\alpha$ -hidrogênio não participam da formação do íon que ocorre após um ataque do oxigênio da carbonila (centro nucleofílico) ao próton do ácido utilizado (Figura 18) (Clayden; Greeves; Warren, 2012). Contudo, a obtenção de chalconas visando a utilização como material de partida na síntese AFO apresenta uma particularidade. Para a síntese de derivados de flavonol, as chalconas utilizadas devem ser substituídas por um grupamento hidroxila na posição orto à carbonila. A ligação de hidrogênio intramolecular entre o grupamento hidroxila e carbonila resulta em um aumento ainda maior da acidez dos  $\alpha$ -hidrogênios da cetona. Na presença de uma base essa característica química auxilia então na geração de um ânion enol de ataque forte, fazendo com que a catálise básica forneça melhores rendimentos na obtenção de derivados de flavonol (Wang et al., 2017).



**Figura 18:** Formação de íon de uma cetona em meio ácido.  
Fonte: Adaptado de Clayden; Greeves; Warren (2012)

Com a formação do íon enolato ocorre a primeira etapa da reação de obtenção das chalconas. Nessa etapa, acontece um ataque do íon da acetofenona ao carbono da carbonila presente no aldeído (Figura 19A). Para que essa etapa ocorra é necessário que os reagentes estejam em uma distância considerada ótima para a interação de seus orbitais moleculares. Estudos computacionais propuseram que o íon da acetofenona e o benzaldeído se arranjam em paralelo. Um importante detalhe da interação entre esses dois reagentes é que uma molécula de água faz parte do estado de transição da etapa, formando um interessante complexo. Os hidrogênios da molécula de água atuam como doadores de ligação de hidrogênio e conseguem fazer uma ponte entre os reagentes através de interações intermoleculares com o oxigênio da carbonila de ambos os materiais de partida (Figura 19B). A posição em paralelo dos reagentes é então estabilizada (Enchev; Mehandzhiyski, 2017). Essa é a etapa mais lenta e, por isso, considerada a limitante da reação CSC. Isso se deve ao fato de que o ataque ao centro eletrofílico da carbonila do benzaldeído é feito pelo carbânion da acetofenona. Uma vez que a deslocalização

eletrônica ocorre para estabilizar o íon enolato, o oxiânion é a forma mais estável já que a densidade eletrônica é maior em átomos eletronegativos (Clayden; Greeves; Warren, 2012) (Figura 19C). Como consequência a porcentagem de carbânion no meio é menor e a etapa é dificultada.

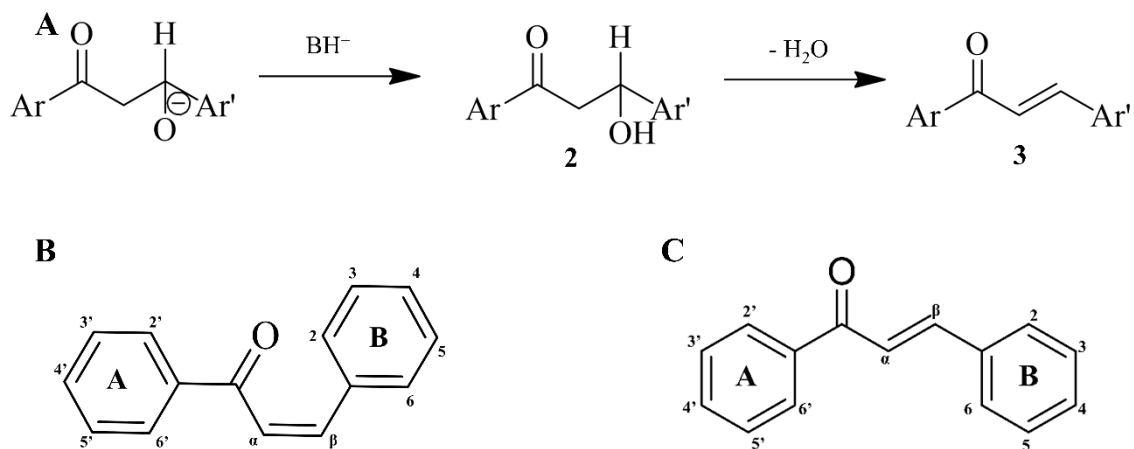


**Figura 19:** Primeira etapa de reação CSC (A), seu complexo (B) e a deslocalização eletrônica do íon enolato no meio reacional (C).

Fonte: Adaptado de Enchev; Mehandzhiyski (2017); Clayden; Greeves; Warren (2012)

A segunda etapa da reação é a formação de um cetol (**2**) através da transferência de um próton ao oxigênio do intermediário formado na etapa anterior. Adicionalmente, ocorre também a regeneração da base utilizada como catalisador da reação CSC (Figura 20A). Diferente da primeira etapa, a formação do cetol tem energia de ativação estimada em apenas 0,38 kcal/mol, indicando que se trata de intermediário de obtenção extremamente rápida e favorável (Enchev; Mehandzhiyski, 2017). A última etapa é marcada por um processo de desidratação e é fundamental para a formação da ligação dupla (**3**) (Figura 20A) (Enchev; Mehandzhiyski, 2017; Perrin; Chang, 2016). A eliminação de água nessa etapa reacional incentivou o surgimento de algumas metodologias que utilizam agentes dessecantes com o objetivo de deslocar o equilíbrio da reação em direção à formação dos produtos (Karimi; Naimi-Jamal, 2019). Entretanto é necessário destacar que a água atua na etapa de transição da etapa limitante da reação, sendo sua presença necessária. A última etapa da reação também tem como característica a estereoseletividade, uma vez que as chalconas podem ser obtidas em duas configurações diferentes. Porém, por apresentarem dois anéis aromáticos em sua estrutura, a chalcona em configuração cis (*Z*) possui alto impedimento estéreo (Figura 20B), diminuindo sua

estabilidade. Portanto, a síntese de chalconas é estereosseletiva e forma majoritariamente o produto em configuração *trans* (*E*) (Figura 20C) (Gomes et al., 2017).



**Figura 20:** Etapas reacionais 2 e 3 (**A**) e configurações *Z* e *E* das chalconas (**B** e **C**, respectivamente).  
Fonte: adaptado de Enchev; Mehandzhiski (2017); Gomes et al. (2017)



## REFERÊNCIAS

- ABADÍAS-GRANADO, I. *et al.* Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, n. 7, p.601-618, 2021. DOI 10.1016/j.ad.2021.02.008.
- ABU-DAYYEH, I. *et al.* Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2438-2445, 2010. DOI 10.1128/IAI.00812-09.
- AHMED, Z.; LE, H. P.; SHAHZAD, S. J. H. Toward environmental sustainability: how do urbanization, economic growth, and industrialization affect biocapacity in Brazil? **Environment, Development and Sustainability**, v. 24, n. 10, p. 11676-11696, 2022. DOI 10.1007/s10668-021-01915-x.
- AHN, M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of flavonoid-based IP6K2 inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 2193866, 2023. DOI 10.1080/14756366.2023.2193866.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n.6, p. e0004770, 2016. DOI 10.1371/journal.pntd.0004349.
- AKINSOLU, F. T. *et al.* Emerging resistance of neglected tropical diseases: A scoping review of the literature. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n.11, p. e. 1925, 2019. DOI 10.3390/ijerph16111925.
- AMEEN, D.; SNAPE, T. J. Mechanism and application of baker-venkataraman O→C acyl migration reactions. **Synthesis (Germany)**, v. 47, n. 2, p. 141-150, 2015. DOI 10.1055/s-0034-1379498.
- ANDRADE-FILHO, J. D. *et al.* Occurrence and probability maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 5, p. 1430-1434, 2017. DOI 10.1093/jme/tjx094.
- ANUGWOM, E. E.; ANUGWOM, N. K. Urbanization and the Epidemiology of Infectious Diseases: Towards the Social Framing of Global Responses. *In: Integrated Science of Global Epidemics (Integrated Science)*. Springer, 2023. v. 14p. 307–328.
- ANVERSA, L. S. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 821-289, 2018. DOI 10.1590/1806-9282.64.03.281.
- AZZOUZ, S. *et al.* Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 60-65, 2005. DOI 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960109.x.

BAKER, W. Molecular rearrangement of some O-acyloxyacetophenones and the mechanism of the production of 3-acylchromones. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1381-1389, 1933. DOI 10.1039/JR9330001381.

BANGERT, M. *et al.* The cross-cutting contribution of the end of neglected tropical diseases to the sustainable development goals. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 60-73, 2017. DOI 10.1186/s40249-017-0288-0.

BANJARA, M. R. *et al.* Visceral leishmaniasis clinical management in endemic districts of India, Nepal, and Bangladesh. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 126093, 2012. DOI 10.1155/2012/126093.

BASTOS, M. M. E. *et al.* Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisao da Literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 2016. DOI 10.21577/1984-6835.20160139.

BELKAID, Y.; BUTCHER, B.; SACKS, D. L. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. **European journal of immunology**, v. 28, n. 4, p. 1389-1400, 1998. DOI 10.1002/(SICI)1521-4141(199804)28:04<1389::AID-IMMU1389>3.0.CO;2-1.

BEN SALAH, A. *et al.* Topical Paromomycin with or without Gentamicin for Cutaneous Leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 6, p. 524-532, 2013. DOI 10.1056/NEJMoa1202657.

BENALLAL, K. E. *et al.* Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: A systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 1, p. e0009952, 2022. DOI 10.1371/journal.pntd.0009952.

BERN, C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the united states. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011. DOI 10.1128/CMR.00005-11.

BHATTACHARYYA, S.; HATUA, K. Computational insight of the mechanism of Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reaction. **RSC Advances**, v. 4, n. 36, p. 18702-18709, 2014. DOI 10.1039/C3RA46623J.

BONIFACE, P. K.; ELIZABETH, F. I. Flavones as a Privileged Scaffold in Drug Discovery: Current Developments. **Current Organic Synthesis**, v. 16, n. 7, p. 968-1001, 2019. DOI 10.2174/1570179416666190719125730.

BORGHI, S. M. *et al.* *Leishmania* infection: painful or painless?. **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 465-475, 2017. DOI 10.1007/s00436-016-5340-7.

BORLASE, A. *et al.* Evaluating and mitigating the potential indirect effect of COVID-19 on control programmes for seven neglected tropical diseases: a modelling study. **The Lancet Global Health**, v. 10, n. 11, p. E1600-E1611, 2022. DOI 10.1016/S2214-109X(22)00360-6.

BORSARI, C. *et al.* SAR Studies and Biological Characterization of a Chromen-4-one Derivative as an Anti- Trypanosoma brucei Agent. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 528-533, 2019. DOI 10.1021/acsmchemlett.8b00565.

BRINDHA, J.; BALAMURALI, M. M.; CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 2021. DOI 10.3389/fchem.2021.622286.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The lancet**, v. 15, n. 392, p. 951–970, 2018. DOI 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.

CARTER, N. S. *et al.* Natural Products That Target the Arginase in Leishmania Parasites Hold Therapeutic Promise. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 267-298, 2021. DOI 10.3390/microorganisms9020267.

CHAN MARGARET. **Ten years in public health, 2007–2017**. 1. Ed. World Health Organization, 2017, 158 p. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/ten-years-in-public-health-2007-2017>.

CHARMOY, M. *et al.* The Nlrp3 inflammasome, IL-1 $\beta$ , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of Leishmania major in C57BL/6 mice. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 4, p. 897-911, 2016. DOI 10.1002/eji.201546015.

CHASTONAY, A. H. M.; CHASTONAY, O. J. Housing Risk Factors of Four Tropical Neglected Diseases: A Brief Review of the Recent Literature. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 7, p. 143-158, 2022. DOI 10.3390/tropicalmed7070143.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 416, n. 1-2, p. 7-12, 2011. DOI 10.1016/j.bbrc.2011.11.023.

CHOI, H. L. *et al.* The global procurement landscape of leishmaniasis medicines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. e0009181, 2021. DOI 10.1371/journal.pntd.0009181.

CLAISEN, L.; CLAPARÈDE, A. Condensationen von Ketonen mit Aldehyden. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 14, n. 2, p. 2460-2468, 1881. DOI 10.1002/cber.188101402192.

CLAYDEN; GREEVES; WARREN. **Organic Chemistry**. 2. Ed. London: Oxford University Press, 2012, 1234 p.

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1–2, p. 95-106, 1998. DOI 10.1016/S0378-5173(97)00417-1.

COHEN, J. P. *et al.* Progress Report on Neglected Tropical Disease Drug Donation Programs. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 5, p. 1193-204, 2016. DOI 10.1016/j.clinthera.2016.02.031.

COREY, E. J. The Logic of Chemical Synthesis: Multistep Synthesis of Complex Carbogenic Molecules (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 30, n. 5, p. 455-465, 1991. DOI 10.1002/anie.199104553.

COSTA-DA-SILVA, A. C. *et al.* Immune Responses in Leishmaniases: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 4, 2022. DOI 10.3390/tropicalmed7040054.

DAS CHAGAS, B. D. *et al.* Interspecies and Intrastrain Interplay among *Leishmania* spp. Parasites. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, 2022. DOI 10.3390/microorganisms10101883.

DAS, P.; SAMARASEKERA, U. The commission on macroeconomics and health: 10 years on. **The Lancet**, v. 378, n. 9807, p. 1907-1908, 2011. DOI /10.1016/S0140-6736(11)61828-X.

DAS, S. *et al.* A brief insight into the physicochemical properties of room-temperature acidic ionic liquids and their catalytic applications in C-C bond formation reactions. *In: Advances in Physical Organic Chemistry*. United States: Academic Press Inc., 2020. v. 54p. 1–98.

DAY, A. J. *et al.* Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **FEBS Letters**, v. 469, n. 2-3, p. 166-170, 2000. DOI 10.1016/s0014-5793(00)01211-4.

DEAN, F. M.; PODIMUANG, V. The course of the Algar-Flynn-Oyamada (A.F.O.) reaction. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 3978-3987, 1965. DOI 10.1039/JR9650003978.

DE ASSIS, T. M.; RABELLO, A.; COTA, G. Economic evaluations addressing diagnosis and treatment strategies for neglected tropical diseases: An overview. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 63, 2021. DOI 10.1590/S1678-9946202163041.

DE CARVALHO, Y. M. *et al.* Pharmaceutical agents for treatment of leishmaniasis: a patent landscape. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, n. 8, p. 633-641, 2020. DOI 10.1080/13543776.2020.1789100.

DE LA TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. The pharmaceutical industry in 2018. An analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. E809, 2019. DOI 10.3390/molecules24040809.

DE LUCA, V. *et al.* Mining the biodiversity of plants: A revolution in the making. **Science**, v.336, n. 6089, p. 1658-1661, 2012. DOI 10.1126/science.1217410.

DE RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1-2, p. 31-63, 2006. DOI 10.1016/j.chroma.2006.01.019.

DORÉ, N. I.; TEIXEIRA, A. A. C. Brazil's economic growth and real (div)convergence from a very long-term perspective (1822-2019): An historical appraisal. **Brazilian Journal of Political Economy**, v. 42, n. 4, p. 934-955, 2022. DOI 10.1590/0101-31572022-3376.

ENCHEV, V.; MEHANDZHIYSKI, A. Y. Computational insight on the chalcone formation mechanism by the Claisen–Schmidt reaction. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 117, n. 11, p. e25365, 2017. DOI 10.1002/qua.25365.

ESPINOZA-HICKS, J. C. *et al.* Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: Design, synthesis and evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 402-413, 2019. DOI 10.1016/j.ejmech.2019.02.028.

FERRARO, F. *et al.* Identification of Chalcones as *Fasciola hepatica* Cathepsin L Inhibitors Using a Comprehensive Experimental and Computational Approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, p. e0004834, 2016. DOI 10.1371/journal.pntd.0004834.

FILARDY, A. A.; PIRES, D. R.; DOSREIS, G. A. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to *Leishmania* infection. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 11, p. 1863-1870, 2011. DOI 10.1007/s00018-011-0653-2.

FONSECA-SILVA, F. *et al.* Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 8, p. 1505-1508, 2013. DOI 10.1021/np400193m.

FONSECA-SILVA, F. *et al.* Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 4, p. 880-884, 2015. DOI 10.1021/acs.jnatprod.5b00011.

FOUGEROUSSE, A.; GONZALEZ, E.; BROUILLARD, R. A convenient method for synthesizing 2-aryl-3-hydroxy-4-oxo-4H-1- benzopyrans or flavonols. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 583-586, 2000. DOI 10.1021/jo990735q.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009. DOI 10.3390/molecules14072317.

GADELHA, E. P. N. *et al.* Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: A pilot study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 6, p. 807-813, 2015. DOI 10.1590/abd1806-4841.20153956.

GALATI, E. A. B.; MARASSÁ, A. M.; ANDRADE, R. M. G. DE. *Micropygomyia (Sauromyia) petari*, a new species of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) from Vale do Ribeira, São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 3, p. 455-459, 2003. DOI 10.1590/s0085-56262003000300016.

GARCIA, A. R. *et al.* Identification of Chalcone Derivatives as Inhibitors of *Leishmania infantum* Arginase and Promising Antileishmanial Agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 624678, 2021. DOI 10.3389/fchem.2020.624678.

GOMES, M. N. *et al.* Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1210, 2017. DOI 10.3390/molecules22081210.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Production of Plant Secondary Metabolites by Using Biotechnological Tools. *In*: VIJAYAKUMAR, R., RAJA, S. S. S. **Secondary Metabolites - Sources and Applications**. 2018, 148 p.

GONZÁLEZ PEÑA, O. I.; LÓPEZ ZAVALA, M. Á.; CABRAL RUELAS, H. Pharmaceuticals market, consumption trends and disease incidence are not driving the pharmaceutical research on water and wastewater. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 5, p. 2532, 2021. DOI 10.3390/ijerph18052532.

GOODWIN, L. G. Pentostam® (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 339-340, 1995. DOI 10.1016/0035-9203(95)90572-3.

GORMLEY, T. R.; O'SULLIVAN, W. I. Flavanoid epoxides-XIII. Acid and base catalysed reactions of 2'-tosyloxychalcone epoxides. Mechanism of the algar-flynn-oyamada reaction. **Tetrahedron**, v. 29, n. 2, p. 369-373, 1973. DOI 10.1016/S0040-4020(01)93304-6.

GOUPIL, L. S.; MCKERROW, J. H. Introduction: Drug discovery and development for neglected diseases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11131-11137, 2014. DOI 10.1021/cr500546h.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 571242, 2011. DOI 10.4061/2011/571242.

HALPANI, C. G.; MISHRA, S. Lewis acid catalyst system for Claisen-Schmidt reaction under solvent free condition. **Tetrahedron Letters**, v. 61, n. 31, p. 152175, 2020. DOI 10.1016/j.tetlet.2020.152175.

HARTSEL, S.; BOLARD, J. Amphotericin B: New life for an old drug. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 12, p. 445-449, 1996. DOI 10.1016/s0165-6147(96)01012-7.

HELEINE, M. *et al.* Using pentamidine to treat cutaneous leishmaniasis in children: A 10-year study in French Guiana. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 48, n. 8, p. 913-915, 2023. DOI 10.1093/ced/llad146.

HENDRICKX, S. *et al.* Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 5, p. 1875-1881, 2014. DOI 10.1007/s00436-014-3835-7.

HOMI KHARAS. **The impact of COVID-19 on global extreme poverty**. Disponível em: <<https://www.brookings.edu/articles/the-impact-of-covid-19-on-global-extreme-poverty/>>. Acesso em: 5 jul. 2023.

HOTEZ, P. J. *et al.* Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 5, p. e102, 2006. DOI 10.1371/journal.pmed.0030102.

HOTEZ, P. J. Ten Global “Hotspots” for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2496, 2014. DOI 10.1371/journal.pntd.0002496.

HOTEZ, P. J.; FENWICK, A.; MOLYNEUX, D. The new COVID-19 poor and the neglected tropical diseases resurgence. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 10, n. 1, p.10, 2021. DOI 10.1186/s40249-020-00784-2.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil’s neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and infection**, v. 16, n. 8, p. 601-606, 2014. DOI 10.1016/j.micinf.2014.07.006.

INACIO, J. D. F. *et al.* The Effect of (-)-Epigallocatechin 3-O - Gallate *in vitro* and *in vivo* in *Leishmania braziliensis*: Involvement of Reactive Oxygen Species as a Mechanism of Action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3093, 2014. DOI 10.1371/journal.pntd.0003093.

IOSET, J. R.; CHANG, S. Drugs for Neglected Diseases initiative model of drug development for neglected diseases: Current status and future challenges. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 1361-1371, 2011. DOI 10.4155/fmc.11.102.

JAIMES, J. R. Severe mucosal leishmaniasis with torpid and fatal evolution. **Clinical Case Reports**, v. 10, n. 8, p. e6220, 2022. DOI 10.1002/ccr3.6220.

JAMIL, K. M. *et al.* Effectiveness Study of Paromomycin IM Injection (PMIM) for the Treatment of Visceral Leishmaniasis (VL) in Bangladesh. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004118, 2015. DOI 10.1371/journal.pntd.0004118.

JOSHI, G.; QUADIR, S. S.; YADAV, K. S. Road map to the treatment of neglected tropical diseases: Nanocarriers interventions. **Journal of Controlled Release**, v. 10, n. 339, p. 51-74, 2021. DOI 10.1016/j.jconrel.2021.09.020.

KAMARAJ, C. *et al.* Antiparasitic potential of asteraceae plants: A comprehensive review on therapeutic and mechanistic aspects for biocompatible drug discovery. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 4, p. 100377, 2022. DOI 10.1016/j.phyplu.2022.100377.

KAMIŃSKI, D. M. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. **European Biophysics Journal**, v. 43, n. 10, p. 453-467, 2014. DOI 10.1007/s00249-014-0983-8.

KAR, S. *et al.* Green Chemistry in the Synthesis of Pharmaceuticals. **Chemical Reviews**, v. 122, n. 3, p. 3637–3710, 2022. DOI 10.1021/acs.chemrev.1c00631.

KARIMI, M.; NAIMI-JAMAL, M. R. Carboxymethyl cellulose as a green and biodegradable catalyst for the solvent-free synthesis of benzimidazoloquinazolinone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 182-187, 2019. DOI 10.1016/j.jscs.2018.06.007.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011. DOI 10.1038/nrmicro2608.

KESSLER, A.; KALSKE, A. Plant Secondary Metabolite Diversity and Species Interactions. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 49, p. 115-139, 2018. DOI 10.1146/annurev-ecolsys-110617-062406.

KHADEM VATAN, S. *et al.* *In silico* and *in vitro* comparative activity of green tea components against *Leishmania infantum*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 18, p. 187-194, 2019. DOI 10.1016/j.jgar.2019.02.008.

KRYSA, M.; SZYMAŃSKA-CHARGOT, M.; ZDUNEK, A. FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. **Food Chemistry**, v. 1, n. 393, p. 133430, 2022. DOI 10.1016/j.foodchem.2022.133430.

KSHATRIYA, R.; JEJURKAR, V. P.; SAHA, S. In memory of Prof. Venkataraman: Recent advances in the synthetic methodologies of flavones. **Tetrahedron**, v. 74, n. 8, p. 811-833, 2018. DOI 10.1016/j.tet.2017.12.052.

KUMARI, S. *et al.* Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 15, n. 1, p. 99, 2022. DOI 10.3390/pharmaceutics15010099.

LANGE, E. De ‘Países Subdesenvolvidos’ À ‘Fronteira Do Subdesenvolvimento’ – Contributo Para Um Debate Conceitual Do Desenvolvimento. **Desenvolvimento Regional em Debate**. Canoinhas: Universidade de Contestado, 2012, p. 47–55.

LAW, J. *et al.* Route designer: A retrosynthetic analysis tool utilizing automated retrosynthetic rule generation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 3, p. 593-602, 2009. DOI 10.1021/ci800228y.

LIESE, B. H.; HOUGHTON, N.; TEPLITSKAYA, L. Development assistance for neglected tropical diseases: Progress since 2009. **International Health**, v. 6, n. 3, P. 162-171, 2014. DOI 10.1093/inthealth/ihu052.

LIU, S. *et al.* The Antarctic Moss *Pohlia nutans* Genome Provides Insights Into the Evolution of Bryophytes and the Adaptation to Extreme Terrestrial Habitats. **Frontiers in Plant Science**, v. 17, n. 13, p. 920138, 2022. DOI 10.3389/fpls.2022.920138.



LÖSCHER, W. Single-Target Versus Multi-Target Drugs Versus Combinations of Drugs With Multiple Targets: Preclinical and Clinical Evidence for the Treatment or Prevention of Epilepsy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 730257, 2021. DOI 10.3389/fphar.2021.730257.

LOURENÇO, E. M. G. *et al.* Identification of a selective PDE4B inhibitor from *Bryophyllum pinnatum* by target fishing study and in vitro evaluation of quercetin 3-O- $\alpha$ -LArabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\alpha$ -LRhamnopyranoside. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1582, 2020. DOI 10.3389/fphar.2019.01582.

LOURENÇO, E. M. G. *et al.* Flavonoid Derivatives as New Potent Inhibitors of Cysteine Proteases: An Important Step toward the Design of New Compounds for the Treatment of Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 225, 2023. DOI 10.3390/microorganisms11010225.

MACHADO, H. **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”**. 2006. 122 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MAKAM, P.; MATSA, R. “Big Three” Infectious Diseases: Tuberculosis, Malaria and HIV/AIDS. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 31, p. 2779-2799, 2021. DOI 10.2174/1568026621666210916170417.

MARQUES, S. A. *et al.* American tegumentary leishmaniasis: Severe side effects of pentavalent antimonial in a patient with chronic renal failure. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 3, p. 355-357, 2019. DOI 10.1590/abd1806-4841.20198388.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p.103-110, 2016. DOI 10.2471/BLT.15.152363.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006559, 2018. DOI 10.1371/journal.pntd.0006559.

MEI, Q.; YUAN, W.; WANG, C. Progress in the synthesis of 3-hydroxyflavones. **Chinese Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 70-84, 2015. DOI 10.6023/cjoc201408038.

MENGARDA, A. C. *et al.* Recent approaches in nanocarrier-based therapies for neglected tropical diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. e1852, 2022. DOI 10.1002/wnan.1852.

MERCADO-CAMARGO, J. *et al.* Homology Modeling of Leishmanolysin (gp63) from *Leishmania panamensis* and Molecular Docking of Flavonoids. **ACS Omega**, v. 5, n. 24, p. 14741-14749, 2020. DOI 10.1021/acsomega.0c01584.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected tropical diseases: Epidemiology and global burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 3, n. 36, 2017. DOI 10.3390/tropicalmed2030036.

MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, v. 3, n. 4, p. 651–657, 2017. DOI 10.1016/j.trci.2017.10.005.

MOLYNEUX, D. H.; HOTEZ, P. J.; FENWICK, A. “Rapid-impact interventions”: How a policy of integrated control for Africa’s neglected tropical diseases could benefit the poor. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 11, e336, 2005. DOI 10.1371/journal.pmed.0020336.

MOLYNEUX, D. H. et al. The history of the neglected tropical disease movement. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 115, n. 2, p. 169-175, 2021. DOI 10.1093/trstmh/trab015.

MONTEIRO, C. L. C. B. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. 1. Ed. Artemed, 2017, 172 p.

MORGAN, S. *et al.* The cost of drug development: A systematic review. **Health Policy**, v. 100, n.1, p. 4-17, 2011. DOI 10.1016/j.healthpol.2010.12.002.

MUCHIRI, G. *et al.* Challenges and strategies for the uptake of mass drug administration among pastoralist communities in South Sudan. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 4, 2023. DOI 10.3389/fitd.2023.1007480.

MUKHERJEE, S. The United States Food and Drug Administration (FDA) regulatory response to combat neglected tropical diseases (NTDs): A review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. e0011010, 2023. DOI 10.1371/journal.pntd.0011010.

MURUGESAN, A. *et al.* Design and development of novel fluorescent oxo-fluoro quinoline (E)-chalcone derivatives via Claisen–Schmidt reaction using Al-SrTiO<sub>3</sub> as a catalyst and its BSA protein binding studies. **Synthetic Communications**, v. 53, n. 14, p. 1104-1125, 2023. DOI 10.1080/00397911.2023.2209816.

NERI, M. **Mapa da Nova Pobreza**. 2022, Disponível em: <<https://cps.fgv.br/MapaNovaPobreza>>.

NIGAM, S.; JAYASHREE, B. S. Limitation of Algar–Flynn–Oyamada reaction using methoxy substituted chalcones as reactants and evaluation of the newly transformed aurones for their biological activities. **Research on Chemical Intermediates**, v. 43, n. 5, p. 2839–2864, 2017. DOI 10.1007/s11164-016-2797-z.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113-123, 2016. DOI 10.1016/j.actatropica.2015.12.016.

NU. **IDH: relatório indica recuo no desenvolvimento humano em 90% dos países**. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/198320-idh-relat%C3%B3rio-indica-recuo-no-desenvolvimento-humano-em-90-dos-pa%C3%ADses>>. Acesso em: 8 jul. 2023.

OCHOLAID, E. A.; KARANJA, D. M. S.; ELLIOTT, S. J. The impact of neglected tropical diseases (Ntds) on health and wellbeing in sub-saharan africa (ssa): A case study of Kenya. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. e0009131, 2021. DOI 10.1371/journal.pntd.0009131.

OLIVEIRA, L. F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011. DOI 10.1016/j.actatropica.2011.02.007.

OPAS. **Situação epidemiológica Leishmaniose cutânea e mucosa**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Acesso em: 8 jul. 2023.

OSMAN, M. S. *et al.* Identification of some chalcone analogues as potential antileishmanial agents: An integrated in vitro and in silico evaluation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 103717, 2022. DOI 10.1016/j.arabjc.2022.103717.

OYAMADA, T. A New General Method For The Synthesis Of The Derivatives Of Flavonol. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 10, n. 5, p. 182-186, 1935. DOI 10.1246/bcsj.10.182.

PAI, A.; B.S, J. Novel benzylidene benzofuranone analogues as potential anticancer agents: design, synthesis and in vitro evaluation based on CDK2 inhibition assays. **3 Biotech**, v. 12, n. 10, p. 256, 2022. DOI 10.1007/s13205-022-03312-1.

PALIĆ, S.; BEIJNEN, J. H.; DORLO, T. P. C. An update on the clinical pharmacology of miltefosine in the treatment of leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 1, p. 106459, 2022. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2021.106459.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e47, 2016. DOI 10.1017/jns.2016.41.

PATRIDGE, E. *et al.* An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016. DOI 10.1016/j.drudis.2015.01.009.

PEREIRA, A. M.; CIDADE, H.; TIRITAN, M. E. Stereoselective Synthesis of Flavonoids: A Brief Overview. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 426, 2023. DOI 10.3390/molecules28010426.

PONTICELLI, M. *et al.* Specialized metabolites from plants as a source of new multi-target antiviral drugs: a systematic review. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, p. 1-79, 2023. DOI 10.1007/s11101-023-09855-2.

PORTELLA, T. P.; KRAENKEL, R. A. Spatial–temporal pattern of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 10, n. 1, p. 86, 2021. DOI 10.1186/s40249-021-00872-x.

PRITHVIRAJ, K. Biological activities of flavonoids: an overview. **International Journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 3, n. 4, p. 1567–1574, 2018. DOI 10.1155/2013/162750.

QIAN, H.; LIU, D.; LV, C. Synthesis of chalcones via Claisen-Schmidt reaction catalyzed by sulfonic acid-functional ionic liquids. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. V. 50, n. 2, p. 1146-1149, 2011. DOI 10.1021/ie101790k.

RAMSAY, R. R. *et al.* A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 3, 2018. DOI 10.1186/s40169-017-0181-2.

RATH, S. *et al.* Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: The state of the art. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, 2003. DOI 10.1590/S0100-40422003000400018.

RIZK, Y. S. *et al.* Amentoflavone isolated from *Selaginella sellowii* Hieron induces mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology International**, v. 86, p. 102458, 2022. DOI 10.1016/j.parint.2021.102458.

SACHS, J. D. Macroeconomics and Health: Investing in Health for Economic Development: Report of the Commission on Macroeconomics and Health. **Nature Medicine**, v. 8, n. 6, p. 551-552, 2001. DOI 10.1038/nm0602-551b.

SACHS, J. D. From millennium development goals to sustainable development goals. **The Lancet**, v. 379, n. 9832, p. P2206-2211, 2012. DOI 10.1016/S0140-6736(12)60685-0.

SACKS, L. V. *et al.* Scientific and regulatory reasons for delay and denial of FDA approval of initial applications for new drugs, 2000-2012. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 4, p. 378-384, 2014. DOI 10.1001/jama.2013.282542.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. DA R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021. DOI 10.33448/rsd-v10i7.16543.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Flavones reversibly inhibit *Leishmania donovani* tyrosine aminotransferase by binding to the catalytic pocket: An integrated in silico-in vitro approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2987-3004, 2020. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.107.

SAXENA, M.; SAXENA, J.; PRADHAN, A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 28, n.4, p. 1845, 2012. DOI 10.3390/molecules28041845.

SCHICK-MAKAROFF, K. *et al.* What Synthesis Methodology Should I Use? A Review and Analysis of Approaches to Research Synthesis. **AIMS Public Health**, v. 3, n. 1, p. 172–215, 2016. DOI 10.3934/publichealth.2016.1.172.

SCHMIDT, H. Contribution To The Progress Of Antimony Therapy Of Kala-Azar. **Chinese Medical Journal**, n. 52, p. 425–432, 1937. DOI 10.5555/cmj.0366-6999.52.03.p425.01

SCHMIDT, J. G. Ueber die Einwirkung von Aceton auf Furfurol und auf Bittermandelöl bei Gegenwart von Alkalilauge. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 14, n. 1, p. 1459-1461, 1881. DOI 10.1002/cber.188101401306.

SHAHI, M. *et al.* Comparison of Th1 and Th2 responses in non-healing and healing patients with cutaneous leishmaniasis. **Reports of biochemistry & molecular biology**, v. 1, n. 2, p.43-49, 2013.

SHARMA, S.; ANAND, N. **Approaches to Design and Synthesis of Antiparasitic Drugs**. In: Pharmacochemistry Library, ScienceDirect, 1997, v. 26, 511 p.

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297–1300, 2015. DOI 10.1016/j.cell.2015.11.031.

SHEN, X. *et al.* Synthesis of 5-substituted flavonols via the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reaction: The mechanistic implication. **Tetrahedron**, v. 73, n. 32, p. 4822-4829, 2017. DOI 10.1016/j.tet.2017.06.064.

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**, v. 11, n. suppl 1, 2011. DOI 10.1590/S1676-06032011000500033.

SILVA-ALMEIDA, M. *et al.* Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 160, 2012. DOI 10.1186/1756-3305-5-160.

SILVA-SILVA, J. V. *et al.* Carajurin Induces Apoptosis in *Leishmania amazonensis* Promastigotes through Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, p. 331, 2022. DOI 10.3390/ph15030331.

SINHA, S.; VOHORA, D. **Drug Discovery and Development: An Overview**. Elsevier Inc., 2017, Cap. 2, 19-32. DOI 10.1016/B978-0-12-802103-3.00002-X.

SIQUEIRA-NETO, J. L. *et al.* Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006512, 2018. DOI 10.1371/journal.pntd.0006512.

SMITH, J.; TAYLOR, E. M. What Is Next for NTDs in the Era of the Sustainable Development Goals?. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, p. e0004719, 2016. DOI 10.1371/journal.pntd.0004719.

STEINMETZ, K. L.; SPACK, E. G. The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. **BMC Neurology**, v. 9, n. 1 (s2), 2009. DOI 10.1186/1471-2377-9-S1-S2.

SUNDAR, S. *et al.* Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 25, p. 2571-2581, 2007. DOI 10.1056/NEJMoa066536.

SUNDAR, S. *et al.* Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543-550, 2012. DOI 10.1093/cid/cis474.

SUNYOTO, T. *et al.* Exploring global and country-level barriers to an effective supply of leishmaniasis medicines and diagnostics in eastern Africa: A qualitative study. **BMJ Open**, v. 9, n. 5, p. e029141, 2019. DOI 10.1136/bmjopen-2019-029141.

SUNYOTO, T.; POTET, J.; BOELAERT, M. Why miltefosine - A life-saving drug for leishmaniasis-is unavailable to people who need it the most. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 3, p. e000709, 2018. DOI 10.1136/bmjgh-2018-000709.

THE LANCET. The COVID-19 pandemic in 2023: far from over. **The Lancet**, v. 401, n. 10371, p. P79, 2023. DOI 10.1016/S0140-6736(23)00050-8.

TSOBOU, R.; MAPONGMETSEM, P. M.; VAN DAMME, P. Medicinal Plants Used for Treating Reproductive Health Care Problems in Cameroon, Central Africa1. **Economic Botany**, v. 70, n. 2, p. 145-159, 2016. DOI 10.1007/s12231-016-9344-0.

UIVAROSI, V.; MUNTEANU, A. C.; NIȚULESCU, G. M. An Overview of Synthetic and Semisynthetic Flavonoid Derivatives and Analogues: Perspectives in Drug Discovery. *In: Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, 2019, v. 60, 29-84 p.

UMEGAWA, Y. *et al.* Amphotericin B assembles into seven-molecule ion channels: An NMR and molecular dynamics study. **Science Advances**, v. 8, n. 24, p. eabo2658, 2022. DOI 10.1126/sciadv.abo2658.

VELJKOVIC, N. *et al.* The role of long-range intermolecular interactions in discovery of new drugs. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 6, n. 12, p. 1263-1270, 2011. DOI 10.1517/17460441.2012.638280.

WAN, H. *et al.* Promotion of flavonoid biosynthesis in leaves and calli of ornamental crabapple (*Malus sp.*) by high carbon to nitrogen ratios. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 673, 2015. DOI 10.3389/fpls.2015.00673.

WANG, P. *et al.* Organocatalytic Enantioselective Cross-Aldol Reaction of *o*-Hydroxyarylketones and Trifluoromethyl Ketones. **Organic Letters**, v. 19, n. 10, p. 2634–2637, 2017. DOI 10.1021/acs.orglett.7b00828.

WASAN, K. M. *et al.* Highly Effective Oral Amphotericin B Formulation against Murine Visceral Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 3, p. 357-360, 2009. DOI 10.1086/600105.

WELD, E. D. *et al.* Twice neglected? Neglected diseases in neglected populations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 88, n. 2, p. 367-373, 2022. DOI 10.1111/bcp.15148.

WENG, H. B.; CHEN, H. X.; WANG, M. W. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 7, n. 1, p. 67, 2018. DOI 10.1186/s40249-018-0444-1.

WHO. **Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9122>> . 2016. Acesso em: 5 jul. 2023.

WHO. **Treating over one billion people for the fourth successive year**. Disponível em: <<https://www.emro.who.int/neglected-tropical-diseases/ntd-news/treating-over-one-billion-people.html>>.2019. Acesso em: 5 jul. 2023.

WHO. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals A road map for neglected tropical diseases 2021-2030**. Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders.>>. 2021. Acesso em: 5 jul. 2023.

WHO. **14.9 million excess deaths associated with the COVID-19 pandemic in 2020 and 2021**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/05-05-2022-14.9-million-excess-deaths-were-associated-with-the-covid-19-pandemic-in-2020-and-2021>>. 2022. Acesso em: 5 jul. 2023a.

WHO. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals A rationale for continued investment in tackling neglected tropical diseases 2021-2030**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/363155/9789240052932-eng.pdf?sequence=1>>. 2022. Acesso em: 7 jul. 2023b.

WHO. **WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EDM-TRM-2002.1>> . 2002. Acesso em 7 jul. 2023.

WINKLER, A. S. *et al.* Neglected tropical diseases - the present and the future. **Tidsskrift for den Norske Laegeforening**, v. 138, n. 3, 2018. DOI 10.4045/tidsskr.17.0678.

YADAV, G. D.; WAGH, D. P. Claisen-Schmidt Condensation using Green Catalytic Processes: A Critical Review. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 29, p. 9059-9085, 2020. DOI 10.1002/slct.202001737.

YADAV, P. *et al.* Unusual Observations in Leishmaniasis—An Overview. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 297, 2023. DOI 10.3390/pathogens12020297

ZHANG, S.; XING, M.; LI, B. Recent advances in musculoskeletal local drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 93, p. 135-151, 2019. DOI 10.1016/j.actbio.2019.01.043.

ZHANG, Y. *et al.* Cholesterol content in cell membrane maintains surface levels of ErbB2 and confers a therapeutic vulnerability in ErbB2-positive breast cancer. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 15, 2019. DOI 10.1186/s12964-019-0328-4.

ZHUANG, C. *et al.* Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017. DOI 10.1021/acs.chemrev.7b00020.

---

**CAPÍTULO II: Descoberta e síntese de novos  
análogos flavonoidicos  
inibidores de cisteíno  
proteases: um avanço para a  
obtenção de potenciais  
protótipos voltados ao  
tratamento de leishmaniose**



---

## RESUMO

As leishmanioses afetam cerca de 350 milhões de pessoas em todo mundo, mas a descoberta de protótipos acessíveis e eficazes contra esse grupo de doenças ainda é um desafio. O crescimento da utilização de compostos multialvo representou uma importante ferramenta para a obtenção de novas moléculas antileishmania, uma vez que as leishmanioses são doenças complexas e atingem diversas vias biológicas. Os flavonoides representam um grupo amplo de moléculas multialvo com atividade antileishmania já relatada e a obtenção desses compostos via síntese orgânica permite alcançar maiores rendimentos. Entretanto, a escolha de um composto multialvo não está associada à falta de um delineamento experimental baseado em alvo farmacológico. O planejamento de novos fármacos considerando a inibição de determinada enzima chave é considerado o método mais direcional e rápido para obtenção de protótipos eficientes. Derivados sintéticos e semissintéticos de flavonoide foram descritos recentemente como inibidores de cisteíno proteases de *Leishmania mexicana*. Essas proteínas são expressas principalmente em formas amastigotas do parasito e consideradas fatores de virulência. Sua inibição resulta em uma diminuição da parasitemia associada à uma imunomodulação do hospedeiro. Portanto, representam um importante e seletivo alvo para o desenvolvimento de compostos bioativos. Considerando esse conjunto de informações, os objetivos iniciais do estudo foram: i) Obtenção de inibidores de flavonoide através de uma metodologia sintética simples, versátil e utilizando reagentes de baixo custo; ii) Investigação do potencial de inibição dos análogos obtidos sob diferentes isoformas de cisteíno proteases de *Leishmania*; iii) Avaliação da citotoxicidade dos compostos e triagem prévia da atividade antileishmania contra formas promastigotas de *L. amazonensis*; e iv) Realização de testes *in silico* para elucidação de um potencial modo de interação entre os compostos e as proteínas testadas. Os resultados foram compilados na forma de artigo científico publicado no periódico *Microorganisms*.

**Palavras-chave:** Síntese orgânica, flavonoides, CPB, docking molecular, leishmaniose

---

## ABSTRACT

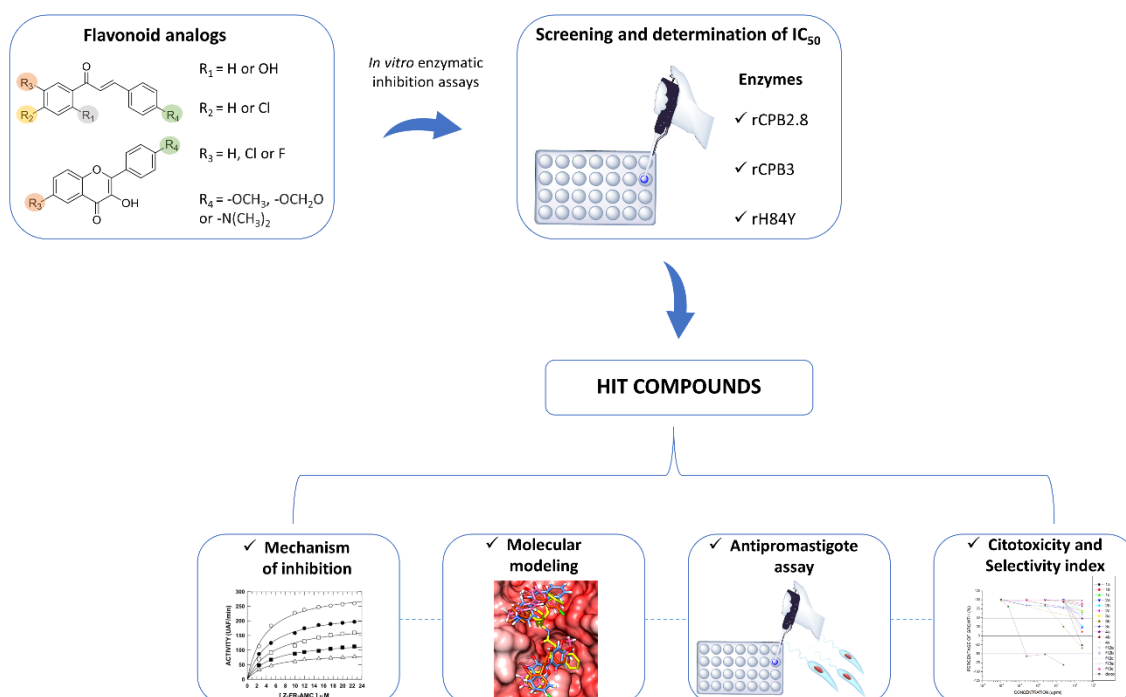
Leishmaniasis affects more than 350 million people worldwide, but the discovery of affordable and effective prototypes against this group of diseases is still a challenge. Advances in the use of multitarget compounds represented an important tool for the development of new antileishmanial molecules, since leishmaniasis is a complex disease and involves different biological pathways. Flavonoids represent a large group of multitarget molecules with reported antileishmanial activity, and obtaining these compounds using methods of organic synthesis allows achieving higher yields. However, the choice of a multitarget compound is not associated with the absence of an experimental design based on a pharmacological target. The design of new drugs considering the inhibition of a key enzyme is considered to be the most directional and fast method to obtain more efficient prototypes. Synthetic and semi-synthetic flavonoid derivatives were recently described as inhibitors of cysteine proteases from *Leishmania mexicana*. These proteins are expressed primarily in forms of amastigotes of the parasite and are considered virulence factors. Its inhibition results in a decrease in parasitemia associated with host immunomodulation. Therefore, they are an important and selective target for the development of antileishmanial compounds. In this context, the initial aims of the study were: i) to obtain flavonoid inhibitors through a simple and versatile synthetic methodology and to use low-cost reagents; ii) to investigate the inhibition potential of analogues obtained from different isoforms of *Leishmania* cysteine proteases; iii) to evaluate the cytotoxicity of the compounds and previous screening of antileishmanial activity against promastigotes of *L. amazonensis*; and iv) to perform *in silico* tests to elucidate a potential mode of interaction between the compounds and the tested proteins. The results were compiled in the form of a scientific article published in the journal *Microorganisms*.

**Keywords:** Organic synthesis, flavonoids, CPB, molecular docking, leishmaniasis

Artigo publicado no periódico *Microorganisms*  
DOI 10.3390/microorganisms11010225

## Flavonoid Derivatives as New Potent Inhibitors of Cysteine Proteases: An Important Step toward the Design of New Compounds for the Treatment of Leishmaniasis

Estela Mariana Guimarães Lourenço, Juliana Fortes Di Iório, Fernanda da Silva, Felipe Leonardo Bley Fialho, Melquisedeque Mateus Monteiro, Adilson Beatriz, Renata Trentin Perdomo, Euzébio Guimarães Barbosa, Jean Pierre Oses, Carla Cardozo Pinto de Arruda, Wagner Alves de Souza Júdice\*, Jamal Rafique\*, and Dênis Pires de Lima\*



---

**CAPÍTULO III: Validação das cisteíno proteases como um alvo de combate à forma amastigota de *Leishmania amazonensis* e investigação de outros potenciais mecanismos de ação por trás da atividade antileishmania dos análogos sintéticos de flavonoides**

---

## RESUMO

A determinação da capacidade de inibição de um alvo farmacológico é o primeiro passo para o desenvolvimento de novos protótipos. Dentre várias outras etapas que fazem parte de um estudo pré-clínico, é necessário que a atividade enzimática demonstrada pelo composto teste se confirme em experimentos celulares. No caso das cisteíno proteases, essa relação é controversa. Um número relevante de antagonistas dessas proteínas não demonstrou uma relação entre os resultados de testes enzimáticos e ensaios *in vitro* contra formas amastigotas de *Leishmania*. Esses resultados geram questionamentos acerca da validação das cisteíno proteases como um alvo contra o parasito. A determinação da produção de óxido nítrico pode fornecer dados necessários para a validação do alvo além de auxiliar na compreensão dos eventos bioquímicos que ocorrem após a inibição desse fator de virulência. Estudos anteriores demonstraram que a expressão de cisteíno proteases afeta fatores de transcrição incluindo NF- $\kappa$ B, o que reduz a expressão de IFN- $\gamma$  e, conseqüentemente, impede a produção adequada de óxido nítrico. Logo, na presença de inibidores de cisteíno proteases, a produção de óxido nítrico pelas células infectadas é reestabelecida, favorecendo a resposta imune celular e diminuição da parasitemia. O cenário que envolve possíveis mecanismos de ação se torna ainda mais complexo quando os compostos utilizados no estudo apresentam características multialvo como os flavonoides. Considerando as características desses compostos, um possível combate de formas amastigotas poderia não estar totalmente relacionado apenas à inibição de cisteíno proteases. Por isso, a investigação de outros potenciais mecanismos de ação é fundamental para delineamento de futuros estudos baseados nessa classe de compostos. Sendo assim, a segunda parte desse estudo visa a realização de testes *in vitro* contra formas amastigotas de *L. amazonensis*, investigação de citotoxicidade em macrófagos peritoneais, determinação da produção de óxido nítrico pelas células infectadas e tratadas além da busca por outros potenciais alvos antileishmania através de ensaios de citometria de fluxo. Os resultados também foram compilados sob a forma de artigo científico submetido ao periódico *ACS Infectious Diseases*.

**Palavras-chave:** Flavonoides, CPB, leishmaniose, citometria de fluxo

---

## ABSTRACT

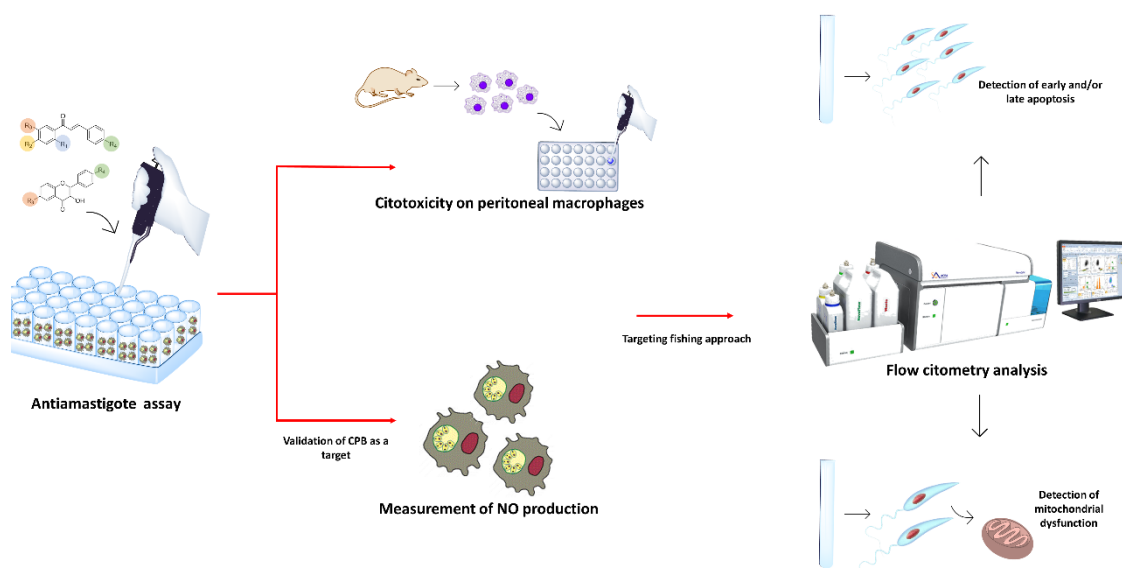
Determining the inhibition of a pharmacological target is the first step toward the development of new prototypes. Among several other steps that are part of a preclinical study, it is necessary that the enzymatic activity demonstrated by the test compound be confirmed by cellular experiments. When considering cysteine proteases, this activity relationship is controversial. A relevant number of antagonists of these proteins did not demonstrate a correlation between the results of enzymatic tests and *in vitro* assays against the amastigote form of *Leishmania*. These results raise questions about the validity of cysteine proteases as targets against the parasite. The determination of nitric oxide production can provide the necessary data for target validation, in addition to helping to understand the biochemical events that occur after the inhibition of this virulence factor. Previous studies have shown that the expression of cysteine proteases affects transcription factors, including NF- $\kappa$ B, which reduces the expression of IFN- $\gamma$  and, consequently, prevents the adequate production of nitric oxide. Therefore, in the presence of cysteine protease inhibitors, the production of nitric oxide by infected cells is reestablished, which favors the cellular immune response and decreases parasitemia. The scenario involving possible mechanisms of action becomes even more complex when the compounds used in the study have multitarget characteristics such as flavonoids. On considering the characteristics of these compounds, a possible fight against amastigotes could not be totally related only to the inhibition of cysteine proteases. Therefore, the investigation of other potential mechanisms of action is fundamental for the design of future studies based on this class of compounds. Therefore, the second part of this study aims to carry out *in vitro* tests against amastigotes of *L. amazonensis*, investigate cytotoxicity in peritoneal macrophages, determine nitric oxide production by infected and treated cells, in addition to the search for other potential targets for antileishmania through flow cytometry tests. The results were also compiled as a scientific article submitted to the journal ACS Infectious Diseases.

**Keywords:** Flavonoids, CPB, leishmaniasis, flow cytometry

Artigo publicado no periódico ACS Infectious Diseases  
DOI 10.1021/acsinfecdis.3c00336

## Investigation of the potential targets behind the promising and highly selective antileishmanial action of synthetic flavonoid derivatives

Estela M. G. Lourenço, Fernanda da Silva, Amarith R. das Neves, Iluska S. Bonfá, Alda Maria T. Ferreira, Adriana Guercio, Maria E. C. da Silva, Jéssica T. dos Santos, Marco A. U. Martines, Renata T. Perdomo, Mônica C. Toffoli-Kadri, Euzébio G. Barbosa, Sumbal Saba, Adilson Beatriz, Jamal Rafique\*, Carla C. P. de Arruda\*, and Dênis P. de Lima\*



---

**CONSIDERAÇÕES FINAIS: Conclusões e  
Perspectivas**



## CONCLUSÕES

Foram obtidos 12 análogos de chalcona (rendimentos de 67,11% a 95,69%) e 5 análogos de flavonol (rendimentos de 69,87 a 86,42%). Os rendimentos de bons a excelentes reforçam positivamente o procedimento experimental. Além disso, os reagentes e solventes utilizados em todas as reações são de baixo custo e ambientalmente não impactantes, corroborando com a proposta de obtenção de compostos econômicos e menos tóxicos.

Todos os compostos demonstraram ser inibidores das três isoformas testadas (rCPB2.8, rCPB3 e rH84Y). Particularmente, as chalconas **1c** ( $CI_{50} = 2,75 \mu\text{M}$ ) e **2a** ( $CI_{50} = 2,35 \mu\text{M}$ ) e os flavonóis **f12a** ( $CI_{50} = 4,72 \mu\text{M}$ ) e **f12b** ( $CI_{50} = 5,23 \mu\text{M}$ ) se destacaram pela potência de inibição da isoforma rCPB2.8. Considerando as outras duas isoformas, as chalconas **1b**, **2a**, **2b**, **3c**, **4a** e **4c** e o flavonol **f12a** demonstraram baixos valores de  $IC_{50}$ .

Em relação à atividade dos análogos de chalcona, a presença de cloro ligado ao carbono C3' ou C4', flúor em C3' ou hidroxila na posição C6' parece não afetar a capacidade inibitória dos compostos frente à rCPB2.8. Entretanto, a presença do grupo 1,3-dioxolano, em geral, não favoreceu esta inibição enzimática. Em contrapartida, a presença do átomo de cloro em C3' (**3a** e **3c**) ou um grupo metoxila em C4 (**3a** e **4a**) parece aumentar a potência de inibição da isoforma rCPB3. Na avaliação da capacidade inibitória dos análogos de flavonol, observou-se que a presença de dimetilamina na posição C4' impactou negativamente na capacidade de inibição das três enzimas.

Os ensaios de determinação de mecanismo de inibição enzimática dos compostos mais ativos (**3c**, **f12a** e **f12b**) permitiram a identificação do mecanismo de cooperativismo positivo e linear simples de inibição não competitiva. Os resultados foram reforçados através de análises de modelagem molecular.

Considerando os dados obtidos após tratamento das formas promastigotas com os derivados flavonoídicos, os compostos **2a**, **3a**, **3c**, **4c** e **f12c** foram os mais ativos, com atividade superior ao fármaco pentamidina utilizado como controle positivo no ensaio. Além disso, 11 compostos demonstraram atividade contra as formas amastigota de *L. amazonensis*, sendo a chalcona **3a** a molécula mais ativa da série ( $CI_{50} = 1,37 \mu\text{M}$ ).

Os parâmetros ADMET calculados através de análises *in silico* apontaram valores aceitáveis de LogP e LogS e, portanto, nenhuma violação na regra de Lipinski. Entretanto, os análogos de flavonoides obtidos como sólidos cristalinos (**2c**, **3c** e **f12a**)

demonstraram baixa solubilidade em água, o que possivelmente justifica a baixa atividade antileishmania demonstrada por estes compostos no ensaio antiamastigota *in vitro*.

Ensaio de toxicidade frente à linhagem NIH/3T3 e à macrófagos peritoneais demonstraram que os compostos são seguros e altos valores de índice de seletividade foram calculados.

A produção de óxido nítrico pelas células infectadas e tratadas revelou que a chalcona **3c** e o flavonol **f12a** exerceram uma das maiores influências na produção do óxido nítrico pelas células hospedeiras ( $22,01 \pm 1,80$  e  $13,77 \pm 1,10$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente).

As moléculas **2a** e **3a**, mais ativas contra ambas as formas de *L. amazonensis*, geraram alteração no potencial da membrana mitocondrial após 48 horas de tratamento. Entretanto, esse efeito não pôde ser relacionado com quaisquer sinais de apoptose precoce ou tardia.

Apesar dos compostos não serem inéditos, a avaliação da atividade contra o parasita *Leishmania* e a investigação potenciais mecanismo de ação desta série não foi explorada em trabalhos anteriores. Os dados obtidos reforçam a validação da CPB como um alvo antileishmania e demonstram o reconhecimento dos flavonoides como potenciais protótipos para o tratamento de leishmaniose cutânea.

## PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho incentivam o surgimento de outros questionamentos que podem ser respondidos através de análises complementares futuras: *i*) A inibição de CPB é o principal mecanismo de ação antileishmania dos compostos sintetizados?; *ii*) Os análogos flavonoídicos também são ativos contra as enzimas catepsinas B e/ou L ou contra outras cisteíno proteases catepsina L-like?.

*i.* Apesar dos resultados em relação à inibição de CPB terem sido expressivos, a relação entre a inibição enzimática e a atividade antileishmania não pôde ser completamente elucidada. Isto se deve à baixa solubilidade em água demonstrada pelos compostos. A possível precipitação em um meio aquoso reduz a quantidade de composto solúvel e, portanto, capaz de penetrar a membrana celular do parasito ou da célula hospedeira infectada. Dessa forma, é necessário que a solubilidade em água dos compostos seja aumentada para que a validação de CPB como alvo no combate ao parasito tenha resultados mais concretos e definitivos. Esse objetivo pode ser alcançado

através da alteração estrutural do composto ou da elaboração de uma formulação. Em relação à modificação estrutural, destaca-se a possibilidade de obtenção do sal dos análogos de chalcona e flavonol através da ionização da hidroxila fenólica (posição C6' e C3, respectivamente) na presença de solução básica. Além disso, a glicosilação dos flavonoides na posição C3 também é uma alternativa para o aumento de solubilidade em água e estudos na literatura relatam diferentes métodos de síntese para a obtenção de flavonoides glicosilados (Neves et al., 2018). Entretanto, a modificação estrutural dos compostos pode gerar alterações na atividade biológica não relacionadas apenas ao aumento de solubilidade, mas à novas interações intermoleculares realizadas em razão da mudança de estrutura. Sabendo disto, a elaboração de uma formulação com base lipídica pode ser uma alternativa promissora para estudos futuros por aumentar a solubilidade em água sem alterar a estrutura química do composto. Um projeto visando a elaboração de curativos biopoliméricos contendo os análogos foi iniciado sob coordenação do Laboratório de Síntese e Transformação de Moléculas Orgânicas (SINTMOL – UFMS).

ii. A alta similaridade estrutural entre as cisteíno proteases de *Leishmania* e as catepsinas é explorada por diversos estudos. Esta semelhança também pode ser destacada em outras cisteíno proteases, como a cruzaina. Portanto, a conservação da capacidade de inibição dos análogos flavonoídicos nestes outros alvos farmacológicos é algo esperado. Resultados positivos de inibição destas enzimas poderiam sustentar a investigação da série de moléculas sintetizadas como possíveis protótipos para o tratamento de outras doenças. Entretanto, sabe-se que um determinado composto pode apresentar diferentes potências em alvos farmacológicos altamente similares em razão de pequenas alterações no sítio ativo ou em outras regiões da proteína. Resultados negativos de atividade dos compostos frente às cisteíno proteases citadas podem servir de base para estudos de biologia estrutural. Estes estudos podem informar as interações intermoleculares necessárias para que um determinado composto tenha capacidade enzimática inibitória, podendo esclarecer também as razões por trás da seletividade entre os alvos. Dessa forma, dados provenientes desta investigação poderiam auxiliar estudos futuros com o objetivo de planejar e sintetizar inibidores de seletivos para as cisteíno proteases do tipo catepsina L-like. Em parceria com a Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), a investigação da capacidade de inibição dos compostos frente às catepsinas B e L foi iniciada. Os compostos também foram testados contra a enzima cruzaina em estágio realizado na Universidade de Minas Gerais (UFMG) com supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rafaela Salgado Ferreira.

## REFERÊNCIAS

- ABU-DAYYEH, I. *et al.* Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2438-2445, 2010. DOI 10.1128/IAI.00812-09.
- ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, A. *et al.* Recent progress in diagnosis and treatment of Human African Trypanosomiasis has made the elimination of this disease a realistic target by 2030. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 1037094, 2022. DOI 10.3389/fmed.2022.1037094.
- ANDRADE-FILHO, J. D. *et al.* Occurrence and probability maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 5, p. 1430-1434, 2017. DOI 10.1093/jme/tjx094.
- ANVERSA, L. S. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018. DOI 10.1590/1806-9282.64.03.281.
- BORLASE, A. *et al.* Evaluating and mitigating the potential indirect effect of COVID-19 on control programmes for seven neglected tropical diseases: a modelling study. **The Lancet Global Health**, v. 10, n. 11, p. E1600-E1611, 2022. DOI 10.1016/S2214-109X(22)00360-6.
- BRINDHA, J.; BALAMURALI, M. M.; CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 622286, 2021. DOI 10.3389/fchem.2021.622286.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The lancet**, v. 15, n. 392, p. 951–970, 2018. DOI 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- BUXBAUM, L. U. *et al.* Cysteine Protease B of *Leishmania mexicana* Inhibits Host Th1 Responses and Protective Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3711-3717, 2003. DOI 10.4049/jimmunol.171.7.3711.
- CARTER, N. S. *et al.* microorganisms Natural Products That Target the Arginase in *Leishmania* Parasites Hold Therapeutic Promise. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 267, 2021. DOI 10.3390/microorganisms9020267.
- CASGRAIN, P. A. *et al.* Cysteine Peptidase B Regulates *Leishmania mexicana* Virulence through the Modulation of GP63 Expression. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 5, p. e1005658, 2016. DOI 10.1371/journal.ppat.1005658.
- DE CARVALHO, Y. M. *et al.* Pharmaceutical agents for treatment of leishmaniasis: a patent landscape. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, n. 8, p. 633-641, 2020. DOI 10.1080/13543776.2020.1789100.

- DE SOUZA LEAO, S. *et al.* Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 10, p. 3219-3231, 1995. DOI 10.1242/jcs.108.10.3219.
- DIAS, M. C.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5377, 2021. DOI 10.3390/molecules26175377.
- ENGELS, D.; ZHOU, X. N. Neglected tropical diseases: An effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 10, 2020. DOI 10.1186/s40249-020-0630-9.
- FERREIRA, L. L. G.; DE MORAES, J.; ANDRICOPULO, A. D. Approaches to advance drug discovery for neglected tropical diseases. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 8, p. 2278-2287, 2022. DOI 10.1016/j.drudis.2022.04.004.
- FITZPATRICK, C.; ENGELS, D. Leaving no one behind: A neglected tropical disease indicator and tracers for the Sustainable Development Goals. **International Health**, v. 8, n. 1, p. i8-15, 2015. DOI 10.1093/inthealth/ihw002.
- GERVAZONI, L. F. O.; GONÇALVES-OZÓRIO, G.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. 2'-Hydroxyflavanone activity in vitro and in vivo against wild-type and antimony-resistant *Leishmania amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. e0006930, 2018. DOI 10.1371/journal.pntd.0006930.
- LOURENÇO, E. M. G. *et al.* Flavonoid Derivatives as New Potent Inhibitors of Cysteine Proteases: An Important Step toward the Design of New Compounds for the Treatment of Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 225, 2023. DOI 10.3390/microorganisms11010225.
- MANN, S. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021. DOI 10.1007/s40475-021-00232-7.
- NEVES, A. R. *et al.* Synthesis of New Glycosylated Flavonoids with Inhibitory Activity on Cell Growth. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1093, 2018. DOI 10.3390/molecules23051093.
- OLÍAS-MOLERO, A. I. *et al.* Antileishmanial drug discovery and development: Time to reset the model? **Microorganisms**, v. 9, n. 12, p. 2500, 2021. DOI 10.3390/microorganisms9122500.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C. *et al.* An old drug and different ways to treat cutaneous leishmaniasis: Intralesional and intramuscular meglumine antimoniate in a reference center, Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 9, p. e0009734, 2021. DOI 10.1371/journal.pntd.0009734.
- OLIVIER, M.; HASSANI, K. Protease inhibitors as prophylaxis against leishmaniasis: New hope from the major surface protease gp63. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 539-542, 2010. DOI 10.4155/fmc.10.17.

PORTELLA, T. P.; KRAENKEL, R. A. Spatial–temporal pattern of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 10, n. 1, p. 86, 2021. DOI 10.1186/s40249-021-00872-x.

RAMSAY, R. R. *et al.* A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 3, 2018. DOI 10.1186/s40169-017-0181-2.

RATH, S. *et al.* Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: The state of the art. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, 2003. DOI 10.1590/S0100-40422003000400018.

ROUTARAY, C. B. *et al.* Quantitative proteomic analysis reveals differential modulation of crucial stage specific proteins during promastigote to amastigote differentiation in *Leishmania donovani*. **Journal of Proteins and Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 17-27, 2022. DOI 10.1007/s42485-021-00080-z.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. DA R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021. DOI 10.33448/rsd-v10i7.16543.

SILVA-ALMEIDA, M. *et al.* Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 5, p. 160, 2012. DOI 10.1186/1756-3305-5-160.

SIQUEIRA-NETO, J. L. *et al.* Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006512, 2018. DOI 10.1371/journal.pntd.0006512.

TOOR, J. *et al.* Predicted Impact of COVID-19 on Neglected Tropical Disease Programs and the Opportunity for Innovation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 8, p. 1463-1466, 2021. DOI 10.1093/cid/ciaa933.

VANDERSLOTT, S. Moving From Outsider to Insider Status Through Metrics: The Inclusion of “Neglected Tropical Diseases” Into the Sustainable Development Goals. **Journal of Human Development and Capabilities**, v. 20, n. 4, p. 418-435, 2019. DOI 10.1080/19452829.2019.1574727.

WARUSAVITHANA, S. *et al.* Review of the neglected tropical diseases programme implementation during 2012– 2019 in the WHO-Eastern Mediterranean Region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 9, p. e0010665, 2022. DOI 10.1371/journal.pntd.0010665.

WELD, E. D. *et al.* Twice neglected? Neglected diseases in neglected populations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 88, n. 2, p. 367-373, 2022. DOI 10.1111/bcp.15148.

WHO. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals A road map for neglected tropical diseases 2021-2030.** Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders>>. Acesso em: 10 jul. 2023.

**ANEXO 1****Certificado de aprovação de projeto pela Comissão De Ética No Uso De Animais/CEUA Da Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul/UFMS**

**Título da proposta:** “Obtenção de curativos enriquecidos com flavonoides e/ou LCC como novo tratamento econômico e indolor de leishmaniose cutânea”

**Número do processo:** nº 1.209/2022

**Data de aprovação:** 10/03/2022



## CERTIFICADO

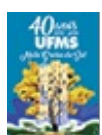
Certificamos que a proposta intitulada “Obtenção de curativos enriquecidos com flavonoides e/ou LCC como novo tratamento econômico e indolor de leishmaniose cutânea”, registrada com o nº 1.209/2022, sob a responsabilidade de **Dênis Pires de Lima** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 2ª reunião ordinária do dia 10/03/2022.

FINALIDADE	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/05/2022 a 01/03/2024
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos BALB/c
Nº de animais	240
Peso/Idade	20-30g / 4 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMS

Fábio José Carvalho Faria

Coordenador da CEUA/UFMS

Campo Grande, 03 de maio de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Jose Carvalho Faria, Presidente de Comissão**, em 03/05/2022, às 11:04, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufms.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?)





[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0,](#)  
informando o código verificador **3255043** e o código CRC  
**A0D039F0**.

---

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone: (67) 3345-7925

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

---

**Referência:** Processo nº 23104.002921/2022-68

SEI nº 3255043

---

**ANEXO 2****Material Suplementar do artigo publicado no periódico *Microorganisms***

DOI 10.3390/microorganisms11010225

**Flavonoid Derivatives as New Potent Inhibitors of Cysteine Proteases: An Important Step toward the Design of New Compounds for the Treatment of Leishmaniasis**

Estela Mariana Guimarães Lourenço, Juliana Fortes Di Iório, Fernanda da Silva, Felipe Leonardo Bley Fialho, Melquisedeque Mateus Monteiro, Adilson Beatriz, Renata Trentin Perdomo, Euzébio Guimarães Barbosa, Jean Pierre Oses, Carla Cardozo Pinto de Arruda, Wagner Alves de Souza Júdice\*, Jamal Rafique\*, and Dênis Pires de Lima\*

**Supplementary Materials**

The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11010225/s1>: Figures S1–S10; Tables S1–S3; Spectra 1–34. Figure S1: Determination of the affinity constants of the 3c compound in the inhibition of rCPB2.8; Figure S2: Determination of the affinity constants of the f12a compound in the inhibition of rCPB2.8; Figure S3: Determination of the affinity constants of the f12b compound in the inhibition of rCPB2.8; Figure S4: Determination of the affinity constants of the 3c compound in the inhibition of rCPB3; Figure S5: Determination of the affinity constants of the f12a compound in the inhibition of rCPB3; Figure S6: Determination of the affinity constants of the f12b compound in the inhibition of rCPB3; Figure S7: Determination of the affinity constants of the 3c compound in the inhibition of rH84Y; Figure S8: Determination of the affinity constants of the f12a compound in the inhibition of rH84Y; Figure S9: Determination of the affinity constants of the f12b compound in the inhibition of rH84Y; Table S1: Differences of amino acid residues at the active site of rCPB2.8, rCPB3 and rH84Y; Table S2: Potential energy values for the binding positions of compound 3c at the active site of rCPB2.8; Table S3: Potential energy values for the binding positions of compound f12a at the active site of rCPB3a; Figure S10: Cytotoxicity of all flavonoid derivatives against NHI-3T3 cells. The supplementary material comprises the results of the enzyme kinetics and determination of the mechanism of inhibition *in vitro* tests. Furthermore, we present the NMR spectra section of all synthetic compounds.

---

**ANEXO 3****Material Suplementar do artigo publicado no periódico ACS Infectious Diseases**

DOI 10.1021/acsinfecdis.3c00336

**Investigation of the potential targets behind the promising and highly selective antileishmanial action of synthetic flavonoid derivatives**

Estela M. G. Lourenço, Fernanda da Silva, Amarith R. das Neves, Iluska S. Bonfá, Alda Maria T. Ferreira, Adriana Guercio, Maria E. C. da Silva, Jéssica T. dos Santos, Marco A. U. Martines, Renata T. Perdomo, Mônica C. Toffoli-Kadri, Euzébio G. Barbosa, Sumbal Saba, Adilson Beatriz, Jamal Rafique\*, Carla C. P. de Arruda\*, and Dênis P. de Lima\*

**Supporting Information**

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.3c00336>. Chalcone and flavonol-like inhibitory potential (IC<sub>50</sub>) in modulating the enzyme activity of *L. mexicana* cysteine proteases rCPB2.8, rCPB3, and rH84Y; cytotoxicity of all flavonoid derivatives, amphotericin B, and pentamidine against peritoneal macrophages; *in vitro* antileishmanial activity against promastigote form of *L. amazonensis*; parental percentage of the population stained with TMRE after 48 and 72 h of treating promastigote with compounds 1c, 2a, 3a, 3b, and 4b; parental percentage of the population stained with Annexin V/7-AAD after 24, 48, and 72 h of treating promastigote with compounds 1c, 2a, 3a, 3b, and 4b; and spectroscopic data of synthetic flavonoid derivatives.

---

## APÊNDICE

### **Outros projetos desenvolvidos durante o período de doutorado (2020-2024)**

De forma paralela, outros projetos envolvendo estudos experimentais e/ou computacionais foram desenvolvidos em parceria com diferentes grupos de pesquisa. Os resultados principais foram divulgados através de três artigos científicos publicados e um manuscrito aceito. Além disso, os resultados de bioatividade significativos dos análogos de flavonoide inspiraram a elaboração de outros projetos de pesquisa. Dentre eles, os compostos foram avaliados contra diferentes linhagens de coronavírus visando a identificação de um possível protótipo para o tratamento da COVID-19. O estudo foi realizado durante estágio interinstitucional na Universidade Federal de Minas Gerais sob coordenação da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rafaela Salgado Ferreira (LMMPF – UFMG) e da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (LVBA – UFMG). Os resultados serão compilados sob forma de manuscrito para futura publicação em periódico científico.

- a) Modelagem molecular como ferramenta para descoberta e otimização de protótipos;

O uso de metodologias computacionais aplicadas ao estudo de sistemas biológicos é cada vez mais relevante. As diversas metodologias permitem a compreensão de determinada atividade biológica comprovada experimentalmente bem como o desenho de novos compostos baseados no estudo de interações intermoleculares com o receptor. Atualmente, esses fatores tornam o planejamento de fármacos assistido por computador (CADD) um dos pilares do descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos. A metodologia de docking molecular foi utilizada em três projetos com objetivos distintos.

- i. Compreensão das diferenças de bioatividade dos enantiômeros da hipaforina;

A doença de Alzheimer é a patologia neurodegenerativa mais frequente associada à idade, cujas manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas resultam em deficiência progressiva e incapacitação. A acetilcolina é considerada o principal neurotransmissor associado à esta doença e, por isso, inibidores da enzima acetilcolinesterase vem sendo extensivamente estudados para o descobrimento de novos fármacos. A L-hipaforina, um alcalóide indol, demonstrou efeitos no sistema nervoso central (SNC). Este estudo, realizado no Laboratório de Química Orgânica e Biológica

(INBIO – UFMS), teve como objetivo a síntese da L-hipaforina e D-hipaforina, além da avaliação dos enantiômeros frente à acetilcolinesterase isolada de diferentes regiões cerebrais de ratos. Os resultados apontaram que a L-hipaforina suprimiu a atividade da acetilcolinesterase (AChE) apenas no cerebelo, enquanto a D-hipaforina inibiu a atividade da AChE em todas as regiões do SNC investigadas. A modelagem molecular foi empregada neste estudo com o objetivo de compreender as possíveis razões responsáveis pelas diferentes atividades demonstradas pelos enantiômeros. O estudo de docking molecular revelou que os enantiômeros de hipaforina possuem diferenças significativas no modo de ligação e interação estereoespecificamente com os resíduos de aminoácidos da AChE, confirmando os resultados *in vitro*.

Yonekawa, Murilo K.A.; Penteado, Bruna De B.; Dal'ongaro Rodrigues, Amanda; **Lourenço, Estela M.G.**; Barbosa, Euzébio G.; Das Neves, Silvia C.; De Oliveira, Rodrigo J.; Marques, Maria R.; Silva, Denise B.; De Lima, Dênis P.; Beatriz, Adilson; Oses, Jean P.; Dos S. Jaques, Jeandre A.; Santos, Edson Dos A. Dos. 1-Hypaphorine and d-hypaphorine: Specific antiacetylcholinesterase activity in rat brain tissue. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 47, p. 128206, 2021. DOI 10.1016/j.bmcl.2021.128206.

ii. Investigação da atividade antitubulínica de diaril dissulfetos e diaril tiosulfonatos;

A combretastatina A4 (CA-4), encontrada na casca do *Combretum caffrum*, é amplamente investigada por sua estrutura química simples e potente atividade citotóxica através da interação reversível com o sítio colchicina da  $\beta$ -tubulina. Tiosulfonatos de arila assim como os dissulfetos de arila são conhecidos por suas diferentes aplicações na indústria química, alimentícia e potencial farmacêutico. Entretanto, seus efeitos antiproliferativos ainda são inexplorados. Realizado no Laboratório de Síntese e Transformação de Moléculas Orgânicas (SINTMOL – UFMS) em parceria com o National Cancer Institute (NCI – USA), o estudo teve como objetivo a síntese de derivados de dissulfetos de diarila e tiosulfonatos. A citotoxicidade dos compostos obtidos foi avaliada contra a linhagem celular tumoral MCF-7. Os resultados demonstraram uma diferença significativa entre os derivados de dissulfetos de diarila e tiosulfonatos. Para investigar como as diferenças estruturais dos compostos sintetizados influenciam na interação com o sítio colchicina da  $\beta$ -tubulina, a metodologia de docking molecular foi utilizada. Os modos de interação apontados pelas simulações de docking molecular foram consistentes com os achados experimentais. O derivado de tiosulfonato

mais potente, **3c**, demonstrou diversas possíveis interações intermoleculares com os resíduos de aminoácido do sítio ativo do alvo farmacológico. Em contrapartida, um número consideravelmente menor de interações com o sítio ativo foi observado no modo de ligação do derivado mais potente de dissulfeto de diarila (**2g**).

Khodyuk, Rejane G. D.; Bai, R.; Hamel, E.; **Lourenço, Estela M. G.**; Barbosa, Euzébio G.; Beatriz, A.; Dos Santos, E. Dos A.; De Lima, D. P.. Diaryl disulfides and thiosulfonates as combretastatin A-4 analogues: Synthesis, cytotoxicity and antitubulin activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, p. 104017, 2020.

*iii.* Investigação do mecanismo de ação antiparasitário de derivados de hidrazida aromática de naftoquinona;

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos visando o tratamento de Doenças Tropicais Negligenciadas pode adotar diferentes estratégias para otimizar as chances de identificação de um possível protótipo. Dentre elas, a hibridização molecular consiste no planejamento e obtenção de novas entidades químicas baseadas na fusão de fragmentos moleculares bioativos de moléculas com reconhecido potencial farmacológico. O manuscrito reporta o design, síntese e identificação de quatro novos híbridos moleculares de hidrazidas e nafotquinonas resultantes da fusão de fragmentos moleculares de acil-hidrazidas aromáticas e lausona. O composto **13** se destacou por sua baixa citotoxicidade e elevada potência contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* e epimastigotas de *T. cruzi*. Já o híbrido **15** que possui pequenas diferenças estruturais em relação ao composto mais potente, demonstrou baixa atividade contra os parasitos. Estes dois compostos formam um Activity Cliff (AC) que é definido como um par ou grupo de moléculas marcadas por alta similaridade estrutural e marcante diferença na bioatividade. A análise de ACs é de grande interesse na interpretação da relação estrutura-atividade de uma série de moléculas. Os dados da literatura e resultados das simulações de docking molecular apontaram as cisteíno proteases cruzaina, rodesaina e CPB2.8 como potenciais alvos farmacológicos responsáveis pelas atividades antiparasitárias. A análise das interações intermoleculares corroborou com as diferenças na potência dos compostos testados, gerando dados que auxiliaram em um futuro estudo de otimização molecular dos híbridos obtidos. O estudo foi realizado no Laboratório de Síntese e Transformação de Moléculas Orgânicas (SINTMOL – UFMS) em parceria com o Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura (UEM).

Cezar, Rosane D.; Da Silva, Adriano O.; Lopes, Rosângela S.; Nakamura, Celso V.; Rodrigues, Jean H. S.;  **Lourenço, Estela M. G.**; Saba, S.; Beatriz, A.; Rafique, J.; De Lima, D. P. Design, synthesis and identification of novel molecular hybrids based on naphthoquinone aromatic hydrazides as potential trypanocide and leishmanicidal agent. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. *Artigo aceito (Jul. 2023)*.

- b) Uso da citometria de fluxo para investigar possíveis mecanismos de ação de agentes antiparasitários;

O estudo, realizado no Laboratório de Parasitologia Humana (INBIO – UFMS) em parceria com o Instituto de Química (INQUI - UFMS), detalha a atividade antileishmania e a citotoxicidade de complexos de usnato de sódio (SAU) com íons lantanídeos. Os complexos foram altamente ativos contra as formas promastigota e amastigota intracelulares de *L. amazonensis*. Os lantanídeos demonstraram influência na atividade, uma vez que a potência dos complexos foi maior que a atividade do usnato de sódio reconhecido por seu efeito de apoptose em diversas espécies do gênero *Leishmania*. Os resultados geraram questionamentos acerca do possível mecanismo de ação exercido pelos complexos testados. Dentre as abordagens utilizadas para esta investigação, a citometria de fluxo é considerada uma metodologia promissora e vem sendo marcada na última década pelos avanços na classificação, manuseio de amostragem e aumento de sensibilidade. A incubação de promastigotas com os complexos de lantanídeos, particularmente com  $\text{SmL}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{GdL}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , levou a uma alteração no potencial da membrana mitocondrial do parasito, indicando a capacidade destes complexos em atingir esta organela essencial. Os mesmos complexos causaram a morte celular através da ruptura da membrana celular. Entretanto, a sua relação com processos apoptóticos precoces ou tardios ainda não são totalmente compreendidas.

Da Silva, F.; Rizk, Yasmin S.; das Neves, Amarith R.;  **Lourenço, Estela M. G.**; Ferreira, Alda M. T.; Monteiro, Melquesedeque M.; De Lima, D. P., Perdomo, Renata T.; Bonfá Illuska S.; Toffoli-Kadri, Mônica C.; et al. Antileishmanial Activity, Toxicity and Mechanism of Action of Complexes of Sodium Usnate with Lanthanide Ions: Eu(III), Sm(III), Gd(III), Nd(III), La(III) and Tb(III). **International Journal of Molecular Sciences**. 2024; 25(1):413. DOI 10.3390/ijms25010413.

---

c) Identificação de novos protótipos para o tratamento da infecção por COVID-19.

Os estudos realizados com os 17 derivados sintéticos de flavonoide demonstraram uma alta capacidade de inibição das cisteíno proteases de *Leishmania* rCPB2.8, rCPB3 e rH84Y. Estes alvos moleculares são catepsinas L-like e, portanto, a similaridade estrutural entre as catepsinas e as cisteíno proteases testadas é notória. As catepsinas B e L vem sendo descritas como enzimas essenciais para a entrada do vírus SARS-CoV-2 nas células do hospedeiro. Dessa forma, inibidores destas enzimas podem reduzir a infecção através do bloqueio da penetração viral. Considerando as informações de similaridade estrutural protéica e a importância farmacológica das catepsinas, os análogos de flavonoide foram testados frente às catepsinas B e L. Os resultados de inibição enzimática foram promissores e os estudos *in vitro* para avaliação do potencial antiviral estão em fase final. Os dados serão compilados sob a forma de manuscrito para publicação em periódico científico internacional. O estudo foi coordenado pelo Prof. Dr. Dênis Pires de Lima (SINTMOL – UFMS) em parceria com o Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB - UMC). Os ensaios de avaliação do potencial antiviral dos compostos e a modelagem molecular estão sendo realizados em estágio interinstitucional com a Universidade Federal de Minas Gerais sob coordenação da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (LVBA – UFMG) e da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rafaela Salgado Ferreira (LMMPF – UFMG), respectivamente.