



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS  
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



**GLEICE RAYANNE DA SILVA LINHARES**

**ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO (E)-1-(BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA FRENTE A  
*Leishmania braziliensis*: produção de ROS, interação molecular e efeito  
potencializador da forma nanoparticulada**

**João Pessoa-PB**

**2025**

Gleice Rayanne da Silva Linhares

**ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO (E)-1-(BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA FRENTE A**

***Leishmania braziliensis*: produção de ROS, interação molecular e efeito potencializador da forma nanoparticulada**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para obtenção do título de doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra

**Co-orientador:** Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães

**João Pessoa-PB**

**2025**

**Catalogação na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação**

L755e Linhares, Gleice Rayanne da Silva.  
Estudo do potencial terapêutico do  
(E)-1-(BENZO[D][1,3]DIOXOL5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-MET  
OXIFENIL) PROP-2-EN-1-ONA frente a Leishmania  
braziliensis : produção de ROS, interação molecular e  
efeito potencializador da forma nanoparticulada /  
Gleice Rayanne da Silva Linhares. - João Pessoa, 2025.  
136 f. : il.

Orientação: Felipe Queiroga Sarmento Guerra.  
Coorientação: Hemerson Iury Ferreira Magalhães.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Leishmaniose. 2. Chalconas. 3. Atividade  
farmacológica. 4. Nanotecnologia. I. Guerra, Felipe  
Queiroga Sarmento. II. Magalhães, Hemerson Iury  
Ferreira. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.928.5 (043)

## **DEDICATÓRIA**

...Ao meu filho Benício, que se tornou a razão de todo esforço, me tornando forte e corajosa, ao qual almejo repassar toda a educação que me foi ofertada.

...A toda a minha família, que torceu por mim ao longo deste percurso, fornecendo uma educação de qualidade, segurança e amor. Em especial a minha mãe, que através da sua profissão, faxineira, conseguiu me fazer doutora.

...Ao meu esposo, por toda ajuda, esforço e empenho pra que eu pudesse concluir essa nova etapa profissional.

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo a Deus, pai amado, amigo, que me amparaste nas aflições, cuidando de tudo, me trazendo paz, amor e segurança. A Ele toda gratidão e glória.

Ao meu orientador Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra por toda confiança, ensinamentos e paciência ao longo de metade dessa jornada. Profissional dedicado a profissão que Deus o confiou, realizando-a com maestria, exemplo de pesquisador que levarei pra vida.

Ao meu co-orientador Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães por toda ajuda e empenho, me auxiliando e abrindo caminhos, sempre acreditando em mim. Gratidão!

À Dra. Elisalva Teixeira Guimarães, sempre solícita, experiente e uma pessoa de coração gigante, e a todo o seu laboratório, me estendendo a Dra. Milena Botelho, por todos os conhecimentos compartilhados, direcionamentos e ajuda. Carrego comigo a gratidão a todos vocês que fizeram esse trabalho acontecer.

Ao Dr. Francisco Humberto Xavier-Júnior, por toda colaboração, parceria e ajuda. A todo seu laboratório de pesquisa, em especial à Graziela Pereira e Ana Flávia Uchôa, que me auxiliaram durante os trabalhos em seu laboratório.

A Fernando Ferreira, colaborador e amigo, que trabalhamos juntos na produção de ciência, obrigada por toda ajuda e auxílio nesse período.

A Natália Ferreira e Chonny Herrera, colaboradores e amigos, que me auxiliaram na realização dos testes *in silico* com tanta paciência e parceria.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos que nos passaram conhecimentos e força, acreditando na pesquisa e na educação como uma forte arma.

Aos funcionários da PgPNSB, em especial à Caroline Mangueira, grande profissional e exemplo de dedicação.

A CAPES e a UFPB pelo apoio financeiro e as condições para a realização do trabalho.

Aos meus amigos Nathalia Xavier, Marina Farias, Valgricia Souza, Lidiany Freire, Priscilla Sobral e Maira Ludna, por todo carinho e apoio, sendo ânimo e força.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho, o meu muito obrigada!

## RESUMO

A leishmaniose se caracteriza como uma doença tropical negligenciada que representa um importante problema de saúde pública. No Brasil, *Leishmania braziliensis* é a principal espécie causadora da forma mucocutânea da doença. O arsenal terapêutico disponível apresenta importantes limitações, como elevada toxicidade, resistência parasitária e esquemas terapêuticos prolongados. Diante desses desafios, as chalconas emergem como candidatas promissoras devido apresentarem baixa toxicidade em células de mamíferos e modularem vias oxidativas do parasito. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar através de testes *in silico* e *in vitro* o potencial leishmanicida de quatro chalconas sintéticas inéditas frente a *L. braziliensis*, a influência de FERA1 na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), interações intermoleculares com possíveis alvos enzimáticos e uma provável potencialização dos efeitos com a forma encapsulada de FERA1. Para tal, foram utilizadas as ferramentas computacionais PASS filter, MolPredictX, *Molegro Virtual Docker (MVD)* 6.0 e GROMACS para os testes *in silico*. As avaliações de atividade antileishmania, ensaios de citotoxicidade e determinação da modulação de ROS foram realizados por meio de testes *in vitro*. A caracterização das nanopartículas se deu por Zetasizer Lab. Os estudos de predição indicaram uma provável atividade das 4 chalconas contra *L. braziliensis*. No estudo *in vitro*, FERA1 apresentou potente atividade leishmanicida tanto para promastigotas como amastigotas de *L. braziliensis*, com baixa citotoxicidade ( $CC_{50} > 50 \mu M$ ), reduzindo significativamente a infecção em macrófagos murinos. Os ensaios de ROS revelaram aumento dos níveis de ROS de forma dependente de concentração, sugerindo a indução de um desequilíbrio redox como um dos mecanismos de ação. Os estudos de *docking* molecular identificaram a tripanotionina redutase (TryR) e a di-hidro-orotato desidrogenase (DHODH) como alvos potenciais. A FERA1-NANO demonstrou possuir baixa citotoxicidade ( $CC_{50} > 50 \mu M$ ) e uma atividade antileishmania cerca de 1,15 vezes superior em promastigotas de *L. braziliensis* ( $CE_{50}$  de  $12,25 \pm 0,12 \mu M$ ) quando comparada com a FERA1 livre ( $CE_{50}$  de  $14,08 \pm 0,5 \mu M$ ). Além disso, FERA1-NANO reduziu tanto a infecção como o número de amastigotas em macrófagos murinos infectados. Conclui-se, então, que FERA1 representa um candidato promissor como nova droga antileishmania, combinando seletividade, mecanismo de ação multifatorial e potencial de

otimização por nanoencapsulação.

**Palavras chave:** atividade farmacológica, chalconas, design de drogas assistida por computadores, nanotecnologia.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is characterized as a neglected tropical disease that represents a major public health problem. In Brazil, *Leishmania braziliensis* is the main species causing the mucocutaneous form of the disease. The available therapeutic arsenal has important limitations, such as high toxicity, parasite resistance and prolonged therapeutic regimens. Faced with these challenges, chalcones emerge as promising candidates due to their low toxicity in mammalian cells and modulation of oxidative pathways of the parasite. In this context, the objective of the present study was to investigate through *in silico* and *in vitro* tests the leishmanicidal potential of four novel synthetic chalcones against *L. braziliensis*, the influence of FERA1 on the production of reactive oxygen species (ROS), intermolecular interactions with possible enzymatic targets and a probable potentiation of the effects with the encapsulated form of FERA1. For this purpose, the computational tools PASS filter, MolPredictX, *Molegro Virtual Docker* (MVD) 6.0 and GROMACS were used for *in silico* tests. The antileishmanial activity evaluations, cytotoxicity assays and determination of ROS modulation were performed through *in vitro* tests. The characterization of the nanoparticles was performed by Zetasizer Lab. The prediction studies indicated a probable activity of the four chalcones against *L. braziliensis*. In the *in vitro* study, FERA1 showed potent leishmanicidal activity for both *L. braziliensis* promastigotes and amastigotes, with low cytotoxicity ( $CC_{50} > 50 \mu M$ ), significantly reducing infection in murine macrophages. ROS assays revealed an increase in ROS levels in a concentration-dependent manner, indicating the induction of a redox imbalance as one of the mechanisms of action. Molecular docking studies identified trypanothione reductase (TryR) and dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) as potential targets. FERA1-NANO demonstrated low cytotoxicity ( $CC_{50} > 50 \mu M$ ) and an antileishmanial activity approximately 1.15 times higher in *L. braziliensis* promastigotes ( $EC_{50}$  of  $12.25 \pm 0.12 \mu M$ ) when compared to free FERA1 ( $EC_{50}$  of  $14.08 \pm 0.5 \mu M$ ). Furthermore, FERA1-NANO prevents both infection and the number of amastigotes in infected murine macrophages. It is concluded that FERA1 represents a promising candidate as a new antileishmanial drug, combining selectivity, multifactorial mechanism of action and potential for optimization by nanoencapsulation.

Keywords: chalcones, computer-assisted drug design, nanotechnology,

pharmacological activity.

### **Lista de Abreviaturas e siglas**

AB	Anfotericina B
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica de 50% (do inglês: <i>cytotoxicity concentration</i> )
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica (do inglês: <i>thin-layer chromatography</i> )
Cl <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% (do inglês: <i>50% inhibitory concentration</i> )
DHODH	Di-hidro-orotato desidrogenase
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbeco (do inglês: <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
DMF	Dilmetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
FERAI	Chalcona bromada isolada utilizada no estudo (chalcona 4)
IS	Índice de seletividade
L-AmB	Anfotericina B lipossomal
LC	Leishmaniose cutânea
LIT	Triptose infusão de fígado (do inglês: <i>liver infusion tryptose</i> )
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MVD	<i>Molegro Virtual Docker</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pa	Provável atividade
PASS	Predição de espectros de atividade para substâncias (do inglês: <i>prediction of activity spectra for substances</i> )
PBS	Tampão fosfato-salina (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i> )
PDB	Protein data bank
Pi	Provável inatividade
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto

TAD	Teste de aglutinação direta
TIC	Teste rápido imunocromatográfico
TryR	Tripanotonia redutase
VG	Violeta de genciana

## **Lista de Figuras**

**Figura 1** - Distribuição geográfica das principais espécies de *Leishmania* e seus principais reservatórios

**Figura 2** - A) Casos e taxa de detecção de LT por ano de notificação B) Total de novos casos de infecção de LT por estado

**Figura 3** - Ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania*

**Figura 4** - Estrutura química dos flavonoides

**Figura 5** - Estrutura geral das chalconas

**Figura 6** - Metilação na hidroxila livre do 4-hidroxibenzaldeído

**Figura 7** - Etilação na hidroxila livre do 4-hidroxibenzaldeído

**Figura 8** - Alilação na hidroxila livre do 4-hidroxibenzaldeído

**Figura 9** - Condensação aldólica dos derivados obtidos do 4-hidroxibenzaldeído com o 3,4-(metilenodioxi)acetofenona

**Figura 10** - Reação de bromação da vanilina

**Figura 11** - Etilação na hidroxila livre da bromo-vanilina

**Figura 12** - Condensação aldólica entre a bromo etil vanilina e a 3,4-(metilenodioxi)acetofenona

**Figura 13** - Efeito da FERAI contra parasitos intracelulares de *L. braziliensis*

**Figura 14** - Avaliação dos níveis de ROS intracelulares em promastigotas de *L. braziliensis*

**Figura 15** - Alinhamento da sequência da enzima Tripanotonia Redutase de *L. braziliensis* (1) e do molde (Tripanotonia Redutase de *L. infantum*) (2)

**Figura 16** - Alinhamento da sequência da enzima Di-hidro-orotato Desidrogenase de *L. braziliensis* (1) e do molde (Di-hidro-orotato desidrogenase de *L. major*) (2)

**Figura 17** - Alinhamento da sequência da enzima UDP-Glicose Pirofosforilase de *L. braziliensis* (1) e do molde (UDP-Glicose Pirofosforilase de *L. major*) (2)

**Figura 18** - Gráfico de Ramachandran do modelo de homologia gerado para as enzimas: Di-hidro-orotato Desidrogenase (A), Tripanotonia Redutase (B) e UDP Glicose Pirofosforilase (C)

**Figura 19** - Interações 2D e 3D entre o composto teste, a AB e a proteína Di-

hidro-orotato Desidrogenase

**Figura 20** - Interações 2D e 3D entre o composto teste, a AB e a enzima Tripanotiona Redutase

**Figura 21** - RMSD de átomos de C $\alpha$ . A) Tripanotiona redutase (preta), complexada com FERAI (vermelho) e AB (verde). B) FERAI (linha preta) e AB (linha vermelha). C) Di-hidro-orotato desidrogenase (preta), complexada com FERAI (vermelho) e AB (verde). D) FERAI (linha preta) e AB (linha vermelha)

**Figura 22** - RMSF de átomos. A) Enzima tripanotiona redutase (linha preta) complexada a FERAI (linha vermelha) e AB (linha verde). B) Enzima Di-hidro-orotato desidrogenase (linha preta) complexada a FERAI (linha vermelha) e AB (linha verde)

**Figura 23** - Efeito da FERAI e da sua forma nanoparticulada contra parasitos intracelulares de *L. braziliensis*

## **Lista de Quadro e tabelas**

**Quadro 1** - Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo

**Tabela 1** - Predição de atividade biológica do composto 1

**Tabela 2** - Predição de atividade biológica do composto 2

**Tabela 3** - Predição de atividade biológica do composto 3

**Tabela 4** - Predição de atividade biológica do composto 4

**Tabela 5** - Predição da atividade biológica da chalcona no MolPredictX

**Tabela 6** - Avaliação da citotoxicidade (CC<sub>50</sub>), metade da concentração máxima efetiva para 50% das formas promastigotas e parasitos intracelulares (CE<sub>50</sub>) e IS das chalconas

**Tabela 7** - Avaliação dos níveis de ROS intracelulares em promastigotas de *L. braziliensis* (média e desvio padrão de amostras de controle positivo e controle não tratado)

**Tabela 8** - Valores de energia de ligação analisados nas três proteínas selecionadas no estudo

**Tabela 9** - Valores de energia de interação de Coulomb e Lennard-Jonnes para tripanotiona redutase

**Tabela 10** - Valores de energia de interação de Coulomb e Lennard-Jonnes para di-hidro-orotato desidrogenase

**Tabela 11** - Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta encontrados para as formulações produzidas usando Lipoid® S100 (1%) como surfactante lipofílico

**Tabela 12** - Avaliação da citotoxicidade (CC<sub>50</sub>), metade da concentração máxima efetiva para 50% das formas promastigotas (CE<sub>50</sub>) e IS das chalconas

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>20</b>
2.1 LEISHMANIOSE.....	21
2.1.1 Apresentações clínicas da leishmaniose .....	23
2.1.2 Ciclo de vida do parasito e transmissão da leishmaniose .....	26
2.1.3 Diagnóstico da leishmaniose .....	28
2.1.4 Tratamento da leishmaniose .....	30
2.2 PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS .....	33
2.2.1 Flavonoides .....	35
2.2.2 Chalconas.....	38
2.3 QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	41
2.4 NANOTECNOLOGIA.....	43
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
4.1 TIPO DE ESTUDO .....	49
4.2 LOCAL DE ESTUDO.....	49
4.3 PRODUTOS-TESTE .....	49
4.3.1 Síntese das chalconas.....	49
4.3.1.1 Derivados do 4-hidroxi benzaldeído .....	49
4.3.1.2 Síntese da bromo-chalcona.....	52
4.4 ESTUDO <i>in silico</i> DE PREDIÇÃO DE ESPECTROS DE ATIVIDADE PARA SUBSTÂNCIAS (PASS filter e MolPredictX).....	54
4.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS .....	55
4.6 CULTIVO DE PARASITOS .....	55
4.7 TESTE DE CITOTOXICIDADE SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS <i>in vitro</i> .....	56
4.8 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA .....	56
4.9 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	57
4.10 INFECÇÃO <i>in vitro</i> DE MACRÓFAGOS MURINOS E TRATAMENTO COM FERAI.....	57
4.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).....	58
4.12 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS .....	58
4.13 MODELAGEM POR HOMOLOGIA.....	59

---

4.14 DOCKING MOLECULAR .....	59
4.15 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR .....	61
4.16 PRODUÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (NLCs) .....	62
4.17 CARACTERIZAÇÃO DE NLCs .....	62
4.18 INCORPORAÇÃO DA FERAI AO NLC .....	63
4.19 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DA FERAI-NANO .....	63
4.20 ENSAIO DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA FERAI-NANO .....	64
4.21 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE .....	64
4.22 INFECÇÃO <i>in vitro</i> DE MACRÓFAGOS MURINOS E TRATAMENTO COM FERAI-NANO .....	64
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
5.1 PASS FILTER E MolPredictX .....	67
5.2 TESTE DE CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DAS CHALCONAS .....	74
5.3 INFECÇÃO <i>in vitro</i> DE MACRÓFAGOS MURINOS E TRATAMENTO COM FERAI .....	77
5.4 EFEITO DE FERAI SOBRE A MODULAÇÃO DE ROS EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> .....	79
5.5 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS .....	83
5.6 MODELAGEM POR HOMOLOGIA .....	87
5.7 DOCKING MOLECULAR .....	89
5.8 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR .....	95
<b>5.8.1 <i>Tripanotonia redutase</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>5.8.2 Di-hidro-orotato desidrogenase .....</b>	<b>99</b>
5.9 PRODUÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (NLCs) .....	100
5.10 TESTE DE CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DE FERAI-NANO .....	104
5.11 INFECÇÃO <i>in vitro</i> DE MACRÓFAGOS MURINOS E TRATAMENTO COM FERAI-NANO .....	107
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>135</b>

# Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são constituidas por vinte doenças endêmicas infecciosas causadas por bactérias, vírus e parasitos. Entre essas DTNs causadas por parasitos, destaca-se a leishmaniose que possui ampla incidência e mortalidade em humanos (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021; TRIPATHI; NAILWAL, 2021). O aumento do número de casos de leishmaniose, assim como o crescimento das áreas de transmissão e seu elevado impacto na saúde pública demonstram que ainda são muitos os desafios existentes para o sucesso da vigilância e controle dessa doença (SANGENITO *et al.*, 2019; CARSTENS-KASS *et al.*, 2021; CARVALHO *et al.*, 2023).

A transmissão da leishmaniose se dá através de vetores fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, mais conhecidos por “mosquito-palha” (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021; CECÍLIO; SILVA; OLIVEIRA, 2022). Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* são descritas, com destaque a *Leishmania infantum* e a *Leishmania donovani* associadas à leishmaniose visceral (LV), e a *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis* mais associadas à leishmaniose tegumentar (LT) (LAINSON, 2010; MAURÍCIO, 2018; VALERO; URIARTE, 2020). No Brasil, a leishmaniose mucocutânea é predominantemente causada por *L. (V.) braziliensis*, esse parasito possui a grande capacidade de causar lesões mucocutâneas persistentes e de evolução rápida após a lesão inicial, o que diferenciam de outras espécies e contribuem para a complexidade da doença (PATINO *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-VEGA *et al.*, 2021; MS, 2024).

Os medicamentos existentes para o tratamento da leishmaniose possuem alto custo e estão associados à efeitos adversos que implicam na qualidade de vida dos pacientes (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Tais problemas fizeram com que a ciência se concentrasse no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento dessa doença. Na última década, despontaram diversos medicamentos baseados em alvos moleculares, que atuam em vias bioquímicas cruciais dos parasitos causadores dessa parasitose (BRAGA, 2019; JAIN *et al.*,

2022).

Dentre esses possíveis fármacos, destacam-se o potencial das substâncias sintéticas. Resultados promissores vêm sendo demonstrados através de pesquisas, particularmente no que se refere a derivados dos flavonoides, produtos naturais com amplo campo de estudo na área de desenvolvimento de medicamentos (RAJ et al., 2020; PAL et al., 2023). As chalconas, precursores biossintéticos dos flavonoides, destacam-se como representantes promissores com atividade antileishmania comprovada. Essa classe de compostos demonstra eficácia contra diversas espécies de *Leishmania*, incluindo *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, esta última sendo o foco do presente estudo (GARCIA et al., 2021; SANTIAGO-SILVA et al., 2022; HERNANDÉZ-RIVERA et al., 2023; NEVES et al., 2024).

Os avanços nas pesquisas para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas têm favorecido que tecnologias estejam associadas a esse processo, como é o caso de nanocarreadores de fármacos (MANIMARAN et al., 2023; BEACH et al., 2024). Se por um lado tem-se pesquisas por substâncias que possuem uma eficácia e uma potência maiores do que os medicamentos disponíveis no mercado, por outro, tem-se estudos que buscam optimizar o alcance dessas substâncias em seus alvos, com maior especificidade, agilidade e segurança (SADYBEKOV; KATRITCH, 2023; TIWARI et al., 2023).

Nesse ponto de vista, é fundamental que não apenas substâncias inovadoras surjam, como também sejam associadas tecnologias que proporcionem resultados otimizados que possam superar os quesitos de eficácia e segurança toxicológica dos medicamentos disponíveis no mercado (PONTE-SUCRE et al., 2017; FRÉZARD et al., 2022). Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar por meio de abordagens *in silico* e *in vitro* o potencial leishmanicida de chalconas sintéticas, avaliando a modulação de ROS *in vitro* e outros possíveis mecanismos de ação por meio de abordagens computacionais, além da investigação de um efeito potencializador da forma encapsulada de FERAL na atividade antileishmania.

# **Fundamentação teórica**

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 LEISHMANIOSE

As leishmanioses são um complexo de doenças tropicais endêmicas e negligenciadas que possuem ampla morbidade e mortalidade, exercendo profundo efeito na saúde da comunidade global (AL-KAMEL, 2017; BAILEY *et al.*, 2017; TRIPATHI; NAILWAL, 2021). Essa doença é causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, dos quais aproximadamente 39 espécies já foram identificadas e descritas na literatura. A transmissão ocorre por meio da picada de vetores pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo), popularmente denominados como “mosquitos-palha” (AL-KAMEL, 2017; VALERO; URIARTE, 2020).

A sua evolução está intrinsecamente relacionada à atividade humana, portanto, os principais fatores envolvidos no avanço histórico entre *Leishmania* e seus possíveis reservatórios estão vinculados diretamente com a progressão geográfica do terreno (TRIPATHI; NAILWAL, 2021). A migração de pessoas não imunes a doença para áreas onde há uma alta transmissão, favorece o desenvolvimento de epidemias. Além disso, a incidência da doença pode ser influenciada também por mudanças nos processos de urbanização, incursão humana ou desmatamento em áreas florestais (WHO, 2023).

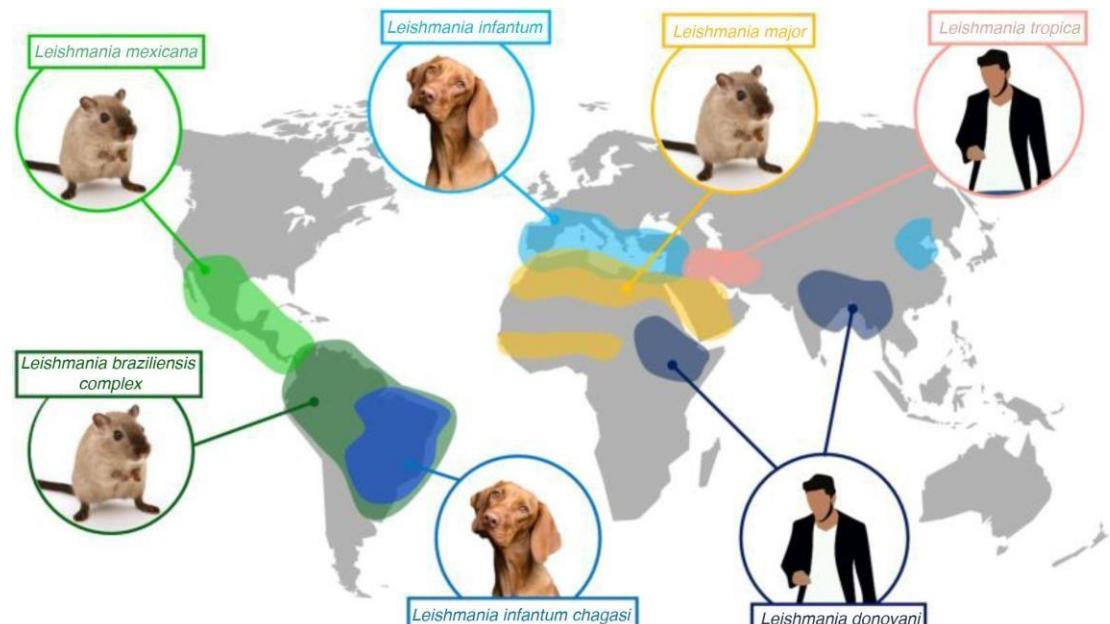
As alterações supracitadas podem resultar ou favorecer as mudanças climáticas, que por sua vez, também afetam a disseminação da leishmaniose (GHATEE; TAYLOR; KARAMIAN, 2020). Variações na temperatura e na precipitação, podem resultar em mudanças no tamanho e na distribuição geográfica das populações de flebotomíneos, estando diretamente relacionadas a incidência dessa doença. De maneira similar, a seca, a fome e as inundações também causam migração de pessoas para áreas onde a transmissão do parasito é alta (WHO, 2023).

A prevalência da leishmaniose está diretamente ligada a outra condição importante, países subdesenvolvidos apresentam um índice muito maior de extensão dessa doença em sua população (KARAMI;

GORGANI-FIROUZJAAE; CHEHRAZI, 2023). Dessa forma, a leishmaniose é tida como uma doença tropical negligenciada e diretamente relacionada as condições econômicas do povo. Cerca de 99 países são endêmicos para leishmaniose, sendo Índia, Sudão, Quênia e Brasil os países que concentram a maior parte desses casos (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021; OPAS, 2024).

Ainda no que diz respeito a distribuição geográfica da leishmaniose (FIGURA 1), ela tem sido tradicionalmente classificada como sendo do Velho Mundo ou do Novo Mundo (LABBÉ *et al.*, 2023). A leishmaniose do Velho Mundo, endêmica em regiões da Ásia, África e Europa, é predominantemente causada pelas espécies *Leishmania tropica*, *L. major*, *Leishmania aethiopica*, *L. infantum* ou *L. donovani*. Já no Novo Mundo, a ocorrência da doença está localizada na América e é promovida principalmente pelas espécies *Leishmania mexicana*, *L. amazonensis*, *Leishmania panamensis*, *L. infantum chagasi* ou *L. braziliensis* (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021).

**Figura 1** - Distribuição geográfica das principais espécies de *Leishmania* e seus principais reservatórios



Fonte: Adaptado de Abadías-Granado *et al.* (2021).

### **2.1.1 Apresentações clínicas da leishmaniose**

De maneira geral, as leishmanioses se apresentam em três formas principais nos seres humanos: LV, Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose mucocutânea (LMC) (GARRIDO-JAREÑO *et al.*, 2020). A LC e a LMC constituem uma outra subdivisão da doença, a LT. A forma de diferenciação se dá através dos sinais clínicos que variam de acordo com o tipo de leishmaniose apresentada (FIOCRUZ<sub>a</sub>, 2024; OPAS, 2024).

A LV é caracterizada como a forma sistêmica na qual os parasitos podem ser encontrados em determinados órgãos do hospedeiro como baço, fígado, medula óssea e linfonodos. Como manifestações clínicas principais, os portadores apresentam febre prolongada, redução do peso corpóreo, hepatoesplenomegalia e pancitopenia, que podem resultar em morte em cerca de 95% dos casos não tratados (COFFENG *et al.*, 2020; KALANI *et al.*, 2021).

Correspondendo a forma mais identificada da doença dentro da população, a LT compreende um amplo espectro de manifestações clínicas, tais como: desenvolvimento de lesões cutâneas ulcerativas localizadas, lesões disseminadas/difusas e lesões nas mucosas (FREIRE *et al.*, 2021). Todas essas apresentações, por vezes, dão origem a deformidades faciais frequentes nos pacientes acometidos, comprometendo não só de forma funcional, como também a vida social dessas pessoas (PENA *et al.*, 2020; YIZENGAW; NIBRET, 2024).

De maneira mais específica, as manifestações cutâneas da LT seguem fases de evolução. As lesões de pele localizadas são os achados iniciais, se limitando em diâmetro e localização. Caso progridam, surgem as lesões cutâneas difusas que podem avançar dando origem a lesões mucocutâneas mais graves. O curso clínico da doença depende de fatores intrínsecos ao parasito, ao vetor e ao hospedeiro (GUERY *et al.*, 2021; FANTECELLE *et al.*, 2024).

Apesar da possibilidade de reversão das lesões de LC em 70–80% dos casos, é fundamental que ocorra o diagnóstico e tratamento pois podem causar um alto grau de morbidade, estigmatização social e, em

alguns casos, evoluir para LMC (LAGO *et al.*, 2019; BALLART *et al.*, 2021).

As diferentes manifestações clínicas podem ser explicadas pelo grande número de espécies que constituem o gênero *Leishmania*, com pelo menos 39 dessas já relatadas na literatura (CALDERON-ANYOSA *et al.*, 2018; MAURÍCIO, 2018). Dentre as espécies de maior interesse, destacam-se a *L. infantum/chagasi* e a *L. donovani* que causam a LV e a *L. amazonensis*, a *L. braziliensis* e a *L. major* causadoras da LT. Estas apresentações se distinguem na imunopatologia e quanto a morbimortalidade (SCHREIFER *et al.*, 2005; LAINSON, 2010; MAURÍCIO, 2018).

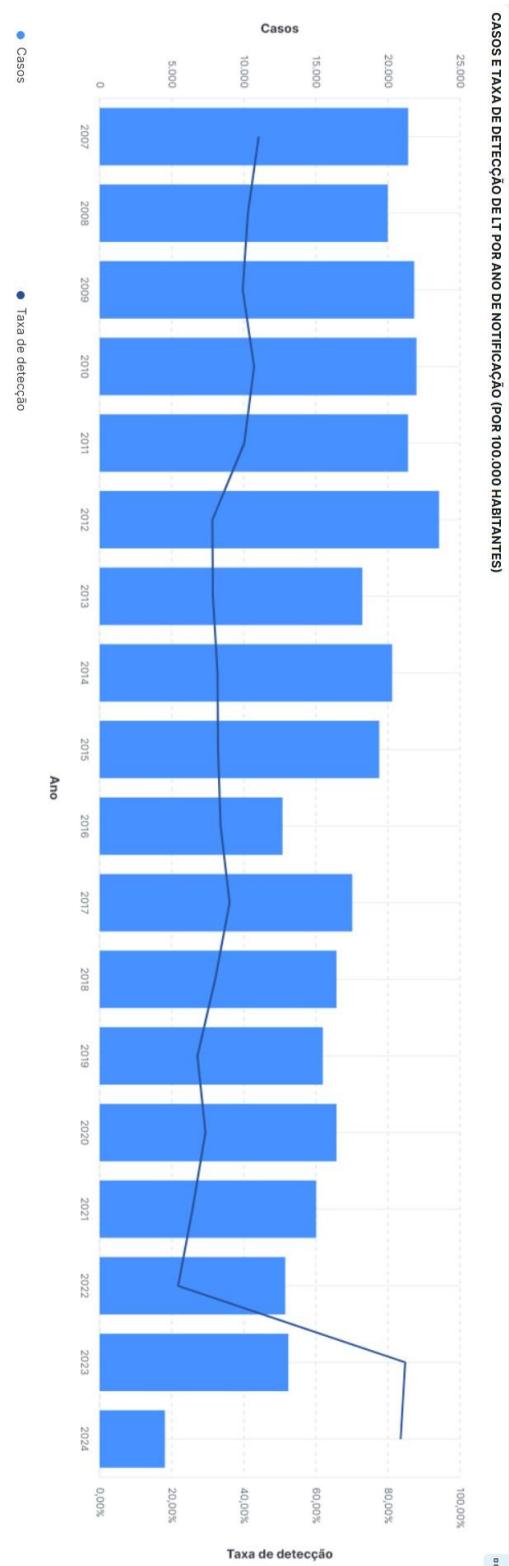
No Brasil, as espécies de protozoários do gênero *Leishmania* mais envolvidas nos casos de LMC são: *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L.* (*Viannia*) *guyanensis* e *L.* (*V.*) *braziliensis* (MS, 2024). A espécie *L. braziliensis* é o agente etiológico com maior importância de causalidade da leishmaniose na América Latina. A persistência do parasito nos seres humanos após o aparecimento da lesão inicial única e sua capacidade intrínseca de metastatizar são observações da infecção por esta espécie (PATINO *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-VEGA *et al.*, 2021).

Tanto os fatores fisiológicos do parasito quanto os do hospedeiro influenciam a patogênese dessa forma clínica da doença, no caso específico da *L. braziliensis* isso está relacionado ao polimorfismo e a diferenças genotípicas nos cromossomos 28 e 42. Essas diversidades genotípicas entre isolados de *L. braziliensis* têm sido associadas a diferentes manifestações clínicas, assim como, à gravidade e a sua falha em responder a medicamentos utilizados para o tratamento da doença (PATINO *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2024).

No ano de 2023, quando foi realizado o último apanhado epidemiológico da LT no Brasil, foram registrados 13.091 novos casos da infecção, com uma taxa de detecção de 84,79% (cálculo para 100.000 habitantes). A distribuição da LT por território se dá preferencialmente nas regiões norte e nordeste, sendo Manaus, a cidade mais afetada, notificando 372 casos em 2023 (FIGURAS 2 - A e B) (RODRIGUES;

VIANA; BASTOS, 2021; MS, 2024).

**Figura 2 – A) Casos e taxa de detecção de LT por ano de notificação**



Legenda: taxa relativa a cada 100.000 habitantes.

### B) Total de novos casos de infecção de LT por estado



Legenda: cores mais intensas representam as áreas mais atingidas.

Fonte: MS (2024).

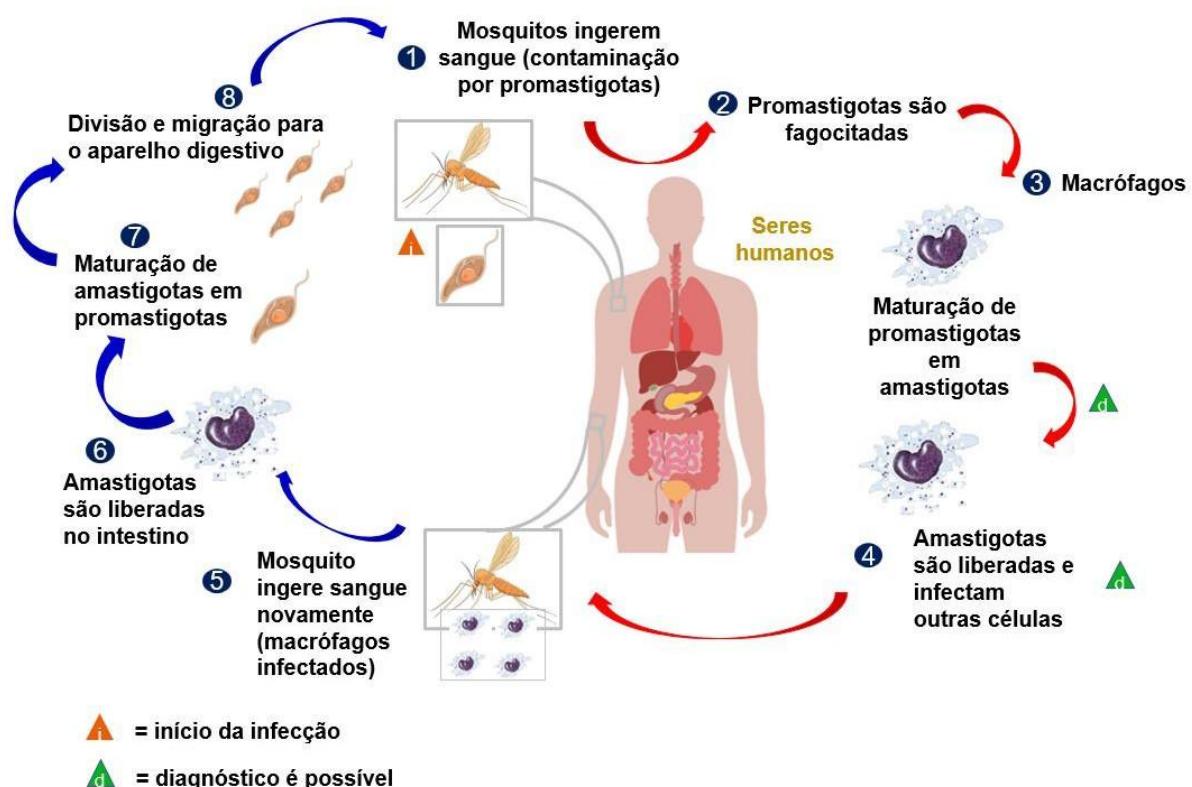
#### 2.1.2 Ciclo de vida do parasito e transmissão da leishmaniose

A transmissão da Leishmaniose se dá a partir da liberação de promastigotas flageladas pelas glândulas salivares durante a picada dos flebotomíneos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* no processo de repasto desses insetos. O ciclo de vida desses parasitos no mosquito é em torno de 10 dias, permanecendo no estado infeccioso. Após o contato nos seres humanos, essas promastigotas são fagocitadas por macrófagos/histiocitos dérmicos, em que se transformam obrigatoriamente na forma amastigota intracelular. Esses patógenos medem cerca de 2,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  e são especializados e adaptados para sobreviver no fagolisossomo da célula. Ocorre, então, a multiplicação dentro dos fagócitos do hospedeiro, geralmente macrófagos e granulócitos neutrofílicos, podendo, após sua liberação, infectarem outras células (LAZAR; ABASS, 2020; TAO; JIA, 2024).

Semanas após, o acúmulo de células inflamatórias (macrófagos, granulócitos neutrofílicos, células dendríticas, células T) resulta no

desenvolvimento de granuloma. O ciclo de vida do patógeno se conclui quando o mosquito ingere novamente as formas amastigotas durante o processo de alimentação, seguindo mais uma vez as fases (FIGURA 3) (STEBUT, 2015; LAZAR; ABASS, 2020). O período de incubação da *Leishmania* em humanos é variável, sendo em média de 2 a 3 meses, podendo ser mais curto (2 semanas) ou mais longo (2 anos) (OPAS, 2024).

**Figura 3 – Ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania***



Fonte: Autor (2024).

Nesse sentido, os parasitos do gênero *Leishmania* possuem duas morfologias distintas no seu ciclo de infecção, as promastigotas e as amastigotas (ESCALONA-MONTAÑO *et al.*, 2021). Algumas características fornecem capacidades especiais para cada forma, como é o caso das promastigotas, esses são revestidos por um glicocálix que atua

como uma barreira protetora contra as hidrolases do hospedeiro e dos componentes do soro na corrente sanguínea e no lúmen do trato digestivo dos insetos vetores. Essa característica não fornece apenas proteção, isso influencia também no processo de virulência, invasão de células hospedeiras, evasão e modulação imunológica (MULE *et al.*, 2020; KUMARI *et al.*, 2022).

A bolsa flagelar, uma invaginação da membrana plasmática que ocorre na base do flagelo, tanto na forma promastigota como na amastigota, é uma característica fundamental das células tripanossomatídeas e desempenha um papel crucial em vários processos vitais, entre eles, a diferenciação, a endo/exocitose, a montagem do flagelo e a definição dos limites da membrana superficial. Tais processos são de fundamental importância para a biologia celular subjacente ao ciclo de vida da *Leishmania* (SUNTER; MOREIRA-LEITE; GULL, 2018; ESCALONA-MONTAÑO *et al.*, 2021).

No tocante a sua transmissão, os seres humanos são afetados pela leishmaniose, contudo, não são transmissores diretos da doença, assim como cães, pequenos roedores e cavalos. Hoje, acredita-se que cerca de 70 espécies de animais podem ser a fonte de parasitos do gênero *Leishmania*, constatando uma ampla gama de possibilidades de transmissão (MONTANER-ANGOITI; LLOBAT, 2023; WHO, 2024).

### **2.1.3 Diagnóstico da leishmaniose**

O processo de diagnóstico é um ponto crucial que auxilia na seleção de métodos de terapia adequados, prevenção de transmissão da doença e redução dos sintomas para que o indivíduo afetado possa viver com bem-estar e uma melhor qualidade de vida (COSTA *et al.*, 2024).

O exame clínico é o ponto de partida para o diagnóstico, especialmente em indivíduos provenientes de áreas endêmicas que apresentam sinais e sintomas compatíveis com algum tipo de leishmaniose (OPAS, 2024). É realizada a anamnese do paciente com uma série de questionamentos, como: há quanto tempo os sintomas

surgiram, em que locais do corpo iniciaram, se apresenta alguma doença imunológica, se realizou alguma viagem a locais de maior incidência da leishmaniose. Tudo isso culminará numa triagem, direcionando o próximo passo do diagnóstico (DIXIT; SINGH; SALOTRA, 2020; AXMEDOVICH; SAMADOVNA; OBIDOVICH, 2021; HATAMI, 2022).

Os testes laboratoriais são adjuvantes e fornecem evidências que complementam no processo de confirmação (MANNAN *et al.*, 2021). O diagnóstico pode ser realizado por meio de exame direto, como o teste histológico para visualização do parasito, ou testes de cultivo de material obtido dos tecidos infectados (medula óssea, lesões da pele ou mucosas da face) através de aspiração, biópsia ou raspado das lesões do paciente. Há também métodos imunológicos específicos que avaliam a resposta de células do sistema imune e detectam a presença de anticorpos anti-*Leishmania*. Nessa categoria, encontram-se o teste cutâneo de Montenegro (FIOCRUZ<sub>a</sub>, 2024; HAN *et al.*, 2024; OPAS, 2024).

Apesar da variedade de testes disponíveis para o diagnóstico da leishmaniose, a reação cruzada com outros protozoários se apresenta como uma desvantagem que pode levar a uma variação na sensibilidade e na especificidade de acordo com a forma clínica da doença (BRITO *et al.*, 2020; COSTA *et al.*, 2024).

As ferramentas de bioinformática têm se apresentado como aliadas nas investigações sobre o diagnóstico da leishmaniose, particularmente para explorar proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos (BRITO *et al.*, 2020). Essas metodologias *in silico* se baseiam na predição de potenciais epítópos antigênicos/imunogênicos. Por possuírem uma abordagem simples, com baixo custo, minimizando variações na especificidade e fornecendo informações importantes que podem reduzir as despesas por meio do direcionamento do diagnóstico, essas ferramentas têm ganho ampla aceitação dentro da ciência (CHALLAPA-MAMANI *et al.*, 2023; PAGNIEZ *et al.*, 2023; COSTA *et al.*, 2024).

Em relação aos animais, atualmente são utilizados testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, como o Teste

de Aglutinação Direta (TAD) e o Teste Rápido Imunocromatográfico (TIC), principalmente para triagem devido a praticidade, baixo custo e alta sensibilidade. O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) é outra técnica de referência tanto para o diagnóstico nos seres humanos, como nos animais. Através dele é possível realizar a triagem em um grande número de amostras e a especificidade e sensibilidade podem ser aumentadas através da associação de múltiplos抗ígenos. No Brasil, o ELISA é estabelecido como teste confirmatório para Leishmaniose visceral canina pelo Ministério da Saúde e pode estar associado aos TICs. O TR DPP® leishmaniose é um teste rápido com tecnologia de imunoensaio cromatográfico *Dual Path Platform* utilizado em ações de campo dos serviços municipais da Secretaria de Vigilância em Saúde, ele foi desenvolvido pela Bio-Manguinhos/Fiocruz para o diagnóstico rápido da Leishmaniose visceral canina (SILVA *et al.*, 2019; FIOCRUZ<sub>b</sub>, 2024).

#### **2.1.4 Tratamento da leishmaniose**

O tratamento da leishmaniose apresentou avanços consideráveis desde suas primeiras descrições clínicas. No início do século XX, os compostos antimoniais pentavalentes, tendo como principais representantes o tartarato de antimônio e potássio, foram considerados como a terapia padrão, sendo a primeira abordagem farmacológica eficaz contra a doença. Sua alta eficácia, nessa época, produziu resultados animadores, contudo, esses medicamentos demonstraram possuir toxicidade cardíaca e hepática, além do surgimento de resistência, o que resultou na necessidade da busca por outras alternativas terapêuticas (RUGANI *et al.*, 2019; ROATT *et al.*, 2020; RUIZ-POSTIGO; JAIN, 2021).

Na década de 1940, a pentamidina despontou como uma opção ao tratamento da leishmaniose para casos refratários aos antimoniais. No entanto, de forma similar aos antimoniais, sua utilização foi limitada em função de efeitos adversos graves, como diabetes *mellitus* induzido por danos às células pancreáticas (ZHANG *et al.*, 2022; MOTA *et al.*, 2024). A anfotericina B (AB), que possui atividade reconhecida contra infecções

fúngicas, foi também aplicada para o tratamento da leishmaniose, em que se demonstrou eficaz mesmo em casos resistentes, apesar de ser um fármaco com ação nefrotóxica considerável (SHIRZADI, 2019; KUMARI *et al.*, 2022).

Com os avanços no desenvolvimento de medicamentos, em 1980 ocorreu o surgimento da anfotericina B lipossomal (L-AmB), que permitiu uma redução significativa nos efeitos colaterais e tornou os tratamentos mais curtos (BERMAN, 2019; SHIZARDI, 2019). A L-AmB se liga ao ergosterol presente na membrana celular do parasito e acredita-se que o lipossomo se decompõe, causando ruptura celular (BRUGGEMANN; JENSEN; LASS-FLÖRL, 2022). Estudos que envolvem a L-AmB em dose única ou reduzida, demonstram taxas de cura superiores a 95% (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

A metodologia inovadora de produção da L-AmB consiste no emprego de nanotecnologia, em que um fármaco, nesse caso a AB, passa por um processo de encapsulação em nanopartículas, o que otimiza a entrega desses medicamentos ao seu alvo (AL-KHIKANI; AL-JANABI, 2019; RIEZK *et al.*, 2020). Estudos demonstram que essa incorporação de fármacos melhora significativamente a eficácia, a segurança e a sustentabilidade dos medicamentos, além de reduzir custos. A potência terapêutica muitas vezes também é ampliada e isso pode vir associado a uma redução da toxicidade (NAFARI *et al.*, 2020; RIEZK *et al.*, 2020; SANTANA *et al.*, 2023).

O primeiro tratamento oral para a leishmaniose surge em 2002 com a aprovação da miltefosina para tal uso, isso representou uma maior adesão ao tratamento, especialmente em áreas mais remotas (SUNDAR *et al.*, 2002). A miltefosina é uma alquilfosfocolina que atua tanto no tratamento de LV como de LC, ela exerce seu efeito através da interação com membranas lipídicas, alterando sua curvatura e consequentemente afetando processos dependentes dessa estrutura. Isso interfere diretamente na sinalização celular do parasito (DÍAZ; AMBROGGIO; FANANI, 2020). Seu uso tem sido relacionado a efeitos limitantes, como teratogenicidade e resistência emergente, o que restringiu seu uso em

pacientes (BULTÉ *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2024).

A imunoterapia se apresenta como uma abordagem promissora empregada nesse contexto. Essa metodologia se concentra na indução de uma resposta imune eficaz para controlar a doença de forma rápida e efetiva. Estudos de vacinas terapêuticas e adjuvantes que modulam a resposta Th1 estão em desenvolvimento e produziram resultados animadores em ensaios pré-clínicos. Contudo, até o momento, nenhuma vacina humana foi licenciada (IKEOGU *et al.*, 2020; AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, 2021).

A produção dessas vacinas depende de se ter estratégias eficazes, com uma compreensão detalhada dos mecanismos imunológicos e da patogênese da infecção. Estudos pré-clínicos demonstram que a imunoterapia, seja isolada ou em combinação com quimioterápicos (imunoquimioterapia), resulta em melhores desfechos terapêuticos. Isso ocorre porque a eliminação eficaz dos parasitos da *Leishmania* exige uma resposta imunológica coordenada, desde a invasão dos promastigotas na corrente sanguínea até a persistência dos amastigotas nos macrófagos. O equilíbrio entre a erradicação do parasito e o estabelecimento da doença é influenciado pela capacidade do patógeno de modular ou escapar das defesas do hospedeiro, envolvendo tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (MAZIRE; SAHA; ROY, 2022; YADAGIRI *et al.*, 2024).

No Brasil, os primeiros compostos utilizados no tratamento da leishmaniose foram os antimoniais (Glucantime e Pentostam), seguidos pelos derivados pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ), que permanecem até os dias atuais. Como fármacos de escolha na terapêutica, destaca-se o antimoniato-N-metil glucamina e a AB, efetivos para o tratamento de leishmaniose tegumentar e visceral, sendo o último mais utilizado nos casos de resistência. Os maiores problemas envolvidos no uso desses fármacos vêm sendo a elevada toxicidade, alto custo, tratamento longo e os efeitos adversos graves, a depender do composto, muitas vezes intensificados pela necessidade de administração prolongada e o nível de resistência clínica (TIWARI; BRASIL, 2021). A resposta ao tratamento

depende das espécies de *Leishmania* envolvidas, com *L. braziliensis* frequentemente exigindo terapias prolongadas devido aos mecanismos de resistência intrínsecos dessa espécie, como expressão de proteínas de efluxo MRP1 e PGPA (MACHADO *et al.*, 2021; SANTANA; MIRANDA; CARVALHO, 2025).

Um dos desafios da ciência é superar a resistência e reduzir a toxicidade por meio de novas estratégias, como fármacos alvo-dirigidos, imunomoduladores e terapias combinadas. De maneira geral, o histórico do tratamento da leishmaniose demonstra a tentativa de equilibrar eficácia, segurança e baixo custo, com perspectivas promissoras na área de nanotecnologia (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019; NAFARI *et al.*, 2020; ROATT *et al.*, 2020).

## 2.2 PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

A utilização de produtos naturais remonta às civilizações antigas, com evidências arqueológicas demonstrando seu uso desde o Paleolítico, revelando conhecimentos ancestrais sobre plantas medicinais (HARDY, 2019). Culturas como a chinesa, a indiana e a egípcia deixaram registros detalhados sobre o uso de diferentes produtos de origem animal, mineral e vegetal. No que diz respeito aos produtos naturais vegetais, algumas dessas plantas continuam em uso medicinal nos dias atuais (METWALY *et al.*, 2021; SHI; ZHANG; LI, 2021).

Durante o século XX, ocorreu um marco significativo na investigação científica de plantas medicinais com o estudo e a incorporação na medicina tradicional de diversas espécies. Avanços metodológicos nas ciências farmacêuticas permitiram a caracterização precisa dos princípios ativos vegetais e a elucidação de seus mecanismos de ação moleculares, validando cientificamente muitas aplicações terapêuticas previamente baseadas em conhecimento empírico (LAI *et al.*, 2020; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Os vegetais biossintetizam uma ampla gama de compostos químicos denominados fitoquímicos, que correspondem a metabólitos.

Cada espécie de planta apresenta um perfil metabólico único, sintetizando tipos e concentrações distintas de metabólitos, sendo esses divididos em primários e secundários. Esses compostos fitoquímicos não apenas regulam processos fisiológicos dos vegetais, mas também atuam protegendo contra agressões externas, a exemplos de fungos, insetos, bactérias e animais que se alimentam dessas plantas (DUARTE *et al.*, 2014).

Nesse contexto, o desenvolvimento de medicamentos a partir de fontes naturais representa grandes avanços para a ciência, especialmente no que diz respeito a ampla gama de substâncias que podem estar presentes (SAGGAR *et al.*, 2022). No entanto, a exploração exclusiva de fontes naturais enfrenta desafios significativos, como baixos rendimentos de extração, variações sazonais na concentração de compostos ativos e impactos ambientais decorrentes da coleta em larga escala. Essas limitações impulsionaram a busca por alternativas que fossem independentes dessas variáveis e que fornecessem segurança terapêutica a ser aplicada na produção de medicamentos (PHAM *et al.*, 2019; CHEN, 2024).

Como resposta a busca do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, surgiram os compostos sintéticos bioativos, que representam uma classe de moléculas inovadoras projetadas em laboratório através de métodos sintéticos, permitindo acesso a um espaço químico mais amplo. Essas substâncias possuem propriedades farmacológicas ou biológicas específicas, muitas vezes inspiradas ou derivadas de estruturas naturais (CAMPOS *et al.*, 2019). No final do século XIX, surgiram as primeiras sínteses de substâncias que posteriormente se tornaram medicamentos, como é o caso do ácido acetilsalicílico (aspirina), derivado do salicilato presente no salgueiro-branco (*Salix alba*). Já no século XX, o aprimoramento da química medicinal permitiu o desenvolvimento de análogos sintéticos com maior eficácia, como a metformina, que é utilizada para o tratamento do diabetes nos dias de hoje (HERNANDÉZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2023; KOVACEVIC; BECIRAGIC; CAUSEVIC, 2024).

A ponte entre produtos naturais e sintéticos é marcada por uma contínua colaboração entre ambas as áreas. Os compostos sintéticos podem ser derivados de modificações estruturais de moléculas naturais, projetadas para potencializar propriedades como biodisponibilidade, estabilidade ou redução de efeitos colaterais (WANG; DONG; SHENG, 2019; CHARLTON *et al.*, 2023). Na prática, isso já foi empregado em diversos medicamentos disponíveis no mercado, por exemplo, a artemisinina, um antimalárico natural extraído da *Artemisia annua*, que deu origem a derivados sintéticos como o artesunato, que possui uma maior solubilidade e uma ação mais rápida (LEE *et al.*, 2023).

Atualmente, o processo de síntese de substâncias bioativas pode ser guiado por técnicas computacionais, utilizando-se de química combinatória e modelagem molecular, que aceleram a descoberta de novos fármacos por tornar o processo mais rápido e preciso (MAJOLO *et al.*, 2019; KOSTOVA, 2024). Outro destaque é o uso de nanotecnologia para otimizar a entrega de sintéticos bioativos, como nanopartículas carregadas com a substância de interesse, a exemplo o paclitaxel sintético, que reduziu a toxicidade em tratamentos oncológicos (MAJOLO *et al.*, 2019; SHARIFI-RAD *et al.*, 2021). A encapsulação de compostos em nanopartículas fornece uma maior estabilidade, melhora da solubilidade e direcionamento a tecidos específicos, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo o tempo de tratamento em alguns casos (MILINCIC *et al.*, 2019).

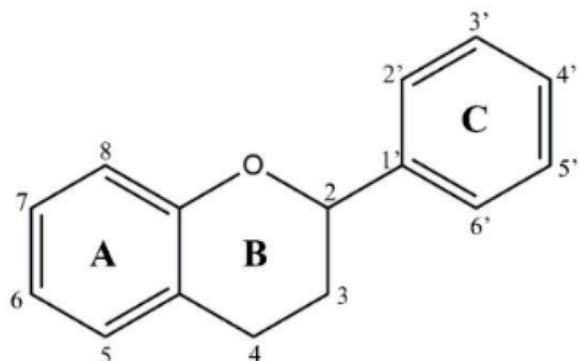
### **2.2.1 Flavonoides**

Dentro do grupo de produtos naturais destacam-se os flavonoides, que são um grupo de metabólitos secundários encontrados em vegetais e que vêm sendo estudados por desempenharem importantes ações farmacológicas e biológicas já descritas na literatura (ROY *et al.*, 2022). Esse grupo de compostos podem ser encontrados principalmente em partes comestíveis das plantas, como frutas, vegetais, caules, grãos e cascas, sua descoberta se deu no século XIX, quando o primeiro

composto desta classe foi isolado, a partir daí diversos estudos sobre sua estrutura e propriedades passaram a ser investigados (DEVEOGLU; KARADAG, 2019; ROY *et al.*, 2022).

Os flavonoides são caracterizados quimicamente pela presença de uma estrutura básica de 15 carbonos (C6-C3-C6), composta por dois anéis fenólicos (A e B) conectados por uma cadeia de três carbonos que pode formar um anel heterocíclico (C) (FIGURA 4) (KARAK, 2019). Alterações na estrutura básica, tais como, hidroxilações, metilações, acilações e glicosilações, podem dar origem a diversas subclasses, incluindo flavonas, flavonóis, flavanonas e isoflavonas (ALSEEKH *et al.*, 2020).

**Figura 4** – Estrutura química dos flavonoides



Fonte: LOURENÇO *et al.* (2023).

Nas últimas décadas, o avanço das técnicas analíticas fez com que mais de 8.000 estruturas flavonoides diferentes fossem identificados, se apresentando como uma das classes mais diversificadas de produtos naturais (ALSEEKH *et al.*, 2020). Essa diversidade estrutural é diretamente proporcional à variedade de atividades biológicas e farmacológicas que esses compostos possuem propriedade de produzir, o que vem chamando atenção da ciência impulsionando a pesquisa em diversas áreas, especialmente na descoberta de novos fármacos (KARAK, 2019; SAFE *et al.*, 2021).

No que diz respeito as atividades farmacológicas já descritas na literatura, destacam-se os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios,

cardioprotetor, antitumorais e antiparasitários (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; BAQUERO; LARROTA, 2019; KARAK, 2019; MAHMOD *et al.*, 2024). A atividade farmacológica dos flavonoides decorre, em grande parte, de sua ação antioxidante relacionada à sua propriedade de inibir oxidases, cuja resposta inibitória varia a depender da concentração. Eles também atuam aumentando a disponibilidade de antioxidantes endógenos e a ação de enzimas antioxidantes; contudo, a função biológica de maior importância parece ser a de manter os níveis de estresse oxidativo abaixo de um ponto crítico no corpo (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; BAQUERO; LARROTA, 2019).

A propriedade que os flavonoides possuem de neutralizar radicais livres se deve ao fato de que a estrutura dessas substâncias é quimicamente estabilizada, o que permite a desativação de radicais livres altamente reativas, convertendo-as em radicais aroxila menos reativos. Esse mecanismo antioxidant ocorre pela doação de elétrons ou átomos de hidrogênio provenientes de grupos hidroxila livres, inibindo a propagação de danos oxidativos em sistemas biológicos (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; BAQUERO; LARROTA, 2019).

Em parasitos, como a *Leishmania*, pesquisas têm demonstrado que derivados sintéticos de flavonoides promoveram uma resposta sobre o estresse oxidativo, além de agir induzindo uma imunomodulação dos macrófagos em relação a produção de óxido nítrico por células infectadas (LOURENÇO *et al.*, 2023). A quercetina, flavonoide isolado de diferentes vegetais como *Allium cepa*, tem sido bastante estudado quanto a sua atividade antileishmania, em que vem demonstrando que sua ação pode estar relacionada a indução da geração de ROS e consequente interrupção da funcionalidade das mitocôndrias do parasito, levando a sua morte. Outros múltiplos mecanismos de ação também vêm sendo estudados (FONSECA-SILVA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2023).

Um estudo envolvendo 17 análogos sintéticos de flavonoides, demonstrou que todos os compostos inibem enzimas que são expressas no estágio de amastigotas da *L. tropica* e, alguns deles, foram eficazes contra ambas as formas do parasito. Também foi avaliada a toxicidade

desses compostos frente a células de mamíferos, em que demonstrou que além de ser altamente potentes contra o parasito também apresentavam baixa citotoxicidade contra as células de mamíferos (LOURENÇO *et al.*, 2023). Outro grupo de pesquisa buscou avaliar a atividade antileishmania de uma fração de diclorometano (DCMF) rica em flavonoides extraída de raízes de *Arrabidaea brachypoda* sobre três diferentes espécies de *Leishmania*, sendo elas: *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*. Os resultados mostraram que ocorreu a inibição da viabilidade das promastigotas de todas as espécies (NEVES *et al.*, 2024).

Esses resultados somados a todas as pesquisas disponíveis na literatura sobre o assunto são animadores, pois representam o potencial dessa classe de substâncias em atuarem contra a leishmaniose, se destacando como possíveis alternativas terapêuticas em estudo. As perspectivas futuras podem envolver abordagens integrativas envolvendo a combinação da química medicinal, biologia estrutural e nanotecnologia, como também o uso de modelagem molecular e triagem virtual que podem acelerar a identificação de novos candidatos, enquanto sistemas de liberação controlada podem melhorar sua biodisponibilidade.

### **2.2.2 Chalconas**

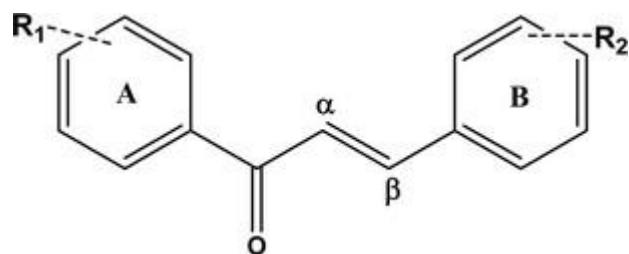
Dentro do grupo dos flavonoides destacam-se as chalconas, esse grupo se apresenta como uma importante classe de precursores biossintéticos dos flavonoides, compartilhando a mesma rota metabólica fenilpropanóide nas plantas (RUDRAPAL *et al.*, 2021). Por meio da ação da enzima chalcona isomerase, essas moléculas são convertidas em flavanonas durante a biossíntese de flavonoides, explicando a relação estrutural e biossintética entre elas (YIN *et al.*, 2019). Além de tais similaridades, esses compostos também compartilham o potencial de algumas atividades farmacológicas em comum, embora as chalconas apresentem características químicas distintas que as tornam particularmente interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos (SALEHI *et al.*, 2021).

Como produtos naturais, as chalconas possuem ampla distribuição

no reino vegetal, sendo identificadas em diversas famílias de plantas como Asteraceae, Fabaceae e Moraceae (SOUZA *et al.*, 2022). Esses compostos se destacam pelo seu papel ecológico como pigmentos florais, fitoalexinas e moléculas de defesa contra patógenos. Além disso, muitas propriedades terapêuticas de plantas vêm sendo atribuídas a presença das chalconas, o que vem estimulando investigações sobre possíveis atividades farmacológicas no meio científico (PATIL; MURUMKAR, 2023).

No que diz respeito a sua estrutura, as chalconas são caracterizadas quimicamente por um sistema difenilpropanóide (C6-C3-C6) com um núcleo  $\alpha,\beta$ -insaturado que conecta os dois anéis aromáticos (FIGURA 5) (SAMOTA *et al.*, 2024). Assim como nos flavonoides, esta estrutura básica pode passar por várias modificações, incluindo hidroxilações, metilações, acilações e glicosilações, originando subclasses como di-hidro-chalconas, retrochalconas e chalconas heterocíclicas. O uso de técnicas analíticas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e a ressonância magnética nuclear (RMN) têm sido fundamentais para a identificação e caracterização desses compostos em matrizes complexas (LIU *et al.*, 2022).

**Figura 5** – Estrutura geral das chalconas



Fonte: SAMOTA *et al.* (2024).

Devido à dificuldade em serem isoladas nos vegetais, especialmente devido à baixa quantidade em que estão presentes, a síntese de análogos de chalconas tem se mostrado uma alternativa para lidar com essa problemática (MASTACHI-LOZA *et al.*, 2022). Modificações estruturais como a inserção de grupos halogênios, nitro ou

heterociclos vêm demonstrando melhorar significativamente a atividade biológica e o perfil farmacocinético desses compostos, o que é particularmente vantajoso quando se busca por novas substâncias com maior especificidade e segurança para a terapêutica (YIN *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2021).

Estudos recentes atribuem diversas atividades farmacológicas às chalconas, tais como: anti-inflamatória, antimicrobiana, antimalária, antioxidante e antileishmania (SAMOTA *et al.*, 2024). No contexto da leishmaniose, tanto chalconas naturais como sintéticas têm sido alvos de pesquisas, em que vêm demonstrando serem eficazes contra diferentes espécies de *Leishmania*. Essas pesquisas muitas vezes são auxiliadas por meio de métodos de química computacional *in silico* que ajudam a direcionar os alvos e a correta associação da substância com a espécie de interesse (LEITE *et al.*, 2024; MONTEIRO *et al.*, 2025).

Com a associação de estudos *in vitro* e *in silico*, resultados promissores vêm sendo descobertos sobre esse tema (MONTEIRO *et al.*, 2025). Em um estudo, cinco chalconas sintéticas foram avaliadas contra *L. donovani*, e várias tecnologias integradas baseadas em computação foram utilizadas para avaliar a absorção, distribuição, metabolismo, excreção, perfil de toxicidade, afinidade de ligação da chalcona com o alvo e dinâmica molecular. Isso possibilitou confirmar o potencial inibitório quando associado a testes *in vitro*, e as avaliações farmacocinéticas e toxicológicas revelaram uma boa biodisponibilidade oral e toxicidade baixa. Além disso, uma das chalconas demonstrou interagir com alta afinidade com a tripanotionina redutase (TR), uma enzima essencial para a manutenção da vida do parasito *Leishmania*. A atividade antileishmania das chalconas contra *L. donovani* demonstrou ser promissora em comparação com a AB, fármaco de escolha para o tratamento da doença, colocando-as como possíveis novas terapias (OSMAN *et al.*, 2022).

Estudo envolvendo o emprego de chalconas sintéticas contra outras espécies de *Leishmania* também são frequentemente relatados na literatura. Eles vêm promovendo a inibição das espécies *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* de forma eficaz, com baixa

toxicidade para a célula de mamíferos, o que por sua vez é importante, visto que para que se tornem uma nova alternativa terapêutica é necessário que apresentem baixa toxicidade, se diferenciando dos fármacos disponíveis no mercado (GARCIA *et al.*, 2021; ZHEOAT *et al.*, 2021; SANTIAGO-SILVA *et al.*, 2022; SOUSA-BATISTA *et al.*, 2023).

Ainda há poucos estudos envolvendo atividade antileishmania de chalconas contra a espécie *L. braziliensis*, isso mostra a necessidade de mais pesquisas com essa espécie que é o agente etiológico mais amplamente distribuído no país, sendo o principal responsável pelos casos de LC na região nordeste (WHO, 2025). Dessa forma, o presente estudo investiga a atividade antileishmania sobre essa espécie, objetivando contribuir com a pesquisa sobre parasitos endêmicos em nosso país.

### 2.3 QUÍMICA COMPUTACIONAL

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos exige cada dia mais que se rompam com os paradigmas tradicionais da pesquisa, abrindo ares para novas tecnologias que consigam trazer benefícios a essa área (HUSNAIN *et al.*, 2023). Nesse sentido, a química computacional tem se tornado um pilar fundamental para esse processo, revolucionando os métodos anteriormente utilizados. A redução no tempo e nos custos de desenvolvimento dos medicamentos são apenas dois dos diversos pontos vantajosos na associação da química computacional com a pesquisa de novas drogas (LIN; LI; LIN, 2023).

As técnicas que vêm sendo mais empregadas são o *docking* molecular, que possibilita prever interações entre proteína-ligante com alta resolução, e métodos de dinâmica molecular os quais disponibilizam informações temporais cruciais sobre a estabilidade desses complexos. Através da predição computacional é possível se ter uma orientação na descoberta de fármacos, desde a identificação inicial de quais possíveis atividades farmacológicas uma determinada substância pode desempenhar, até a probabilidade de ativação e de inibição de forma

quantitativa (EZZAT *et al.*, 2019; SIVAKUMAR *et al.*, 2020).

A triagem virtual (*in silico*) vem ganhando espaço considerável por ampliar as opções, em que podem ser geradas bibliotecas contendo inúmeros compostos e a eles associadas diferentes oportunidades de interação e possíveis alvos. O design negativo é um grupo de métodos de triagem virtual que tem por finalidade eliminar compostos com propriedades indesejadas que estão presentes durante os estágios iniciais do desenvolvimento de medicamentos. Três principais tipos de propriedades farmacológicas podem ser previstos: similaridade com medicamentos, *hitters* frequentes, que se referem a moléculas identificadas em triagens iniciais, e toxicidade. Essa abordagem inovadora tem grande importância para doenças negligenciadas como a leishmaniose, em que os recursos para pesquisa são escassos e a variedade de espécies é ampla (EZZAT *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020). A associação entre a química computacional, a bioinformática e a prática laboratorial têm se mostrado eficiente, sendo cada vez mais empregada na pesquisa de novos fármacos antileishmania.

Ainda no contexto da leishmaniose, estudos computacionais têm sido empregados para desvendar o potencial antileishmania de chalconas e seus derivados. Pesquisa recente aplicou técnicas de *docking* molecular para avaliar a afinidade das enzimas esterol 14-alfa desmetilase (CYP-51) e tripanotiona redutase de *L. infantum* com chalconas sintetizadas pelo grupo, demonstrando grande afinidade com esses compostos, o método auxiliou na redução do tempo e do custo, além de ter norteado os novos passos da pesquisa (LEITE *et al.*, 2024).

A ligação multialvo de um grupo de chalconas com oligopeptidase B (OPB) e cisteína proteinase B (CPB), que são determinantes patogênicos críticos de *L. (V.) braziliensis*, foi investigada através de um método *in silico*. Para isso, aplicou-se uma abordagem de triagem virtual usando *docking* molecular em que foi possível demonstrar altas afinidades de ligação entre os compostos e as proteinases alvo. Tais resultados mostraram que o *docking* molecular favorece uma pré-identificação de inibidores promissores de determinados alvos, reduzindo

o tempo e direcionando os estudos (MONTEIRO *et al.*, 2025).

A contribuição da química computacional no avanço do tratamento da leishmaniose tem sido de suma importância, especialmente considerando a urgência por novas alternativas terapêuticas que superem as desvantagens dos medicamentos disponíveis no mercado. É importante ressaltar que a integração de técnicas *in silico* e *in vitro*, multidisciplinares, podem aumentar o poder de previsibilidade e fornecer dados com maior resolução (DAOUD *et al.*, 2021).

## 2.4 NANOTECNOLOGIA

O conceito de nanotecnologia surgiu pela primeira vez no ano de 1959 pelo americano Richard Feynman mas a definição e popularização se deu na década de 1980, em que foi conhecida como um ramo da ciência e tecnologia que trabalha nos níveis atômico, molecular e macromolecular (PRASAD *et al.*, 2021). O marco farmacêutico aconteceu em 1995 quando ocorreu a aprovação do primeiro nanofármaco pelo FDA dos EUA, Doxyl®, uma formulação de lipossomas que transporta o agente antitumoral doxorrubicina. A partir de então, a nanotecnologia tem revolucionado a ciência, trazendo avanços em diversas áreas da medicina (SAMPAOLESI; NICOTRA; RUSSO, 2019).

As nanopartículas vêm sendo exploradas para diagnóstico e administração de medicamentos, especialmente devido a seu comportamento cinético peculiar no corpo e a propriedade de carregarem medicamentos (SAMPAOLESI; NICOTRA; RUSSO, 2019). Os pré-requisitos principais são a produção de nanopartículas a partir de materiais que se reúnem em entidades nanométricas (aproximadamente 50–200 nm), para transportar fármacos e liberá-los no sítio alvo, e interações moleculares, principalmente do tipo hidrofóbicas (GREGORIADIS, 1976).

No cenário atual da produção farmacêutica, a nanotecnologia vem apresentando diversas possibilidades através de plataformas que incluem: nanopartículas poliméricas, nanocápsulas, lipossomas e

micelas (GULIY *et al.*, 2022). A escolha depende do alvo a que se deseja ter e de condições farmacocinéticas e farmacodinâmicas que podem influenciar (HU; HAMMARLUND-UDENAES; FRIDÉN, 2019). Estudos demonstram que sistemas nanoencapsulados podem melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos, além de proporcionar um prolongamento da meia-vida, proteção contra condições desfavoráveis durante o processamento, aumento da bioatividade e direcionamento seletivo dos fármacos para tecidos-alvo através de ligantes específicos (ASSADPOUR; JAFARI, 2019; REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019).

Historicamente, a anfotericina B lipossomal (LAmB) revolucionou o tratamento de leishmaniose visceral e micoses sistêmicas, consistindo de pequenas vesículas unilamelares de 60-80 nm de tamanho combinadas com AB. A AB tradicional possui largas desvantagens, sendo a principal delas, a sua toxicidade renal considerável. Tal fato foi reduzido significativamente a partir da LAmB, somado a sua eficácia terapêutica que foi mantida e, em algumas vezes, potencializada (GROLL *et al.*, 2019).

No contexto específico da leishmaniose, a nanotecnologia permite ultrapassar desafios enfrentados na terapêutica, como a toxicidade sistêmica e a baixa penetração tecidual dos fármacos convencionais (SANTANA<sub>a</sub> *et al.*, 2023). Um estudo de revisão sobre nanopartículas para o tratamento da leishmaniose visceral selecionou 26 artigos envolvendo nanopartículas poliméricas, lipídicas, metálicas e inorgânicas que foram empregadas associadas a fármacos, sendo a AB o fármaco mais utilizado, os estudos mostraram que o uso de nanopartículas para administração de fármacos reduziu a carga parasitária e a toxicidade. Constatando que as nanopartículas podem aumentar a eficácia e a segurança do tratamento, sugerindo uma opção promissora para o tratamento da leishmaniose visceral (SANTANA<sub>b</sub> *et al.*, 2023).

De maneira similar, nanopartículas de quitosana incorporadas com AB demonstraram possuir atividade *in vitro* contra amastigotas de *L. major*, com atividade semelhante à AB não encapsulada, mas com uma

toxicidade significativamente menor para células KB e hemácias (RIEZK *et al.*, 2020). Chalconas sintéticas aprisionadas em micropartículas demonstraram reduzir a carga parasitária de *L. amazonensis* *in vitro*, sugerindo que essa associação pode ser uma alternativa promissora para o tratamento da leishmaniose (SOUSA-BATISTA *et al.*, 2020).

A superação de desafios impostos ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose, mais potentes, eficientes e menos tóxicos, acontece dia após dia com a descoberta de novas moléculas e com o aprimoramento de novas tecnologias, rompendo paradigmas e buscando trazer mais segurança e qualidade de vida aos pacientes.

# **Objetivos**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar através de testes *in silico* e *in vitro* o potencial leishmanicida de quatro chalconas sintéticas inéditas frente a cepas de *L. braziliensis*, a influência de FERA1 na produção de ROS, interações intermoleculares com possíveis alvos enzimáticos e uma provável potencialização dos efeitos com a forma nanoencapsulada de FERA1.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar previsões computacionais para investigar as potenciais atividades farmacológicas das chalconas, utilizando métodos de análise *in silico*;
- Determinar a citotoxicidade dos compostos em macrófagos murinos;
- Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* das chalconas frente a promastigotas de *L. braziliensis*, determinando suas potências inibitórias;
- Calcular o Índice de Seletividade dos compostos, correlacionando a atividade antileishmania com a toxicidade em células de mamíferos;
- Avaliar o efeito antileishmania da FERA1 contra formas amastigotas de *L. braziliensis* em macrófagos murinos infectados;
- Investigar a influência da FERA1 nos níveis de ROS em macrófagos infectados, visando elucidar possíveis mecanismos imunomodulatórios;
- Desenvolver uma formulação nanoestruturada para o carreamento da FERA1, comparando sua eficácia com a ação da forma livre frente a promastigotas de *L. braziliensis*.

## **Material e métodos**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 TIPO DE ESTUDO

Este trabalho caracteriza-se como um estudo pré-clínico, quantitativo e de caráter experimental.

### 4.2 LOCAL DE ESTUDO

A triagem virtual, o *docking* molecular e os estudos de dinâmica molecular se deram no ambiente computacional sob direcionamento do Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti no Laboratório de Quimioinformática da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa-PB). Os testes *in vitro* se deram no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia da Fundação Oswaldo Cruz (Salvador-BA), sob o direcionamento da Profa. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães. A produção e optimização das nanopartículas se deu no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa-PB), sob direcionamento do Prof. Dr. Francisco Humberto Xaviér-Júnior.

### 4.3 PRODUTOS-TESTE

#### 4.3.1 Síntese das chalconas

A síntese das chalconas foi realizada pelo Ms. Fernando Ferreira Leite, doutorando do Laboratório de Química Orgânica do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - UFPB, sob a orientação do Prof. Dr. Luis Cesar Rodrigues.

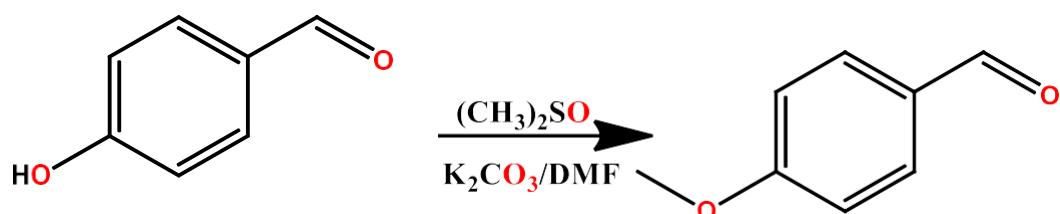
#### 4.3.1.1 Derivados do 4-hidroxi benzaldeído

##### • Metilação

Foram pesados 500 mg de 4-hidroxibenzaldeído (1 eq./4,09 mmol) e 1,13 g de carbonato de potássio ( $K_2CO_3$  - 2 eq./8,18 mmol), e adicionados a um erlemeyer de 50 mL, tendo como solvente o dimetilformamida (DMF) (FIGURA 6). Em seguida, foi adicionado 319 mg de sulfato de dimetila

$((\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$  - 1 eq, 4,09 mmol), a reação foi mantida sob agitação magnética por 24 h sendo monitorada por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA). Após às 24 h a reação foi parada e processada por partição em acetato de etila ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) e água, em que a fase orgânica extraída foi tratada com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e em seguida concentrada sob pressão reduzida, obtendo um rendimento aproximado de 93,29%.

**Figura 6** - Metilação na hidroxila livre do 4-hidroxibenzaldeído

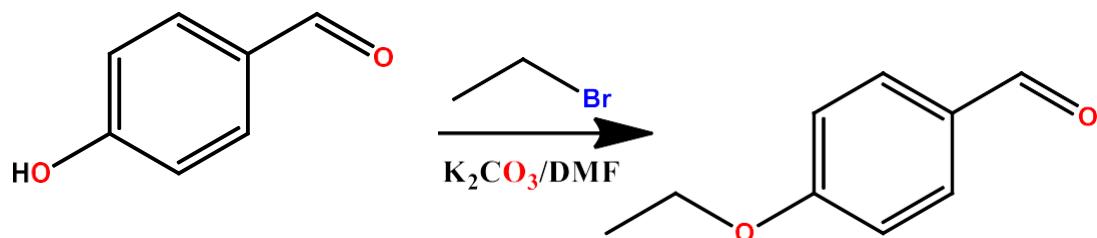


Fonte: Autor (2021).

### • Etilação

O 4-hidroxibenzaldeído (1eq./4,09 mmol) foi etilado utilizando brometo de etila ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{Br}$  - 1 eq./2,17 mmol) e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2 eq./4,34 mmol) como catalizador, usando DMF como solvente, sob agitação magnética por 24 h (FIGURA 7). A reação foi monitorada por CCDA e após as 24 h foi processada por partição em acetato de etila e água, em que a fase orgânica extraída foi tratada com sulfato de sódio anidro e em seguida concentrada sob pressão reduzida. Foi obtido um pó branco com rendimento aproximado de 92,15%.

**Figura 7** - Etilação na hidroxila livre do 4-hidroxibenzaldeído

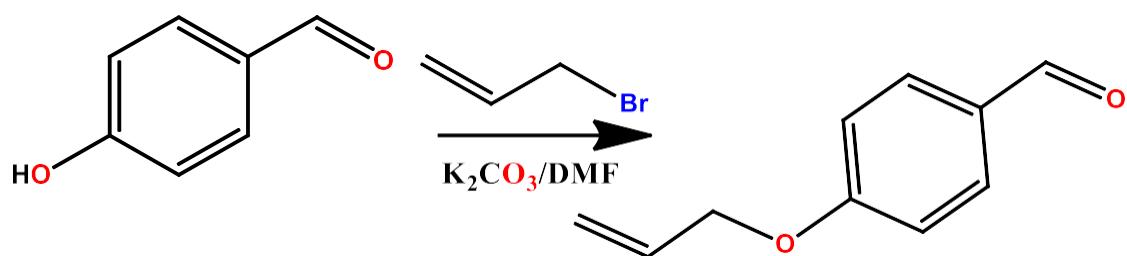


Fonte: Autor (2021).

### • Alilação

O 4-hidroxibenjaldeído (1 eq./4,09 mmol) foi alilado utilizando brometo de alila ( $C_3H_5Br$  - 1 eq, 2,17 mmol) e  $K_2CO_3$  (2 eq./4,34 mmol) como catalizador, tendo como solvente o DMF, a reação foi mantida sob agitação magnética por 24 h (FIGURA 8), sendo monitorada por CCDA. Após o período de 24 h, a reação foi processada por partição em acetato de etila e água, em que a fase orgânica extraída foi tratada com sulfato de sódio anidro e em seguida concentrada sob pressão reduzida. Foi obtido um pó branco com rendimento aproximado de 90,67%.

**Figura 8** - Alilação na hidroxila livre do 4-hidroxibenjaldeído

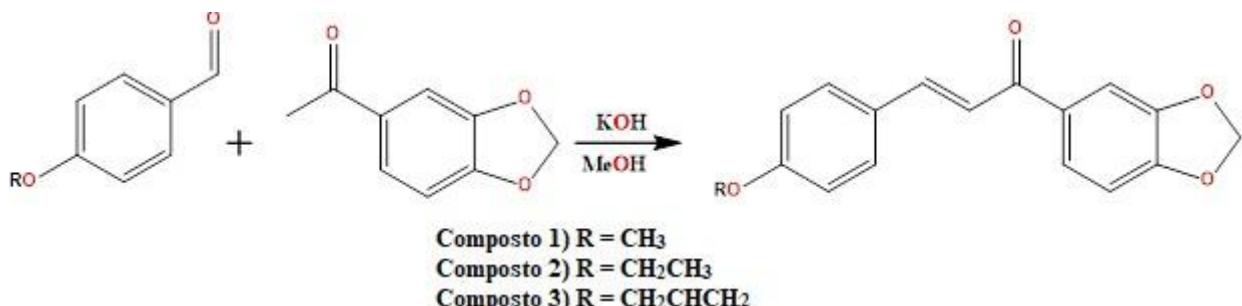


Fonte: Autor (2021).

### • Condensação de Claisen-Schimidt

A 3,4-(metilenodioxi)acetofenona (1 eq./1,85 mmol) foi submetida a uma condensação de Claisen-Schimidt com os derivados obtidos a partir do 4-hidroxi benzaldeído (1 eq./2,37 mmol), utilizando hidróxido de potássio ( $KOH$  - 2 eq./3,70 mmol) como catalizador e álcool metílico como solvente (FIGURA 9), o sistema foi deixado sob agitação por 8 h obtendo-se um precipitado. O precipitado foi filtrado e lavado com água e metanol, posteriormente foi secado a temperatura ambiente, obtendo-se um pó amorfó de cor amarelada, com rendimentos variando entre 85% e 92%.

**Figura 9** - Condensação aldólica dos derivados obtidos do 4-hidroxibenzoaldeído com o 3,4-(metilenodioxi)acetofenona



Fonte: Autor (2021).

**Composto 1** = (E)-3-(4-(aliloxi)fenil)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)prop-2-en-1-ona

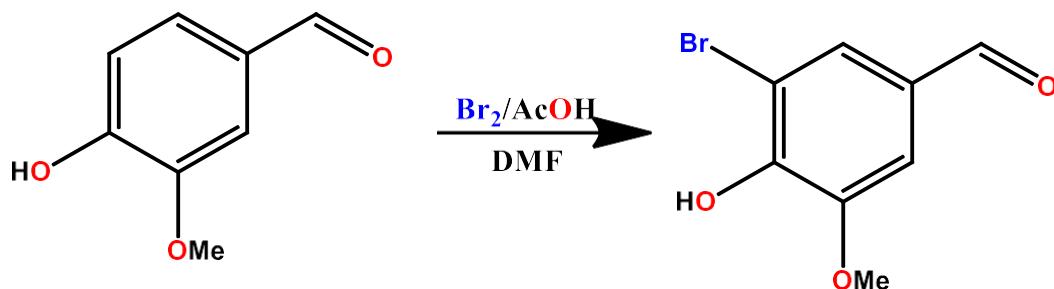
**Composto 2** = (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(4-etoxfenil)prop-2-en-1-ona

**Composto 3** = (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona

#### 4.3.1.2 Síntese da bromo-chalcona

- **Preparo da Bromo-Vanilina**

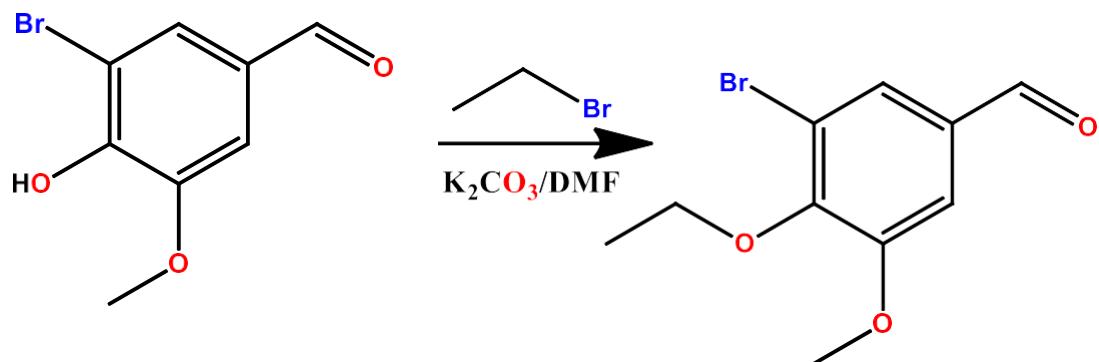
Inicialmente foi realizada uma bromação na vanilina (FIGURA 10), para isso foram pesados 2 g de vanilina (1 mmol) e adicionado a um balão de fundo redondo de volume de 150 ml. Em seguida foi acrescido DMF em quantidade suficiente para a completa dissolução da vanilina. O próximo passo foi a adição de 100 mL de uma solução com ácido acético e bromo (Br<sub>2</sub>/AcOH - 0,32 molar), o sistema reacional foi deixado sob agitação magnética em temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C) por 14 h. Após às 14 h, foi suspensa a agitação, havendo uma decantação do sólido branco, o sistema foi filtrado e o sólido obtido foi lavado com água destilada, seco em dessecador sob pressão reduzida, obtendo 900 mg do precipitado com um rendimento de 45%. Esse processo foi monitorado por CCDA.

**Figura 10 - Reação de bromação da vanilina**

Fonte: Autor (2021).

- **Etilação da Bromo-Vanilina**

A Bromo-Vanilina foi etilada utilizando o mesmo método descrito anteriormente, sendo utilizados bromo-vanilina (1 eq./2,17 mmol), brometo de etila (1 eq./2,17 mmol) e  $K_2CO_3$  (2 eq./4,34 mmol) como catalisador, como solvente utilizou-se o DMF. A reação foi mantida sob agitação magnética por 24 h (FIGURA 11), sendo monitorada por CCDA. Passado 24 h a reação foi processada por partição em acetato de etila e água, em que a fase orgânica extraída foi tratada com sulfato de sódio anidro e em seguida concentrada sob pressão reduzida. Foi obtido um pó branco com rendimento aproximado de 89,40 % para bromo etil vanilina.

**Figura 11 - Etilação na hidroxila livre da bromo-vanilina**

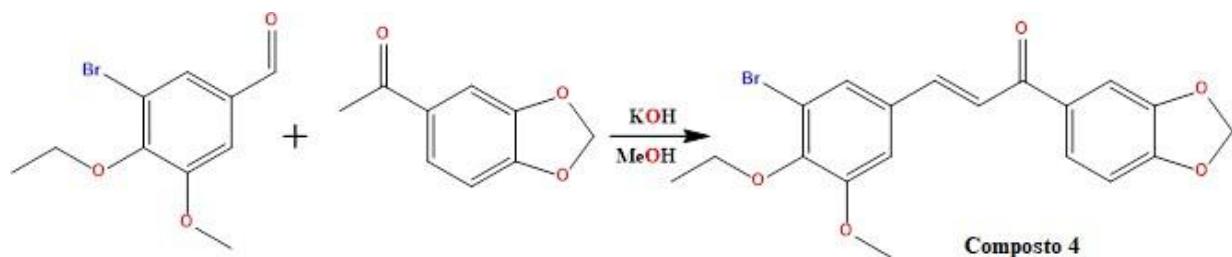
Fonte: Autor (2021).

- **Síntese das Bromo-Chalconas**

Uma vez obtida a Bromo Etol Vanilina, esta (1 eq./1,85 mmol) foi

submetida a uma condensação aldólica com a 3,4-(metilenodioxi)acetofenona (1 eq./1,85 mmol), usando KOH (2 eq./3,70 mmol) como catalisador e álcool metílico como solvente (FIGURA 12). O sistema foi deixado sob agitação por 8 h obtendo-se um precipitado amarelado que foi filtrado e lavado com água e metanol, em seguida foi seco a temperatura ambiente, obtendo-se um pó amorfo de cor amarelada, com rendimento aproximado de 90%.

**Figura 12** - Condensação aldólica entre a bromo etil vanilina e a 3,4-(metilenodioxi) acetofenona



Fonte: Autor (2021).

**Composto 4 = (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-ethoxy-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona**

#### 4.4 ESTUDO *in silico* DE PREDIÇÃO DE ESPECTROS DE ATIVIDADE PARA SUBSTÂNCIAS (PASS filter e MolPredictX)

Para prever a atividade biológica das estruturas, os quatro compostos foram submetidos à avaliação da atividade biológica usando dois programas online, PASS filter e MolPredictX.

O programa PASS filter fornece relações quantitativas de reatividade de estruturas por meio da decomposição de estruturas químicas em descritores 2D e/ou 3D, com consequente produção de modelos obtidos de ligantes bioativos. Por meio da análise, é possível prever o espectro estimado de atividade de um composto como provável atividade (Pa) e provável inatividade (Pi). Os valores de Pa e Pi variam de 0,000 a 1,000, e um composto pode ser considerado experimentalmente ativo quando Pa > Pi. Quando Pa > 0,7, a probabilidade de atividade farmacológica experimental é

considerada alta, valores de  $0,5 < Pa < 0,7$  indicam uma probabilidade média de atividade farmacológica experimental, e se  $Pa < 0,5$ , a chance de ter atividade farmacológica experimental é menor, mas ainda pode apresentar uma chance de encontrar um novo composto (GOEL *et al.*, 2010; PASS, 2011).

MolPredictX é uma interface web inovadora e de livre acesso para prever a atividade biológica de moléculas. Utilizando modelos internos de relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR), MolPredictX fornece previsões qualitativas (ativas ou inativas) e probabilidades quantitativas para bioatividade, incluindo contra organismos parasitários como *Trypanosoma* e *Leishmania*. Especificamente, a atividade contra *L. braziliensis* pode ser avaliada usando um modelo de aprendizado de máquina desenvolvido por Maia *et al.* (2020) De acordo com este modelo, uma estrutura é classificada como ativa quando seu relacionamento entre energias livres de ligação e valor de atividades biológicas ( $p\text{Cl}_{50}$ ) excede 4,5. MolPredictX também oferece valores de probabilidade quantitativa para atividade com base no algoritmo aleatório utilizado na construção do modelo (MAIA *et al.*, 2020; SCOTTI *et al.*, 2022).

#### **4.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS**

Células da linhagem J774 foram obtidas após descongelamento e cultivadas meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO,Brasil), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SIGMA) e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina (Life). As células foram mantidas em cultura a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingirem 80 a 90% de confluência, as células foram retiradas das garrafas de cultura, centrifugadas, ressuspensas em meio DMEM completo e contadas para posterior utilização nos ensaios.

#### **4.6 CULTIVO DE PARASITOS**

As formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) foram cultivadas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) ou Schneider (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS,

GIBCO, ThermoFisher scientific, Waltham, MA EUA), 50 µg/mL de gentamicina (Life, Carlsbad, CA), em pH 7,2 e incubados a 26 °C. Os parasitos foram contados diariamente em câmara de Neubauer, durante cinco dias. Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, novas passagens *in vitro* dos parasitos foram realizadas.

#### **4.7 TESTE DE CITOTOXICIDADE SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS *in vitro***

Para a avaliação da citotoxicidade dos compostos foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774, incubados em placas de 96 poços com fundo U ( $1 \times 10^4$  células/poço) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SIGMA) e 50 µg/mL de gentamicina (Life) e mantidos por 24 h em estufa a 37 °C, aerado com 5% de CO<sub>2</sub>. Os compostos foram testados nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µM, em triplicatas, incubados por 72 h. Posteriormente, foram adicionados 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 6 h. A leitura no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA) foi realizada a 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos através dos valores da concentração citotóxica de 50% para as células (CC<sub>50</sub>). Como controle positivo foi utilizada a violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil) (MEIRA *et al.*, 2017).

#### **4.8 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA**

##### *Promastigotas*

Promastigotas de *L. braziliensis* ( $1 \times 10^6$  por poço) foram cultivadas em placa de 96 poços com fundo U em meio Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; GIBCO) e 50 µg/ mL de gentamicina (Life) e submetidas ao tratamento com diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µM) dos quatro compostos isoladamente. Os parasitos foram incubados por 72h a 26 °C. Em seguida, 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen) foi adicionado durante 2 ou 24 h. A leitura foi

realizada no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O percentual de inibição da cultura axênica foi determinado baseado no controle não tratado (GUEDES *et al.*, 2018).

#### *Amastigotas*

Macrófagos murinos J774 ( $2 \times 10^5$  células/mL) foram cultivados em placas de 96 poços com fundo U (100  $\mu$ L/poço) e incubados overnight (12-16 h) a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento foram adicionados à cultura (100  $\mu$ L/poço) na proporção parasito/macrófago de 10:1 e incubados por 24 h. As placas foram lavadas para remover os parasitos não fagocitados. Em seguida, a FERA1 foi adicionada e incubada por 72 h. AB foi utilizada como fármaco de referência. Macrófagos murinos infectados foram lisados pela adição de 0,01% de dodecil sulfato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em PBS (solução salina tamponada com fosfato) a 37 °C por 30 min. Amastigotas de macrófagos murinos lisados foram incubadas a 24 °C por 48 h, diferenciando-se em promastigotas. O número de promastigotas viáveis foi determinado pela adição de Alamar Blue (20  $\mu$ L/poço) e incubadas por 24 h. A absorbância foi avaliada a 570 e 600 nm de acordo com as instruções do fabricante. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados no Prism versão 5.03 (GraphPad Software) usando regressão não linear.

#### **4.9 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE**

O índice de seletividade foi calculado pela razão entre valor de CC<sub>50</sub> obtido em macrófagos e o valor de CI<sub>50</sub> obtido em promastigotas tratados com as moléculas em estudo. O índice de seletividade é utilizado para determinar o quanto a molécula testada é mais ativa contra o parasito *Leishmania* do que tóxica para o macrófago, indicando maior seletividade para o parasito e, ao mesmo tempo, sem causar danos para a viabilidade das células de mamíferos. O índice de seletividade deve ser superior a um (>1) (PASSOS *et al.*, 2015).

#### **4.10 INFECÇÃO *in vitro* DE MACRÓFAGOS MURINOS E**

## TRATAMENTO COM FERAI

Macrófagos murinos J774 foram cultivados em placas de 24 poços com fundo U a uma concentração de  $5 \times 10^5$  com lamínulas adicionadas aos poços previamente e infectados com *L. braziliensis* em fase estacionária a uma proporção de 10 parasitos por macrófago. Após lavagem com meio DMEM, diferentes concentrações de FERAI (20, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{M}$ ) foram adicionadas aos poços. A AB (5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Após 24 h, as células foram fixadas em metanol e coradas usando Giemsa (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda, SP, Brasil). A porcentagem de macrófagos murinos infectados e o número de amastigotas por macrófago foi determinado pela contagem de 100 células por poço.

## 4.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

ROS são as principais moléculas usadas pelos macrófagos para controlar e eliminar os parasitos do gênero *Leishmania* (SCOTT; NOVAIS, 2016). Dessa forma resolveu-se investigar a influência da FERAI sobre essas moléculas. Para isso, promastigotas de *L. braziliensis* ( $2 \times 10^6$  por poço) foram cultivadas em uma placa de 24 poços com fundo U em meio de Schneider, suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de gentamicina e, em seguida, tratadas com FERAI (5; 10; 20 e 30  $\mu\text{M}$ ). Os parasitos foram incubados por 4h a 26 °C. Posteriormente, 6  $\mu\text{L}$  de diacetato de 2',7'-dclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) (10 mM) (Invitrogen, Eugene, EUA) foram adicionados a cada poço, sendo então mantidos por 30 min na ausência de luz. A aquisição de dados foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e analisada no FlowJo\_v10.6.1 (FLOWJO, 2017).

## 4.12 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS

Três proteínas fundamentais para a manutenção da vida das espécies de *Leishmania* foram utilizadas no estudo, são elas: Di-hidro-orotato Desidrogenase, Tripanotiona Redutase e UDP-Glicose Pirofosforilase. Essas

proteínas não contêm estruturas 3D no Protein Data Bank (PDB - <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (BERNSTEINS *et al.*, 1997), devido a isso, as sequências correspondentes foram obtidas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em seguida, foi realizado um alinhamento global com a sequência de uma proteína com estrutura tridimensional conhecida, usando a ferramenta da web Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), que alinha todas as sequências proteicas inseridas por um usuário. O alinhamento facilitou a investigação do sítio ativo e a determinação da similaridade e a identidade compartilhada entre as proteínas.

#### **4.13 MODELAGEM POR HOMOLOGIA**

As sequências alvo foram obtidas como sequências de aminoácidos no formato FASTA e foram importadas no site SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (WATERHOUSE *et al.*, 2018). Para cada molde identificado, a qualidade foi prevista a partir de recursos de alinhamento, como ProMod3, QMEAN e GMQE. A qualidade estereoquímica dos modelos foram avaliadas pelo servidor da Web PSVS (suíte de *software* de validação de estrutura de proteínas) ([http://psvs-1\\_5-dev.nesg.org/](http://psvs-1_5-dev.nesg.org/)), usando PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993). PROCHECK gera um gráfico Ramachandran (LOVELL *et al.*, 2003), que determina as regiões permitidas e não permitidas da cadeia principal de aminoácidos.

#### **4.14 DOCKING MOLECULAR**

O *docking* molecular foi utilizado para investigar *in silico* outros possíveis mecanismos de ação da FERAI que contribua para o efeito leishmanicida através da afinidade de ligação do composto as enzimas selecionadas no estudo. Para isso foi realizado um rastreio com diversas proteínas envolvidas para esses efeitos. A estruturas 3D das enzimas que serviram de moldes para os modelos elaborados foram obtidas do PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (BERNSTEINS *et al.*, 1997). As proteínas selecionadas e informações detalhadas sobre elas podem ser

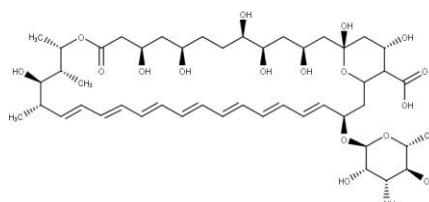
visualizados no QUADRO 1.

*Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0*

Foi utilizado o *software* Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) com os parâmetros predefinidos no mesmo. O ligante complexado foi usado para definir o sítio ativo. Em seguida, os compostos foram importados, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético do MolDock Score (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: Um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 iterações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por corre. A função de pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp2-sp2.

**Quadro 1** - Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo

Proteína	PDB ID/Homologia	Controle Positivo
Di-hidro-orotato Desidrogenase		
Tripanotiona Redutase	Homologia	 Amfotericina B
UDP-Glicose Pirofosforilase		

Fonte: Autor (2021).

#### 4.15 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

Simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas para estimar a flexibilidade das interações entre proteínas e ligantes, usando o *software* GROMACS 5.0 (European Union Horizon 2020 Program, Sweden). Topologias de proteínas e ligantes também foram preparadas usando campo de força GROMOS96 54a7, e a simulação MD foi realizada usando o modelo de água SPC de carga pontual, estendido em uma caixa cúbica. O sistema foi neutralizado pela adição de íons  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  e minimizado para remover contatos ruins entre moléculas complexas e o solvente. O sistema também foi balanceado a 300 K, usando o algoritmo V-rescale de 100 ps, representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido por pressão de equilíbrio a 1 atm. Usando o algoritmo Parrinello-Rahman como NPT (pressão e temperatura constantes de partículas), até 100 ps. Simulações MD foram realizadas em 5.000.000 de etapas, a 10 ns. Para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo era estável perto da estrutura experimental, os valores de desvio quadrático médio (RMSD) de todos os átomos de Cα foram calculados em relação às

estruturas iniciais. Os valores de flutuação quadrática média (RMSF) também foram analisados para verificar os papéis desempenhados pelos resíduos perto do sítio de ligação do receptor. Os gráficos RMSD e RMSF foram gerados no software Grace e proteínas e ligantes foram visualizados no UCSF Chimera (BONDI, 1964; ABRAHAM *et al.*, 2015; PETTERSEN *et al.*, 2021; NACHBAGAUER *et al.*, 2021; GROMACS, 2022).

#### **4.16 PRODUÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (NLCs)**

Carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) foram produzidos utilizando Precirol® ATO 5 (1- 3%) como lipídio sólido, MCT (1-10%) como lipídio líquido, Pluronic® F68 (1- 3%) como surfactante hidrofílico e Lipoid® S-100 (1%) como surfactante lipofílico. As fases foram devidamente pesadas em frascos separados, sendo a fase oleosa composta pelos lipídios e surfactante lipofílico, e a aquosa, água e tensoativo hidrofílico. Os materiais foram aquecidos em banho-maria a  $65 \pm 5$  °C sob uma agitação constante de 1000 rpm até a completa solubilização. Posteriormente, as fases foram misturadas e as partículas tiveram seus tamanhos reduzidos à escala nanométrica através da ruptura ultrassônica a 65 W por 120 s, utilizando um sonicador de sonda ultrassônica (Disruptor, Ultronique®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) (UCHÔA<sub>a</sub> *et al.*, 2025). Os nanossistemas produzidos foram, então, resfriados à temperatura ambiente e armazenados a 4 °C até análises de caracterização posteriores. Um total de 12 formulações foram preparadas, de forma randomizada, a fim de analisar a interação entre os componentes em diversas concentrações.

#### **4.17 CARACTERIZAÇÃO DE NLCs**

##### *Análise do tamanho de partícula*

O diâmetro hidrodinâmico e a distribuição de tamanho dos nanossistemas foram avaliados por meio de dispersão dinâmica de luz (DLS) utilizando um Zetasizer Lab (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) a 25 °C. As medições foram conduzidas em um ângulo de espalhamento fixo

de 90 graus, com amostras diluídas em água Milli-Q® em uma proporção de 1:100. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram relatados como o diâmetro hidrodinâmico médio (distribuição de tamanho) e índice de polidispersão (PDI) (UCHÔA<sub>a</sub> *et al.*, 2025).

#### *Análise do potencial zeta*

O potencial zeta ( $\zeta$ ) também foi medido utilizando o Zetasizer Lab (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) a 25 °C. Para garantir uma força iônica consistente, as amostras foram diluídas em uma proporção de 1:100 em uma solução salina (NaCl, 1 mM) antes da análise. Os resultados finais representam a média de três medições independentes.

### **4.18 INCORPORAÇÃO DA FERAI AO NLC**

Após escolha da formulação mais adequada, o composto FERAI foi adicionado na concentração de 1 mg/mL na fase oleosa de acordo com sua solubilidade. O NLC contendo FERAI (FERAI-NANO) foi produzido como descrito anteriormente.

### **4.19 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DA FERAI-NANO**

A avaliação da atividade da FERAI-NANO foi realizada utilizando macrófagos murinos J774, incubados em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço) em meio Eagle modificado por Dulbecco, suplementados com 10% de soro bovino fetal (SIGMA) e 50  $\mu$ g/mL de gentamicina (GIBCO) e mantidos por 24h em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O composto foi testado nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125  $\mu$ M, em triplicatas e incubado por 72 h. Posteriormente, foram adicionados 20  $\mu$ L/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 4h. A leitura no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA) foi realizada a 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos através dos valores da concentração citotóxica de 50% para as células (CC<sub>50</sub>). Como controle positivo foi utilizada a violeta de genciana

(Synth, Brasil) (MEIRA *et al.*, 2017).

#### **4.20 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA FERAI-NANO**

Promastigotas de *L. braziliensis* ( $1 \times 10^6$  por poço) foram cultivadas em placa de 96 poços com fundo U em meio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementadas com 10% de soro bovino fetal e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina (GIBCO) e submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de FERAI-NANO (50  $\mu\text{M}$  – 3,125  $\mu\text{M}$ ; diluições 1:2), em triplicatas, incubado por 72h a 26 °C. A anfotericina B foi usada como controle positivo (2  $\mu\text{M}$ ), em triplicatas. Posteriormente, foi adicionado 20  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 2 h. A leitura foi realizada no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O valor de  $\text{Cl}_{50}$  foi calculado com base no percentual de inibição do crescimento das células comparado aos controles negativos. O cálculo foi obtido através dos valores do logaritmo da concentração, seguidos pelo ajuste da curva de regressão não linear. Os valores obtidos correspondem a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes.

#### **4.21 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE**

O IS foi calculado pela razão entre valor de  $\text{CC}_{50}$  obtido em macrófagos e o valor de  $\text{Cl}_{50}$  obtido em promastigotas tratados com o FERAI-NANO (PASSOS *et al.*, 2015).

#### **4.22 INFECÇÃO *in vitro* DE MACRÓFAGOS MURINOS E TRATAMENTO COM FERAI-NANO**

Macrófagos murinos J774 foram cultivados em placas de 24 poços com fundo U a uma concentração de  $5 \times 10^5$  com lamínulas adicionadas aos poços previamente e infectados com *L. braziliensis* em fase estacionária a uma proporção de 10 parasitos por macrófago. Após lavagem com meio DMEM, diferentes concentrações de FERAI-NANO (25; 12,5; e 6,25  $\mu\text{M}$ ) foram adicionadas aos poços. A AB (3  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Após 24 h, as células foram fixadas em metanol e coradas usando Giemsa

(Dinâmica, Química Contemporânea Ltda, SP, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago foi determinado pela contagem de 100 células por poço.

## **Resultados e discussão**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ENSAIO *in silico* DE PREDIÇÃO DE ATIVIDADE

Por meio do uso de simulações computacionais, a química computacional e a bioinformática têm assumido um papel inovador no direcionamento de estudos e planejamento de fármacos (OPREA, 2005). Nesse contexto, destaca-se o uso de modelos *in silico*, que têm evoluído com progressos notáveis em diversas áreas, como: correlação, predição, simplificação, automatização, entre outros aspectos expressivos (CRUZ *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de novos medicamentos é um processo complexo que requer tempo e recursos financeiros. Estudos auxiliados por computador visam criar novas abordagens que impulsionem a pesquisa e forneçam caminhos para testes adicionais. A triagem virtual para identificação e otimização de outras metodologias de teste é uma vantagem desses estudos, pois é possível prever a atividade farmacológica para uma molécula específica, quantificando a atividade e a inatividade com uma pontuação de probabilidade (YU; MACKERELL, 2016; SURABHI; SINGH, 2018).

Com base nisso, a avaliação *in silico* teve como objetivo prever as possíveis atividades biológicas das chalconas 1 ((E)-3-(4-(aliloxi)fenil)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)prop-2-en-1-ona), 2 ((E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(4-etoxifenil)prop-2-en-1-ona), 3 ((E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona) e 4 ((E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona), com base em suas fórmulas estruturais. As ferramentas PASS filter e MolPredictX foram utilizadas. O programa PASS reconheceu as 15 atividades mais propícias de serem desenvolvidas por essas substâncias (TABELAS 1-4). O fato de as quatro substâncias pertencerem à mesma classe poderia explicar a ocorrência de resultados semelhantes entre elas, levando em consideração que os testes funcionam usando a decomposição da estrutura molecular em descritores 2D e 3D, dessa forma, se espera que tenham semelhança entre si.

**Tabela 1** – Predição de atividade biológica do composto 1 através do programa PASS filter.

Composto 1		
Pa	Pi	Atividade
0,935	0,002	1-Acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferase (inibidor)
0,921	0,003	Caspase 3 (estimulante)
0,886	0,005	Feruloil esterase (inibidor)
0,810	0,007	Apoptose (agonista)
0,802	0,008	Expressão de JAK2 (inibidor)
0,774	0,042	Integridade da membrana (agonista)
0,773	0,015	Antineoplásica
0,770	0,004	Carminativa
0,760	0,002	Expressão de NOS2 (inibidor)
0,753	0,004	Interleucinas (antagonista)
0,741	0,005	Antileucêmica
0,718	0,004	Monofenol mono-oxigenase (inibidor)
0,713	0,004	Beta glucuronidase (inibidor)
0,704	0,009	Antiprotozoária ( <i>Leishmania</i> )
0,702	0,004	MAP cinase (estimulante)

Legenda: Pa = probabilidade de ser ativo; Pi = probabilidade de ser inativo.

**Tabela 2** – Predição de atividade biológica do composto 2 através do programa PASS filter.

Composto 2		
Pa	Pi	Atividade
0,899	0,003	Caspase 3 (estimulante)
0,832	0,003	Carminativa
0,806	0,035	Integridade da membrana (agonista)
0,765	0,015	Feruloil esterase (inibidor)
0,719	0,013	Apoptose (agonista)
0,707	0,061	Aspulvinona dimetilaliltransferase (inibidor)
0,706	0,004	1-Aciliglicerol-3-fosfato O-aciltransferase (inibidor)
0,700	0,057	Mucomembranas (protetor)
0,669	0,005	GABA aminotransferase (inibidor)
0,649	0,011	Antiprotozoária ( <i>Leishmania</i> )
0,625	0,040	Antineoplásica
0,619	0,013	Vasodilatador coronário
0,606	0,028	Captação de neurotransmissor (inibidor)
0,578	0,006	Fator de transcrição (inibidor)
0,562	0,020	Expressão de MMP9 (inibidor)

Legenda: Pa = probabilidade de ser ativo; Pi = probabilidade de ser inativo.

**Tabela 3** – Predição de atividade biológica do composto 3 através do programa PASS filter.

Composto 3		
<b>Pa</b>	<b>Pi</b>	<b>Atividade</b>
0,974	0,001	1-Aciglicerol-3-fosfato O-aciltransferase (inibidor)
0,967	0,002	Caspase 3 (estimulante)
0,955	0,003	Integridade da membrana (agonista)
0,941	0,001	Carminativa
0,900	0,004	Feruloil esterase (inibidor)
0,872	0,002	GABA aminotransferase (inibidor)
0,831	0,003	Expressão de MMP9 (inibidor)
0,824	0,006	Expressão de JAK2 (inibidor)
0,780	0,005	Antiprotozoária ( <i>Leishmania</i> )
0,775	0,005	Captação de neurotransmissor (inibidor)
0,751	0,004	MAP cinase (estimulante)
0,745	0,037	Mucomembranas (protetor)
0,707	0,016	Antidiscinético
0,706	0,062	Aspulvinona dimetilaliltransferase (inibidor)
0,703	0,014	Apoptose (agonista)

Legenda: *Pa* = probabilidade de ser ativo; *Pi* = probabilidade de ser inativo.

**Tabela 4** – Predição de atividade biológica do composto 4 através do programa PASS filter.

Composto 4		
Pa	Pi	Atividade
0,970	0,001	1-Aciglicerol-3-fosfato O-aciltransferase (inibidor)
0,955	0,003	Caspase 3 (estimulante)
0,931	0,005	Integridade da membrana (agonista)
0,911	0,002	Carminativa
0,848	0,007	Feruloil esterase (inibidor)
0,809	0,004	Captação de neurotransmissor (inibidor)
0,792	0,003	GABA aminotransferase (inibidor)
0,767	0,004	Expressão de MMP9 (inibidor)
0,753	0,007	Antiprotozoária ( <i>Leishmania</i> )
0,750	0,018	Antineoplásica
0,735	0,012	Apoptose (agonista)
0,735	0,014	Expressão de JAK2 (inibidor)
0,730	0,043	Mucomembranas (protetor)
0,719	0,014	Antidiscinético
0,707	0,005	MAP cinase (estimulante)

Legenda: Pa = probabilidade de ser ativo; Pi = probabilidade de ser inativo.

Tendo em vista que os estudos realizados são uma predição, ou seja, há uma provável possibilidade de que assim aconteçam, buscou-se outros subsídios que ajudassem na escolha da atividade biológica a ser pesquisada. Para isso, foi realizada uma investigação na literatura, observando a relação das atividades biológicas selecionadas para cada composto em flavonoides, classe de metabólitos secundários derivados biossinteticamente das chalconas. Utilizou-se, então, como descritores a palavra “flavonoids” juntamente com a atividade farmacológica a ser pesquisada, em diversas bases de dados, durante o período de 2017 a 2021.

Os resultados obtidos evidenciaram que uma das atividades biológicas

mais amplamente documentadas e associadas aos flavonoides consiste em sua ação antileishmania, a qual tem sido comprovada como eficaz contra múltiplas espécies do gênero *Leishmania*. Diversos estudos relatam a atividade leishmanicida de compostos pertencentes a essa classe, destacando-se a fisetina, um flavonoide polifenólico que demonstrou ação potente contra espécies do gênero *Leishmania* em ensaios *in vitro* (ADINEHBEIGI *et al.*, 2017); flavonoides diméricos purificados de *Arrabidaea brachypoda* apresentaram atividade *in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (ROCHA *et al.*, 2019); flavonoides isolados de *Polygonum salicifolium* desempenharam atividade leishmanicida *in vitro* contra *L. mexicana* (ZHEOAT *et al.*, 2021); a rusflavona, biflavonoide isolado do pólen de *Attalea funifera*, demonstrou atuar contra as formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis*, por meio de um mecanismo que envolve a produção de ROS, disfunção mitocondrial e ruptura da membrana nos parasitos (GOMES *et al.*, 2021).

No que diz respeito especificamente às chalconas, a literatura científica também relata sua atividade leishmanicida de amplo espectro, com eficácia documentada contra diversas espécies do gênero *Leishmania* (ALONSO *et al.*, 2020).

Os estudos de Nardella *et al.* (2018) indicaram que os compostos mais ativos contra *Leishmania* spp. pertencem às classes chalcona, biflavana e aurona, independentemente do ensaio realizado, seja ele *in vitro* ou *in vivo*. A avaliação fitoquímica das chalconas, 2',4'-dimetoxi-6'-hidroxichalcona e 2',5'-dimetoxi-4',6'-di-hidroxichalcona, mostrou uma atividade antileishmania promissora contra *L. mexicana*, com baixa toxicidade em testes com uma linhagem celular humana (ZHEOAT *et al.*, 2021).

A atividade leishmanicida de 31 chalconas sintéticas foi analisada utilizando promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major* e *L. infantum* em testes *in vitro*, os resultados indicaram que 16 desses compostos foram ativos contra as cepas, mostrando alta seletividade e baixa toxicidade frente a células de mamíferos (ORTALLI *et al.*, 2018).

Diante dos resultados encontrados, utilizou-se o MolPredictX, uma

ferramenta da web de livre acesso desenvolvida no Laboratório de Quimioinformática da UFPB para prever a atividade potencial das chalconas contra *L. braziliensis*. A seleção de *L. braziliensis* como modelo de estudo justifica-se por sua relevância como espécie endêmica no Brasil, cujo potencial terapêutico permanece subexplorado na literatura, na qual há grande potencial de se utilizar o arsenal terapêutico das chalconas para possível alternativa terapêutica (PATINO *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-VEGA *et al.*, 2021).

Os resultados demonstraram atividade antileishmania significativa para todas as quatro estruturas avaliadas contra a cepa em estudo, apresentando uma probabilidade de atividade (Pa) de 0,8 segundo os modelos preditivos empregados. Esse valor, indica um forte potencial farmacológico, uma vez que o valor de Pa acima de 0,7 é considerada alta probabilidade de atividade, sugerindo que os compostos possuem características estruturais favoráveis para interação com o alvo biológico (TABELA 5). Dessa forma, decidiu-se prosseguir com a investigação da atividade antiparasitária *in vitro* das chalconas contra *L. braziliensis* associada a uma análise de citotoxicidade.

**Tabela 5** – Predição da atividade biológica da chalcona no MolPredictX

	MolPredictX	
	<i>Leishmania braziliensis</i>	
	Pa	Pi
Chalcona 1	0,8	0,20
Chalcona 2	0,8	0,20
Chalcona 3	0,8	0,20
Chalcona 4	0,8	0,20

Legenda: Pa = probabilidade de ser ativo; Pi = probabilidade de ser inativo.

## 5.2 TESTE DE CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DAS CHALCONAS

Os ensaios de citotoxicidade no início dos estudos com produtos naturais estão entre os principais testes *in vitro* utilizados. Eles preveem a toxicidade e fornecem um meio para avaliação, triagem de segurança e classificação de compostos. O monitoramento da resposta celular dentro desses ensaios fornece resultados confiáveis e podem servir como base para mensurar outros parâmetros, como viabilidade celular e IS (TOLOSA; DONATO; GÓMEZ-LECHÓN, 2014; COSTA *et al.*, 2020).

A avaliação da citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) foi realizada em macrófagos murinos da linhagem J774 e os resultados para cada composto foram comparados com violeta de genciana ( $CC_{50} = 0,7 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ), um medicamento com atividade citotóxica, ou AB, fármaco com ação antileishmania. Todas as chalconas exibiram  $CC_{50} > 50 \mu\text{M}$ , sendo várias vezes menos citotóxicas do que a AB ( $CC_{50} = 3,6 \mu\text{M}$ ) (TABELA 6).

A atividade antileishmania em cultura axênica foi usada para calcular o valor de  $CE_{50}$  e avaliar a atividade dos compostos contra promastigotas de *L. braziliensis*. Os compostos 1-3 não apresentaram potência inibitória promissora, obtendo valores de  $CE_{50}$  acima de  $50 \mu\text{M}$ , em comparação a AB usado como controle positivo ( $CE_{50} = 0,32 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ). No entanto, o composto 4 apresentou atividade potente inibindo o crescimento de promastigotas de *L. braziliensis*, com um valor de  $CE_{50}$  de  $9,75 \pm 1,7 \mu\text{M}$  (TABELA 6). Com base nos resultados obtidos, a chalcona 4, renomeada como “FERAI”, foi selecionada para continuidade dos testes, por apresentar o perfil mais promissor em termos de atividade biológica entre os demais compostos investigados.

Em adição, FERAI demonstrou atividade significativa contra as formas amastigotas de *L. braziliensis* com um valor de  $CE_{50}$  de  $10,13 \pm 1,7 \mu\text{M}$ , enquanto a AB apresentou um valor de  $CE_{50}$  de  $0,7 \pm 0,004 \mu\text{M}$  para este mesmo parasito. O IS, conforme calculado a partir da razão entre os valores de  $CC_{50}$  e  $EC_{50}$  para FERAI foi 6,8 vezes mais seletivo (IS) para promastigotas e 6,6 vezes mais potente para amastigotas de *L. braziliensis*.

do que para células de mamíferos. AB foi respectivamente 11,25 e 5,14 vezes mais seletivo (IS) (TABELA 6). O FERA1 apresentou um índice de seletividade maior para amastigotas do que AB, o medicamento de referência.

**Tabela 6** – Avaliação da citotoxicidade (CC<sub>50</sub>), metade da concentração máxima efetiva para 50% das formas promastigotas e parasitos intracelulares (CE<sub>50</sub>) e Índice de Seletividade (IS) das chalconas

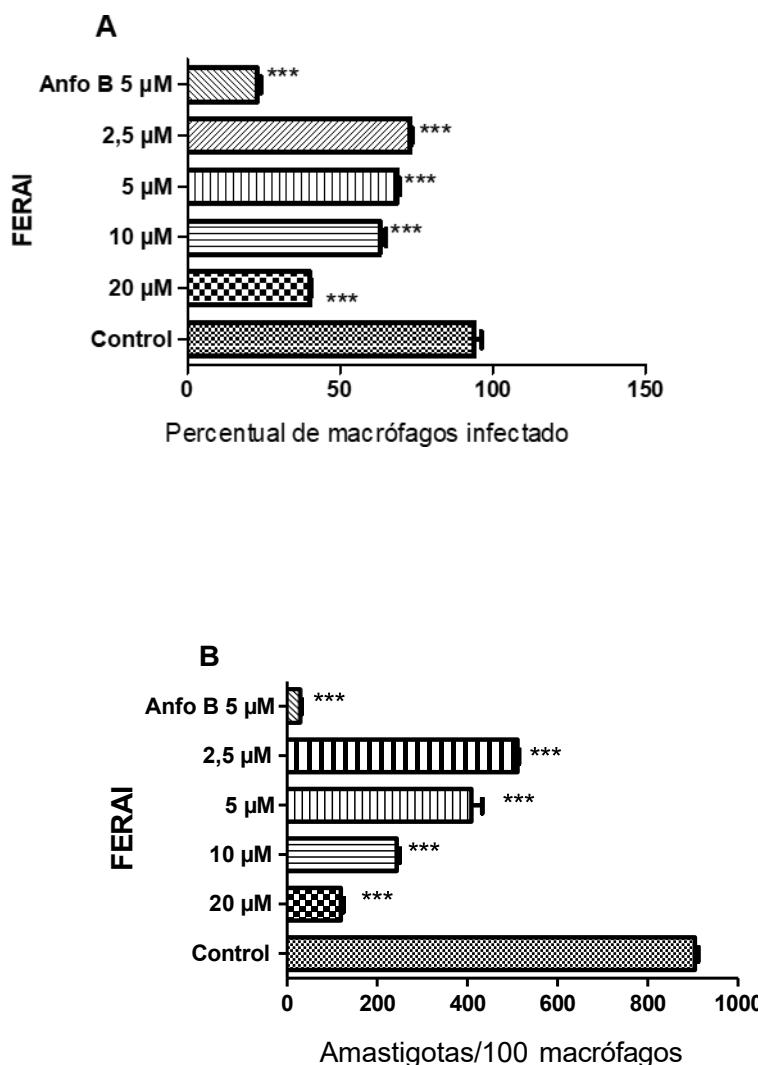
Composto	CC <sub>50</sub> ±	CE <sub>50</sub> ± D.P.	IS	CE <sub>50</sub> ± D.P.	IS
	D.P.	promastigotas	promastigotas	amastigotas	amastigotas
	Mφ J774 / μM	<i>L. braziliensis</i> / μM	<i>L. braziliensis</i>	<i>L.</i> <i>braziliensis</i>	<i>L.</i> <i>braziliensis</i>
<b>1</b>	>50	>50	-	-	-
<b>2</b>	>50	>50	-	-	-
<b>3</b>	>50	>50	-	-	-
<b>4</b> (FERAI)	>50	9,75 ± 1,7	6,8	10,13 ± 1,7	6,6
AB	3,6 ± 0,50	0,32 ± 0,01	11,25	0,7 ± 0,004	5,14
VG	0,7 ± 0,09	-	-	-	-

Legenda: valores calculados a partir de dois experimentos independentes. DP: desvio padrão. AB: anfotericina B. VG: violeta de genciana.

Diante dos resultados em que a FERA1 apresentou potência inibitória promissora e um índice de seletividade maior para amastigotas do que a AB, levantou-se a hipótese de que a adição de bromo a essa molécula, possa ter otimizado os efeitos antileishmania desta em relação as demais moléculas. Relatos na literatura já relacionam as substâncias sintéticas bromadas com um potencial bioativo superior, embora os mecanismos que expliquem esses resultados ainda não sejam totalmente elucidados, pode-se citar diversas possibilidades, como: elevação da lipofilicidade e permeabilidade através das membranas biológicas, aumento da meia-vida ou possibilidade de formação de ligações intermoleculares (interações atrativas) entre a região eletrofílica da molécula contendo átomos de bromo e os sítios nucleofílicos ativos de biomoléculas (JITAREANU *et al.*, 2018). Dessa forma, a bromação pode levar a um aumento da potência de agentes terapêuticos e as pesquisas na área de quimioinformática podem fornecer contribuições importantes para a elucidação das interações moleculares.

### **5.3 INFECÇÃO *in vitro* DE MACRÓFAGOS MURINOS E TRATAMENTO COM FERA1**

FERAI também reduziu a infecção de macrófagos murinos por *L. braziliensis*. Macrófagos murinos da cepa J774 foram infectados com amastigotas de *L. braziliensis* e tratados com várias concentrações de FERA1, o que causou uma redução dependente da concentração na porcentagem de macrófagos infectados e no número de parasitos intracelulares por 100 macrófagos quando comparado ao grupo controle. Como esperado, AB também diminuiu o número de macrófagos infectados e o número de amastigotas por 100 células (FIGURA 13). Dessa forma, a resposta dose-dependente de FERA1 sugere um mecanismo de ação direto sobre o parasito intracelular e/ou modulação da resposta do hospedeiro, potencialmente interferindo na sobrevivência das amastigotas ou na capacidade dos macrófagos em controlar a infecção.

**Figura 13 – Efeito da FERA1 contra parasitos intracelulares de *L. braziliensis*.**

Legenda: macrófagos murinos foram infectados por *L. braziliensis* (10:1) e tratados com quatro diferentes concentrações de FERA1 1:2 (2,5 a 20  $\mu$ M) e AB (5  $\mu$ M) por 24 h. A porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de parasitos intracelulares por 100 macrófagos (B) foram determinados após 24 h de tratamento.

Uma série de estudos relatam chalconas com atividade antileishmania potente frente a espécie de *L. braziliensis* (MELLO *et al.*, 2014; ESCRIVANI *et al.*, 2021; OSMAN *et al.*, 2022). Duas chalconas sintéticas foram avaliadas de forma *in vitro* contra promastigotas de *L. braziliensis* quanto a atividade inibitória e a citotoxicidade frente a macrófagos murinos. Os resultados da  $IC_{50}$  e da  $CC_{50}$  foram, respectivamente,  $1,38 \pm 1,09$ ;  $6,36 \pm 2,04$   $\mu$ M, e  $13,49 \pm 3,13$ ;  $199,43 \pm 4,11$   $\mu$ M, indicando que ambas as chalconas apresentaram

um efeito sobre os promastigotas de *L. braziliensis*, com baixa toxicidade para células de mamíferos (MELLO *et al.*, 2014).

De maneira similar aos resultados encontrados, um grupo de pesquisa buscou através de um estudo *in vitro* descobrir novos alvos terapêuticos para o tratamento da leishmaniose, com isso, investigou a ação da transchalcona (TC) contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. O tratamento dos macrófagos infectados por *L. amazonensis* reduziu as células infectadas, assim como o número de amastigotas por macrófago, sem efeitos citotóxicos aos macrófagos (MIRANDA-SAPLA *et al.*, 2019). Outro estudo expôs promastigotas, amastigotas e macrófagos peritoneais a concentrações crescentes de três extratos de raízes de *Lonchocarpus cultratus*, ricos em chalconas. Esses extratos possuíram a propriedade de inibir o crescimento de promastigotas ( $IC_{50}$   $0,62 \pm 0,3$ ,  $0,94 \pm 0,5$  e  $1,28 \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente) e reduzir o número de amastigotas dentro dos macrófagos ( $IC_{50}$   $1,36 \pm 0,14$ ,  $1,54 \pm 0,26$  e  $4,09 \pm 0,88 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente). A avaliação da citotoxicidade contra macrófagos murinos resultou em um  $CC_{50}$  de  $13,12 \pm 1,92$ ,  $92,93 \pm 9,1$  e  $>300 \mu\text{g/ml}$ , resultando em alto índice de seletividade para promastigotas e amastigotas (STAFFEN *et al.*, 2022). Dessa forma, as chalconas demonstram ser uma classe de moléculas promissoras como futuras alternativas terapêuticas contra a leishmaniose.

#### **5.4 EFEITO DE FERAI SOBRE A MODULAÇÃO DE ROS EM PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis***

A produção intracelular de ROS constitui um mecanismo bioquímico fundamental durante o processo de apoptose em formas promastigotas de *Leishmania*. Em condições fisiológicas, os macrófagos ativados são capazes de gerar elevadas concentrações de ROS como parte da resposta microbicida, visando neutralizar patógenos intracelulares, incluindo vírus, fungos e parasitos (LOGGE; DESCOTEAUX, 2006; ALTI *et al.*, 2020).

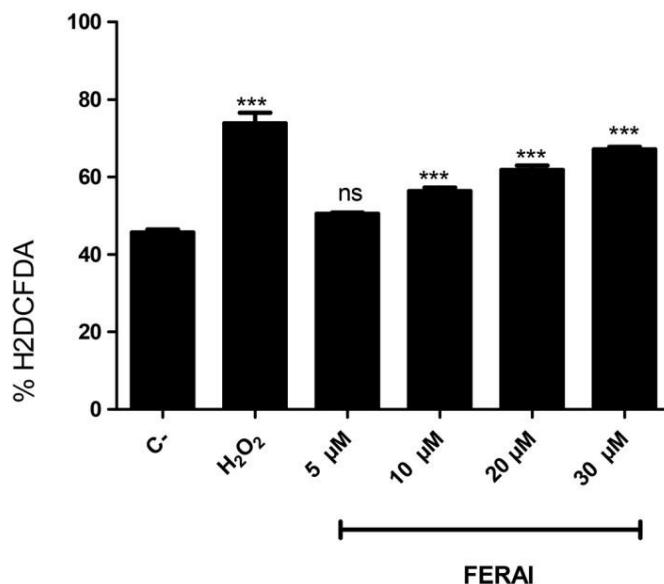
No entanto, *Leishmania* spp. desenvolveram estratégias sofisticadas para suprimir a produção de ROS pelos macrófagos, assegurando sua sobrevivência no ambiente hostil dos fagolisossomos. Essa evasão é

mediada pela modulação de vias específicas da cascata de sinalização celular do hospedeiro, interferindo na ativação de mecanismos oxidativos antimicrobianos (ALTI *et al.*, 2020). *Leishmania* pode secretar glicoproteínas que degradam componentes da NADPH oxidase, interferindo no processo oxidativo (PINHO *et al.*, 2022). Tais adaptações destacam a complexidade das interações parasito-hospedeiro e reforçam a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre o processo.

Substâncias que atuam aumentando a produção de ROS nos macrófagos podem contornar as estratégias de sobrevivência de *Leishmania* e levar à morte do parasito. Isso pode ocorrer através de alguns possíveis mecanismos, entre eles: a) Ruptura das defesas antioxidantes do parasito; b) Os compostos atuam de forma pró-oxidantes sobre carregando esses sistemas, o que pode resultar em danos oxidativos irreversíveis a lipídios, proteínas e DNA do parasito; c) Inibição de enzimas essenciais a sobrevivência do parasito (COSTA *et al.*, 2019; FERRARI, 2019; SAHA; JAH, 2023).

Diante disso, os níveis de ROS foram quantificados utilizando o corante permeável H<sub>2</sub>DCFDA, com o objetivo de investigar se o efeito leishmanicida da FERAL sobre promastigotas de *L. braziliensis* está associado a uma modulação na produção de ROS em macrófagos murinos. Os resultados mostraram que FERAL induziu a produção de ROS em promastigotas (com níveis aumentados de ROS) notados especialmente nas maiores concentrações utilizadas: 10 µM (56,33%), 20 µM (61,76%) e 30 µM (67,13%) em comparação com o controle não tratado. Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi usado como um controle positivo (FIGURA 14).

**Figura 14 – Avaliação dos níveis de ROS intracelulares em promastigotas de *L. braziliensis***



Legenda: avaliação dos níveis de ROS intracelulares induzidos usando FERA1 em diferentes concentrações (5; 10; 20; e 30  $\mu$ M) por 24 h e incubados com sonda H<sub>2</sub>DCFDA por 30 min. \*\*\* $p < 0,001$  e ns = não significativo em comparação ao controle não tratado.

Os dados da TABELA 7 demonstram um aumento dose-dependente nos níveis de ROS em promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com a chalcona FERA1 nas concentrações de 10, 20 e 30  $\mu$ M. O tratamento com FERA1 resultou em elevação progressiva dos níveis de ROS: 56,33%  $\pm$  1,27 com 10  $\mu$ M, 61,76%  $\pm$  1,58 com 20  $\mu$ M e 67,13%  $\pm$  0,59 com 30  $\mu$ M quando comparados com o controle positivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que atingiu 73,9%  $\pm$  3,74. Nota-se que na concentração mais elevada de FERA1 (30  $\mu$ M) identifica-se um efeito oxidativo próximo ao induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Tabela 7 – Avaliação dos níveis de ROS intracelulares em promastigotas de *L. braziliensis* (média e desvio padrão de amostras de controle positivo e controle não tratado)**

Amostras	ROS / %	
	Média	Desvio padrão
Controle negativo	45,66	± 1,14
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	73,90	± 3,74
FERAI 5 µM	50,50	± 0,43
FERAI 10 µM	56,33	± 1,27
FERAI 20 µM	61,76	± 1,58
FERAI 30 µM	67,13	± 0,59

Esse resultado sugere que FERAI atua como indutor de estresse oxidativo em *L. braziliensis* e que essa ação se dá de forma dose-dependente. Este mecanismo está alinhado com estudos que demonstram a propriedade de chalconas em comprometer o sistema antioxidante de tripanossomatídeos. Por exemplo, um estudo constatou a atividade antileishmania da chalcona natural 2',6'-di-hidroxi-4'-metoxicalcona (DMC) contra cepas de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis* e ao ser investigado o mecanismo de ação, constatou-se que a incubação da chalcona no parasito leva ao acúmulo de ROS e à morte do parasito (ESCRIVANI *et al.*, 2021). Outro mecanismo que vem sendo estudado, está na relação da inibição da enzima tripanotiona redutase no parasito por meio da ação de chalconas, o que resulta em um desbalanço no sistema antioxidante, com consequente acúmulo de ROS e morte do parasito (VALENCIA *et al.*, 2024).

Um estudo contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* de nove 4,8-dimetoxinaftalenil chalconas demonstrou que além de produzirem um efeito farmacológico promissor, esses compostos apresentaram um baixo perfil de citotoxicidade ( $CC_{50} = 372,9 \pm 0,04 \mu M$ ), um

alto índice de seletividade (IS = 112,6) e as chalconas induziram um aumento de ROS (SANTIAGO-SILVA *et al.*, 2022). Um outro estudo traz a investigação de 17 derivados de flavonoides, em que 11 deles apresentaram alta atividade contra amastigotas de *L. amazonensis*, também com baixa toxicidade para células de mamíferos. Além disso, mostraram uma alta produção de ROS por células infectadas tratadas com os inibidores mais ativos da cisteína protease B (CPB), confirmado uma resposta potencial imunomoduladora dos macrófagos nesse mecanismo de ação (LOURENÇO *et al.*, 2023).

Com base nos nossos resultados encontrados que apontam uma progressão linear dos níveis de ROS com o aumento da concentração de FERAI, indicando mecanismo de ação direto, como também o efeito significativo quando comparado com o controle negativo mesmo utilizando a concentração mais baixa de FERAI (5  $\mu$ M) sugerindo sensibilidade de *L. braziliensis* a essa classe de compostos, e em todos os dados disponíveis na literatura a respeito da modulação de ROS como possível mecanismo para inibir *Leishmania* sp., sugere-se que possivelmente esse seja um dos ou o principal mecanismo de ação por meio do qual a FERAI leve o parasito a morte. Os estudos *in silico* a seguir devem auxiliar na confirmação de novas possíveis vias de ação e outras encontram-se em estudo no nosso grupo de pesquisa.

## 5.5 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS

O alinhamento de sequências de proteínas é uma ferramenta que ajuda a verificar a semelhança e identidade da mesma proteína de diferentes espécies ou diferentes proteínas da mesma espécie. Com esta técnica, é possível analisar as regiões conservadas e identificar resíduos comuns do local ativo. Além disso, é possível apontar diferenças e semelhanças estruturais que podem contribuir para o desenvolvimento de medicamentos (GAO; SKOLNICK, 2021; KONG *et al.*, 2022). Assim, foram investigados os aminoácidos compartilhados entre as sequências das proteínas alvos e das proteínas moldes.

Os resultados mostraram que a enzima Tripanotiona Redutase para *L.*

*braziliensis* obteve 84,01% de identidade com a enzima Tripanotionina Redutase da *L. infantum* (PDB: 3JK6) (FIGURA 15). Enquanto que a enzima Di-hidro-orotato Desidrogenase para *L. braziliensis* obteve 84,66% de identidade com a enzima Di-hidro-orotato Desidrogenase de *L. major* (PDB: 6EBS) (FIGURA 16). A última enzima avaliada correspondeu a UDP-Glicose Pirofosforilase de *L. braziliensis*, a qual apresentou 96,93% de identidade com a enzima Di-hidro-orotato Desidrogenase de *L. major* (PDB: 2OEF) (FIGURA 17). Os resultados de alinhamento mostraram que as sequências proteicas alvo apresentaram um grau elevado de identidade e similaridade, o que possibilitou a construção dos modelos de homologias confiáveis dessas proteínas.

**Figura 15** - Alinhamento da sequência da enzima Tripanotiona Redutase de *L. braziliensis* (1) e do molde (Tripanotiona Redutase de *L. infantum*) (2)

1	-----M P R A Y D L V V L G A G S G G L E A G W N A A S I Y N K K V A V V E V Q K E H	40
2	M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M S P R A Y D L V V L G A G S G G L E A G W N A A V T H K K K V A V V D V Q A T H	60
1	G P E C F A A L G G T C V N V G C V P K K L M V T G A Q Y M D L I R E S C G F G W E M D R D S I R S N W K K L I A A K N	100
2	G P E L F A A L G G T C V N V G C V P K K L M V T G A Q Y M D L I R E S G G F G W E M D R E S L C P N W K T L I A A K N	120
1	K V V S D I N K S Y T G M F D S T E G L S F H M G F G A L K D A H T V V V R K S E D E H S D V L E T L E A D Y V I L I A T	160
2	K V V N S I N E S Y K S M E A D T E G L S F H M G F G A L Q D A H T V V V R K S E D E H S D V L E T L D T E Y I L I A T	180
1	G S W P T R L G I P G D E I C I T S N E A F Y I D E A P K R A L C V G G G Y I S V E F A G I F N A Y K P P D G Q V D L C	220
2	G S W P T R L G V P G D E F C I T S N E A F Y I E D A P K R M L C V G G G Y I A V E F A G I F N G Y K P C G G Y V D L C	240
1	Y R G E V I L R G F D I L E V R K S L M K Q I E A N G I K I R T K V N P S R I T K N A D G S K H V C F E D G T E A D Y D Q	280
2	Y R G D L I L R G F D I L E V R K S L T K Q I L G A N G I R V R T I N L N E T K I T K N E D G S N H V H F N D G T E E D Y D Q	300
1	V M I L A V G R A P R S K A L Q L D K V G V K M G K N G A V V V D A Y S K T S V D N I Y A I G D V T D R I M L T P V A I N	340
2	V M I L A I G R V P R S Q A L Q L D K A G V R T G K N G A V Q V D A Y S K T S V D N I Y A I G D V T I N R V M L T P V A I N	360
1	E G S A F V E T I L F G C K P R A T D H T K V A C A V F S I P P I G T C G L T E E E A A K K I D V V A V Y E S S F T P L M	400
2	E G A A F V E T V F G G K P R A T D H T K V A C A V F S I P P I G T C G M T E E E A A K N I E T V A V Y A S S F T P L M	420
1	H N I S G S K H K T F M I R I V T K E K D G E V L G V H M L G D S A P E I I Q S V G I C M R M G A K I S D F H S T I G V	460
2	H N I S G S K H K E F M I R I I I T N E S N G E V L G V H M L G D S A P E I I Q S V G I C M K M G A K I S D F H S T I G V	480
1	H P T S A E E L C S M R T P A Y F Y E K G K R -----	483
2	H P T S A E E L C S M R T P A Y F Y E S G K R V E K L S S N L	511

*Legenda: As regiões cinzas correspondem a aminoácidos não semelhantes e não idênticos. As regiões vermelhas correspondem apenas a aminoácidos idênticos. As regiões amarelas são os aminoácidos semelhantes.*

**Figura 16** - Alinhamento da sequência da enzima Di-hidro-orotato Desidrogenase de *L. braziliensis* (1) e do molde (Di-hidro-orotato desidrogenase de *L. major*) (2)

1	-----MSLQVGILGNTTFANPFMNAAGVMCST-----	26
2	MGSSHHHHHHSSGLVPAGSHMASMTGGQQMGRGSMSLQVNLLNNNTFANPFMNAAGVMCTT	60
1	EEELAAMTESTSGSLLITKSCTPALREGNEAPRYYTPLGSINSMGLPNKGFDFYLAYSAR	86
2	TEELVAMTESASGSLVSKSCTPALREGNPTPRYQALPLGSINSMGLPNNGFDFYLAYAAE	120
1	HHDYSRKPLFISISGFAEENAEEMCKRLAPVAAEKGVILELNLCNPVPGKPQVAYDFDA	146
2	QHDYGKKPLFLMSGLISMRENVEMCKRLAAVATEKGVILELNLCNPVPGKPQVAYDFDA	180
1	MRRYLAPISEAYPHFFGVKMPPYFDFAHFDAAAEIFLNQFPKVQFITCINSIGNGLVIDVE	206
2	MRCQLTAVSEVYPHSFGVKMPPYFDFAAFDAAAEIFLNEFPKVQFITCINSIGNGLVIDAE	240
1	TESVVIKPKQGFGGLGGRYVFPPTALANVNAFYRRCPGKLIFGCGGVYTGEDAFLHVLAGA	266
2	TESVVIKPKQGFGGLGGRYVLPTALANINAFYRRCPGKLIFGCGGVYTGEDAFLHVLAGA	300
1	SMVQVGTAIHEEGAAIFERLTAELLDVMAKKGYKALDEFRGKVKAMD-----	313
2	SMVQVGTAIQEEGPSIFERLTSELLGVMAKKRYQTLDEFRGKVRTLTDGTAESTR	354

Legenda: As regiões cinzas correspondem a aminoácidos não semelhantes e não idênticos. As regiões vermelhas correspondem apenas a aminoácidos idênticos. As regiões amarelas são os aminoácidos semelhantes.

**Figura 17** - Alinhamento da sequência da enzima UDP-Glicose Pirofosforilase de *L. braziliensis* (1) e do molde (UDP-Glicose Pirofosforilase de *L. major*) (2)

1	MENDMKSLAAAQACVKKMRDAKVNEACIRTFIAQHVMVSKGETGSIPDSAIMPVDSLDA	60
2	MENDMKSLAAAQACVKKMRDAKVNEACIRTFIAQHVMVSKGETGSIPDSAIMPVDSLDA	60
1	LDSLTIIECDNAVLQSTVVLKLNGGLGTGMGLCDAKTLLEVKGDKTFLDFTALQVOYLRQH	120
2	LDSLTIIECDNAVLQSTVVLKLNGGLGTGMGLCDAKTLLEVKGDKTFLDFTALQVQYLRQH	120
1	CSEHLRFMLMDSFNTSASTKSFLKARYFWLYQVFDSEVELMQNQVPKILQDTLEPAAWAE	180
2	CSEHLRFMLMDSFNTSASTKSFLKARYFWLYQVFDSEVELMQNQVPKILQDTLEPAAWAE	180
1	NPAYEWAPPGHGDIYTALYGSGKLQELVEQGYRYMFVSNQDNLQATIDKRVLAYMEKEKI	240
2	NPAYEWAPPGHGDIYTALYGSGKLQELVEQGYRYMFVSNQDNLQATIDKRVLAYMEKEKI	240
1	DFLMEVCRRTESDKKGHLARQTVVYVKGKDQPAEKRVLLLRESAQCPKADMESFQDIN	300
2	DFLMEVCRRTESDKKGHLARQTVVYVKGKDQPAEKRVLLLRESAQCPKADMESFQDIN	300
1	KYSFFNTNNLWIRLPVILETMQEHHGTLPLPVIRNEKTVDSLNSASPKVYQLETAMGAAI	360
2	KYSFFNTNNLWIRLPVILETMQEHHGTLPLPVIRNEKTVDSLNSASPKVYQLETAMGAAI	360
1	AMFESASAIIVVPRSRFAPVKTCADLLALRS DAY VVTDDFRIVLDDDRCHGHPPVVLDLDSAH	420
2	AMFESASAIIVVPRSRFAPVKTCADLLALRS DAY VVTDDFRIVLDDDRCHGHPPVVLDLDSAH	420
1	YKMMNGFEKLVQHGVPSLVECKRVTVKGLVQFGAGNVLTGTVTIENTDSASAFVIPDGAK	480
2	YKMMNGFEKLVQHGVPSLVECKRVTVKGLVQFGAGNVLTGTVTIENTDSASAFVIPDGAK	480
1	LNDTTASPQQSTNK-----	494
2	LNDTTASPQQSTNKMRPLEHHHHHH	505

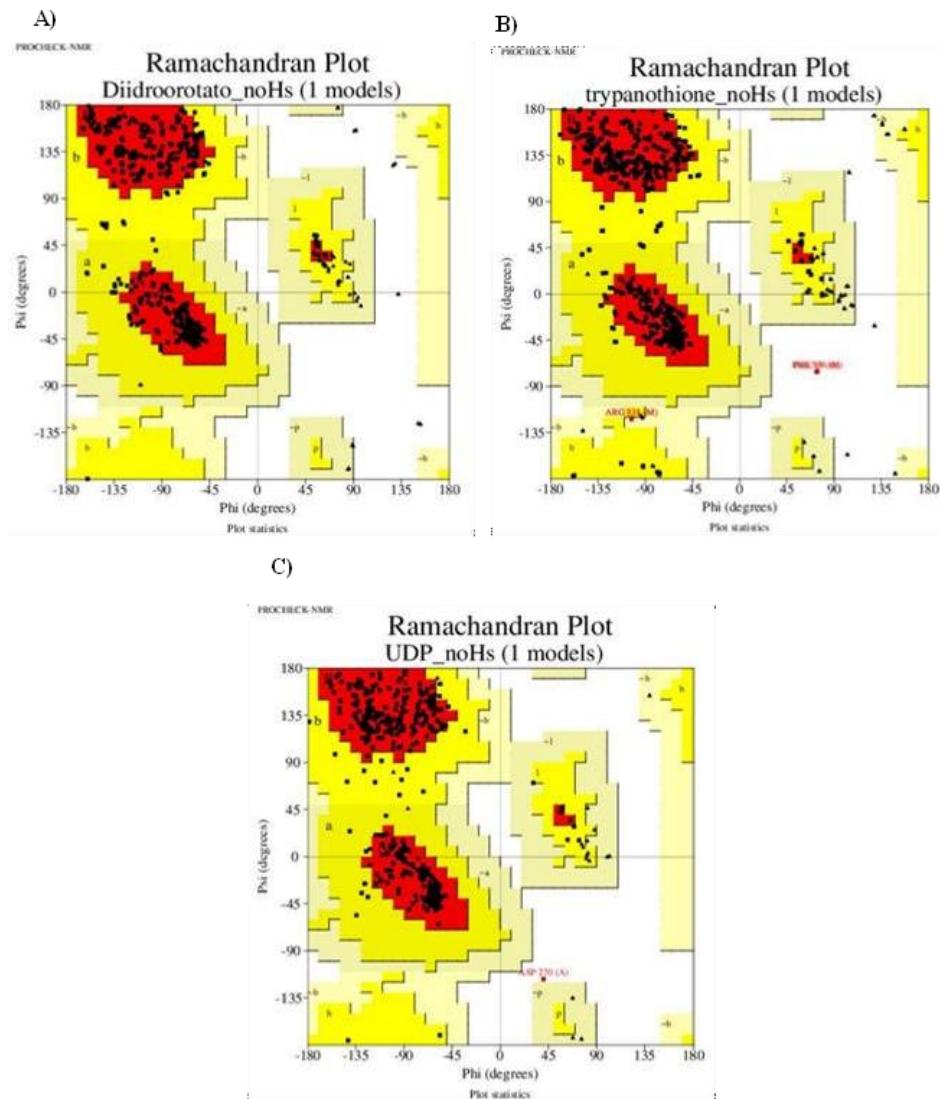
Legenda: As regiões cinzas correspondem a aminoácidos não semelhantes e não idênticos. As regiões vermelhas correspondem apenas a aminoácidos idênticos. As regiões amarelas são os aminoácidos semelhantes.

## 5.6 MODELAGEM POR HOMOLOGIA

Os modelos das enzimas Di-hidro-orotato Desidrogenase, Tripanotiona Redutase e UDP-Glicose Pirofosforilase foram gerados pelo método de modelagem por homologia. A confiabilidade dos modelos foi avaliada usando o gráfico Ramachandran, que representa todas as combinações possíveis de ângulos diédricos  $\Psi$  (psi) versus  $\phi$  (phi) para cada aminoácido em uma proteína, exceto glicina, que não possui cadeias laterais,

e os modelos são considerados confiáveis quando mais de 90% dos aminoácidos estão presentes nas regiões permitidas e/ou favorecidas (regiões coloridas do gráfico). As regiões em branco representam valores discrepantes, com contatos ruins. O modelo da enzima Di-hidro-orotato Desidrogenase gerado apresentou 91,8% de aminoácidos nas regiões favorecidas e 8,2% nas regiões permitidas (FIGURA 18). Enquanto que o modelo da enzima Tripanotiona Redutase apresentou de 91,6% de aminoácidos nas regiões favorecidas e 8% nas regiões permitidas (FIGURA 18). Por fim, para o modelo da enzima UDP-Glicose Pirofosforilase foram apresentados percentuais correspondentes a 93,5% de aminoácidos nas regiões favorecidas e 6,3% nas regiões permitidas (FIGURA 18) Assim, diante dos resultados, verifica-se que os modelos de homologia foram considerados confiáveis.

**Figura 18** - Gráfico de Ramachandran do modelo de homologia gerado para as enzimas: Di-hidro-orotato Desidrogenase (A), Tripanotiona Redutase (B) e UDP Glicose Pirofosforilase (C)



Legenda: As regiões coloridas representam as regiões permitidas e favorecidas das estruturas secundárias e as regiões brancas representam as regiões proibidas.

## 5.7 DOCKING MOLECULAR

O *docking* molecular, quando aplicado na análise de produtos naturais como candidatos a novos fármacos, permite obter dados sobre mecanismos de ação, interações moleculares e ligação substância-alvo. O *docking* molecular é uma técnica rápida, de baixo custo e eficiente, sendo muito útil para trabalhar tanto com produtos naturais quanto sintéticos, permitindo redução de perdas de material e melhor aproveitamento das substâncias (FU;

ZHAO; CHEN, 2018; PINZI; RASTELLI, 2019; FAN; FU; ZHANG, 2019).

A FERAI foi submetida à triagem utilizando *docking* molecular em 3 proteínas, sendo elas: di-hidro-orotato desidrogenase, tripanotiona redutase e UDP-glicose pirofosforilase. Os resultados do *docking* foram gerados usando duas funções de pontuação, o Moldock Score e o Rerank Score. Na maioria das funções de pontuação, os valores mais negativos indicaram melhores previsões. A proteína na qual o composto obteve valores de energia de ligação maiores ou próximos ao fármaco padrão em pelo menos uma função de pontuação foi considerada ativa (TABELA 8).

Os resultados de *docking* podem ser visualizados na TABELA 8. Segundo os resultados, nas três proteínas analisadas, o composto teste obteve energias negativas em todas elas, demonstrando, dessa forma, que ocorreu interações com todos os alvos em estudo. Além disso, obteve de uma forma mais específica bons resultados com as proteínas Di-hidro-orotato Desidrogenase e Tripanotiona Redutase, tendo sido observado que o composto investigado mostrou valores superiores ou próximos aos valores de MolDockscore e de Rerankscore quando comparados com os controles, e podendo associar esse resultado a uma certa especificidade do composto, visto que este apresentou energia superior ao ligante em dois alvos específicos. A FERAI mostrou-se mais potente contra as proteínas Di-hidro-orotato Desidrogenase e Tripanotiona Redutase, com valores de energia de afinidade de ligação -132,276 e -151,281 Kcal/mol, respectivamente. Esses resultados, indicam a potencialidade do composto através desses mecanismos de ação.

**Tabela 8** - Valores de energia de ligação analisados nas três proteínas selecionadas no estudo

Proteína	Docking molecular			
	Composto Teste		Controle Positivo	
	Moldockscore	Rerankscore	Moldockscore	Rerankscore
Di-hidro-orotato Desidrogenase	-132,276	-95,1107	-43,403	1141,65
Tripanotiona Redutase	-151,281	-317,774	-102,191	-282,763
UDP-Glicose Pirofosforilase	-56,8384	-39,1568	-146,389	-64,8544

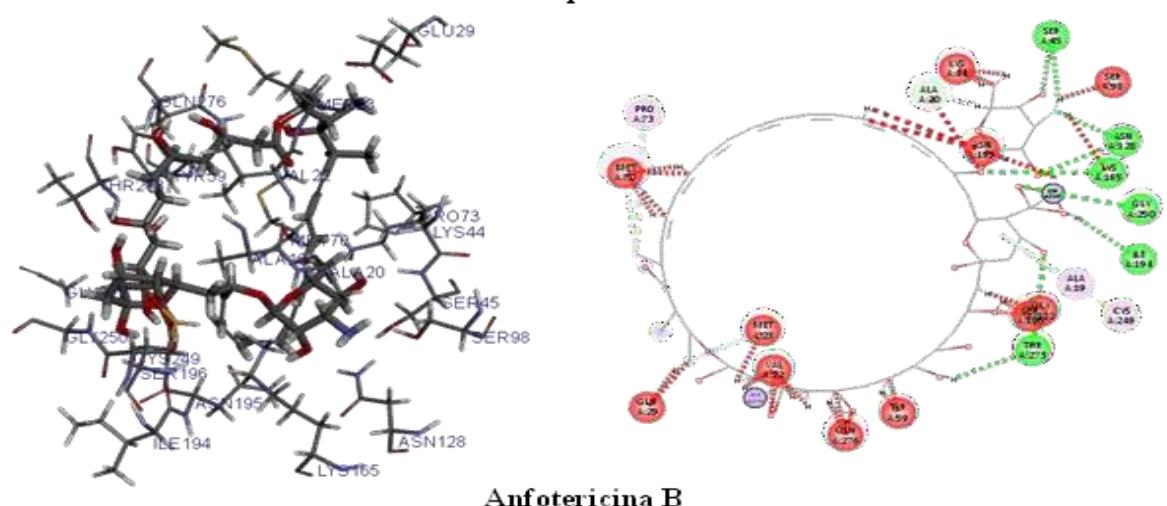
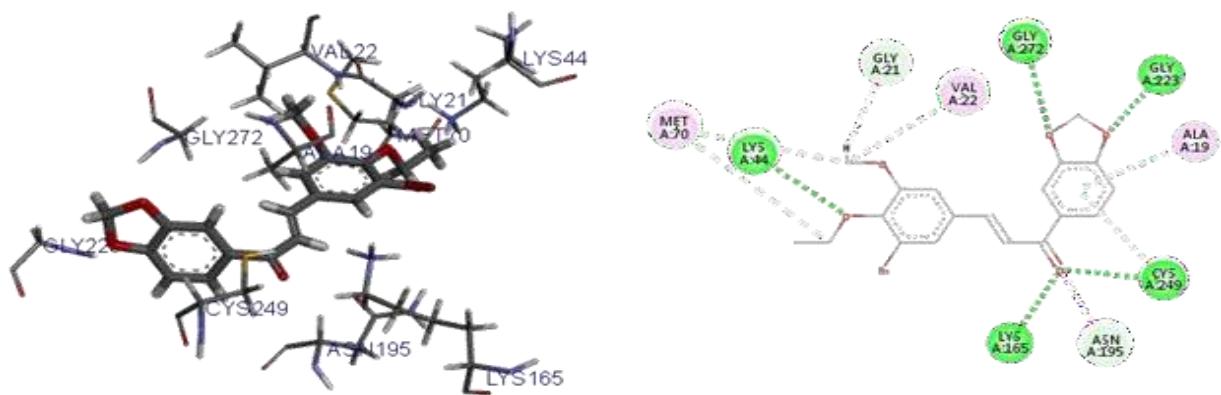
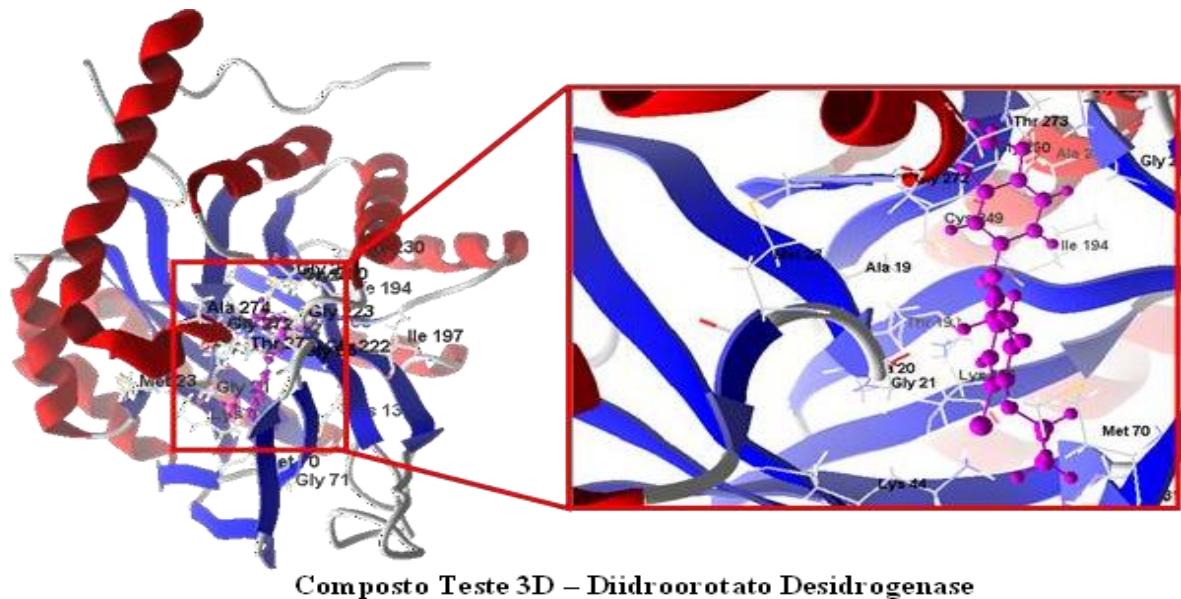
Foram analisadas de forma detalhada as interações estabelecidas pelo composto teste com as proteínas em que esse composto obteve resultados de afinidade de ligação superior ao fármaco padrão, ou seja, foram analisadas as interações e ligações formadas com o composto teste e as proteínas Di-hidro-orotato Desidrogenase e Tripanotiona Redutase.

Analisamos em detalhes as interações e ligações formadas com o composto de teste e as proteínas di-hidro-orotato desidrogenase e tripanotiona redutase. A FERA1 formou quatro interações hidrofóbicas com os aminoácidos Val 22, Ala 19, Cys 249 e Met 70; também formando sete ligações de hidrogênio com os aminoácidos Lys 44, Gly 21, Gly 272, Gly 223, Cys 249, Asn 195 e Lys 44 no sítio ativo da proteína di-hidro-orotato desidrogenase (FIGURA 19). A AB formou sete ligações de hidrogênio com resíduos Ser 45, Asn 128, Lys 165, Gly 250, Ile 194, Thr 273, Ala 20 e Met 20; seis interações hidrofóbicas com resíduos Pro 73, Glu 29, Met 20, Met 23, Ala 19 e Cys 249; e doze interações estéricas com resíduos Met 20, Glu 29, Met 23, Val 12, Gln 276, Tyr 59, Ser 198, Gly 122, Asn 199, Ser 98, Lys 44 e Lys 165. Coincidências ocorreram entre o controle positivo e o composto de teste na interação hidrofóbica do resíduo Cys 249.

Na enzima Tripanotiona Redutase, o composto teste estabeleceu seis interações hidrofóbicas com o sítio ativo dessa proteína, dentre elas: Thr 160,

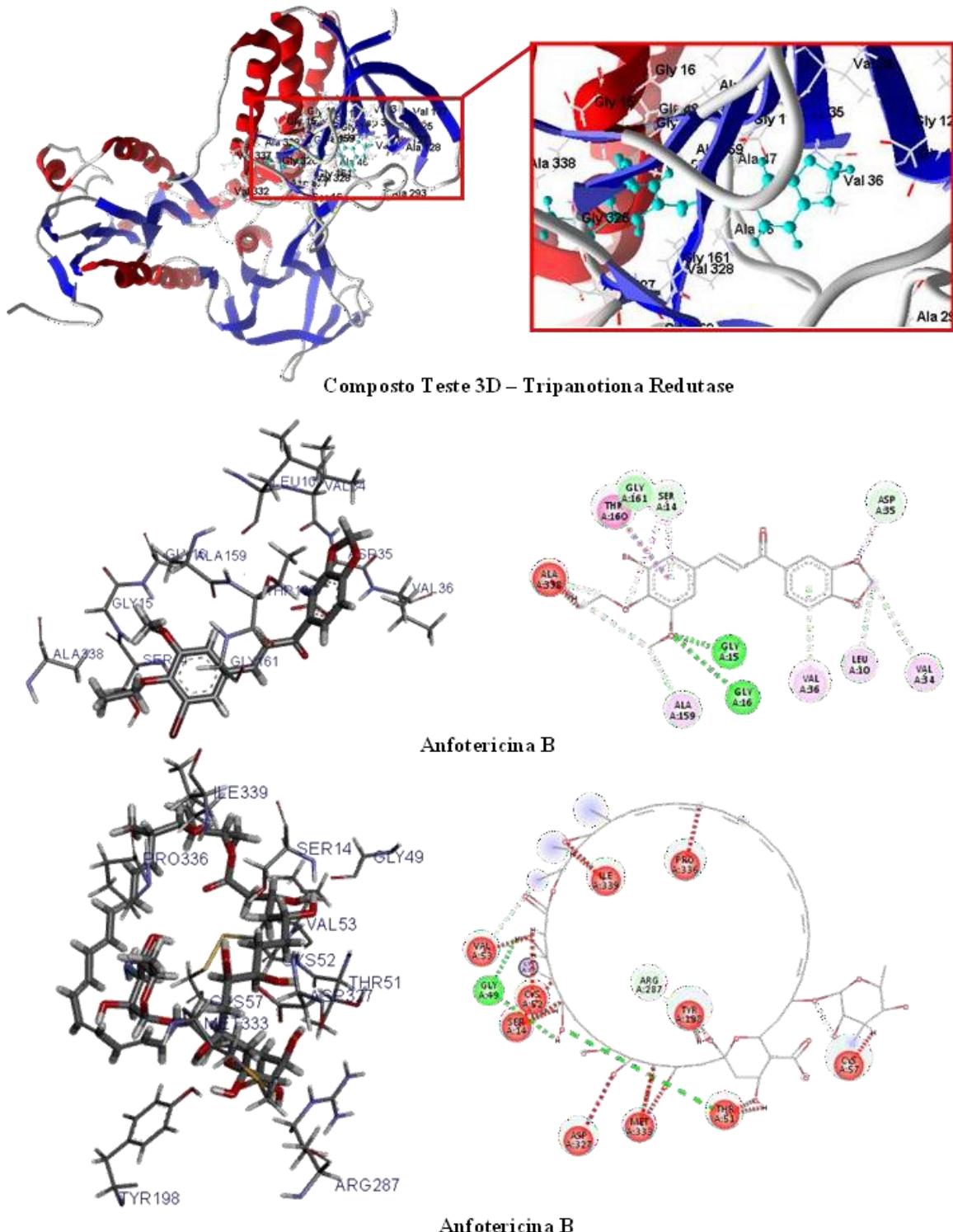
Ala 398, Ala 159, Val 36, Leu 10 e Val 34 e cinco interações de hidrogênio, as quais corresponderam a Gly 161, Ser 14, Asp 35, e Gly 15 (FIGURA 20). Já o composto AB, apresentou cinco ligações de hidrogênio com os resíduos Gly 49, Thr 51, Cys 57, Tyr 198 e Arg, além de dez interações estéricas com os resíduos Pro 336, Ile 339, Val 53, Cys 52, Ser 14, Asp 327, Met 333, Thr 51, Tyr 198 e Cys 57. Foi registrado também a ocorrência de uma interação hidrofóbica com o aminoácido Val 53. Nessa enzima não ocorreram interações semelhantes entre o composto teste e o controle positivo.

**Figura 19** - Interações 2D e 3D entre o composto teste, a AB e a proteína Di-hidro-orotato Desidrogenase



Legenda: As ligações de hidrogênio são destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa; e as interações estéricas são destacadas em vermelho.

**Figura 20** - Interações 2D e 3D entre o composto teste, a AB e a enzima Tripanotiona Redutase



*Legenda: As interações hidrofóbicas são destacadas em rosa, as interações estéricas são destacadas em vermelho; e as ligações de hidrogênio são destacadas em verde.*

## 5.8 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

A estabilidade do ligante é essencial em estudos de atividade farmacológica, pois este fator, por manter os compostos ligados ao sítio ativo, pode ser determinante tanto na potência quanto na eficácia (ZHANG; STEVENS; XU, 2015; TRIPATHI *et al.*, 2022). Dessa forma, foi realizada a simulação de dinâmica molecular para a tripanotiona redutase e para a di-hidro-orotato desidrogenase.

### 5.8.1 Tripanotiona redutase

Para a tripanotiona redutase, a análise da métrica RMSD da proteína (FIGURA 21A) revelou que os complexos relacionados à proteína (linha preta) e ao FERA1 (linha vermelha) apresentaram maior estabilidade do que o fármaco controle AB (linha verde); apresentando valores de RMSD muito menores. Várias flutuações também foram observadas no complexo referente à AB. Para FERA1, foi observado que após um período de 15 ns os valores de RMSD permaneceram constantes em 0,4 nm, permanecendo sem alteração ao longo do tempo total da simulação; denotando alta estabilidade. O complexo proteico apresentou flutuações entre 30 e 50 ns com valores de RMSD de até 0,55 nm, que retornaram a 0,4 nm após 55 ns. O fármaco controle AB foi significativamente mais instável após 50 ns, pois os valores atingiram 0,6 nm e permaneceram assim até o tempo total de 100 ns.

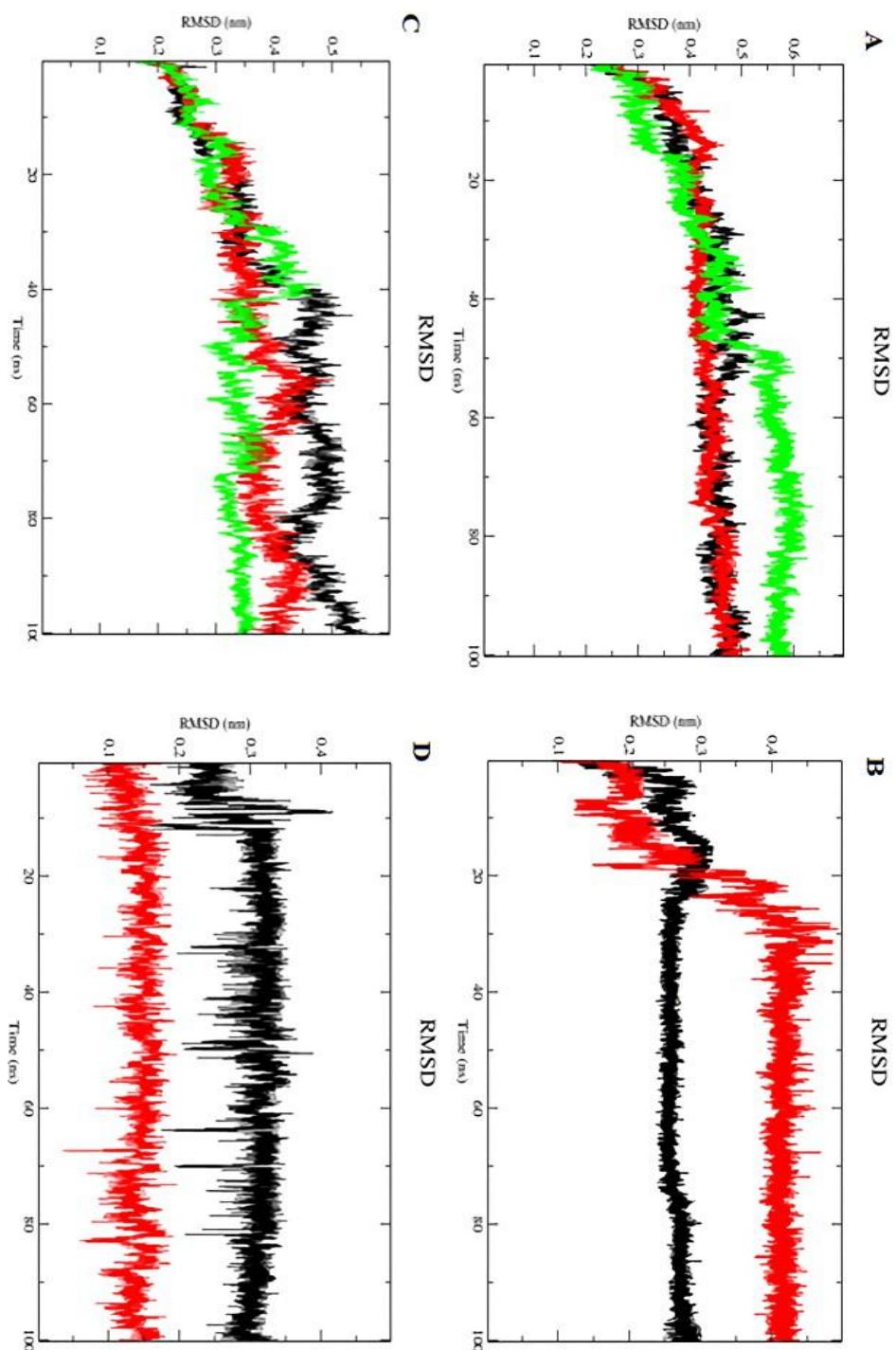
Ao analisar a estabilidade dos ligantes na presença de solventes (FIGURA 21B), verificou-se que o resultado corroborou os resultados de RMSD, uma vez que FERA1 (linha preta) apresentou valores de RMSD menores que o fármaco controle AB (linha vermelha), que foi significativamente mais instável.

Semelhante à AB, a FERA1 estabeleceu ligações fortes com o sítio ativo, tendendo a permanecer mesmo na presença de solventes, íons e outros fatores. A flexibilidade conformacional da enzima é necessária para a produção de certos efeitos, e as evidências sugerem que o dobramento e o desdobramento da enzima podem indicar uma perda de atividade enzimática que precede quaisquer mudanças marcantes na conformação da proteína

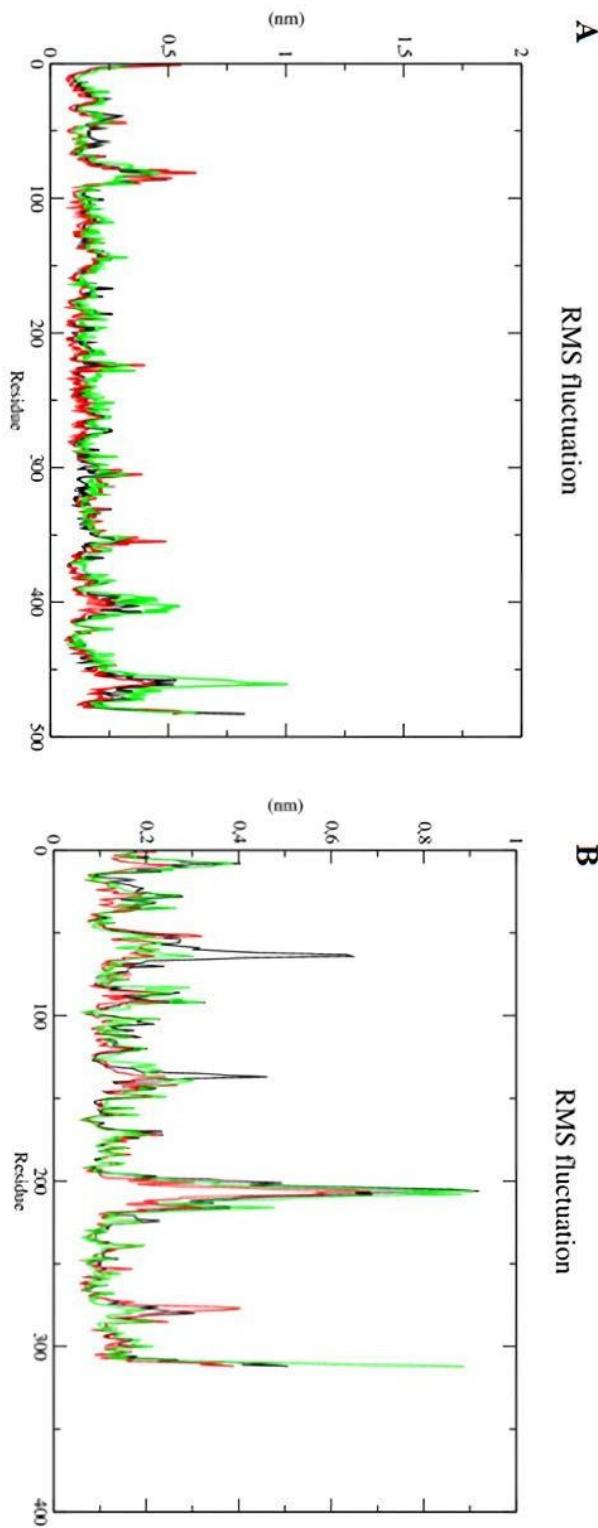
(YAN; SUN, 1997).

Para entender melhor a flexibilidade dos resíduos e aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional na enzima tripanotiona redutase, os RMSF de cada aminoácido na proteína foram calculados. Resíduos com altos valores de RMSF refletem mais flexibilidade e baixos valores de RMSF sugerem menos flexibilidade. Considerando que aminoácidos com flutuações acima de 0,3 nm contribuem para a flexibilidade da estrutura do canal, resíduos nas posições 1-2, 79, 81-87, 89, 305, 355, 458-462 e 480-483 (FIGURA 22A) contribuíram para a mudança conformacional e flexibilidade da proteína complexada.

**Figura 21** - RMSD de átomos de Ca. A) *Tripanotiona redutase* (preta), complexada com FERAI (vermelho) e AB (verde). B) FERAI (linha preta) e AB (linha vermelha). C) Di-hidro-orotato desidrogenase (preta), complexada com FERAI (vermelho) e AB (verde). D) FERAI (linha preta) e AB (linha vermelha)



**Figura 22** - RMSF de átomos. A) Enzima tripanotiona redutase (linha preta) complexada a FERA1 (linha vermelha) e AB (linha verde). B) Enzima Di-hidro-orotato desidrogenase (linha preta) complexada a FERA1 (linha vermelha) e AB (linha verde)



As energias de interação de Coulomb e Lennard-Jones (TABELA 9) dos complexos proteína-ligante com a tripanotiona redutase foram calculadas. De acordo com as métricas de Coulomb, FERA1 demonstrou maior estabilidade de interação com o sítio ativo devido a uma maior influência de interações eletrostáticas e de hidrogênio. No que diz respeito as métricas de Lennard-Jones, a AB de controle demonstrou maior estabilidade do que FERA1.

**Tabela 9** - Valores de energia de interação de Coulomb e Lennard-Jones para tripanotiona redutase

Energia	FERAI	Anfotericina B
Coulomb (C)	-172.534	-80.377
Lennard-Jones (LJ)	-171.133	-209.129

### 5.8.2 Di-hidro-orotato desidrogenase

Para a di-hidro-orotato desidrogenase, de acordo com a métrica RMSD da proteína (FIGURA 21C), a maior instabilidade observada nos três complexos analisados refletiu a ocorrência de um maior número de flutuações. O controle AB (linha verde) apresentou a maior estabilidade, com menores valores de RMSD. FERA1 (linha vermelha) apresentou valores de RMSD de 0,5 nm e flutuações durante os períodos em 50 e 90 ns.

Ao analisar a estabilidade dos ligantes na presença de solventes (FIGURA 21D), foi encontrado que FERA1 (linha preta) foi significativamente mais instável do que AB (linha vermelha). FERA1 apresentou valores de RMSD de 0,4 nm, enquanto a AB apresentou valores de 0,18 nm.

Para avaliar a flexibilidade dos resíduos e aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional na di-hidro-orotato desidrogenase, o RMSF de cada aminoácido na proteína foi calculado. Foi observado que resíduos nas posições 201, 204-209, 216 e 310-312 contribuem para a mudança conformacional da proteína complexada com FERA1 (FIGURA 22B).

As energias de interação de Coulomb e Lennard-Jones (TABELA 10) dos complexos proteína-ligante foram calculadas. FERA1 demonstrou maior estabilidade de interação com o sítio ativo por meio de cálculos de energia

de Lennard-Jonnes, o que denota uma maior influência das interações de van der Waals. De acordo com as métricas de Coulomb, o controle de AB demonstrou maior estabilidade do que FERAI.

**Tabela 10** - Valores de energia de interação de Coulomb e Lennard-Jonnes para Di-hidro-orotato desidrogenase

Energia	FERAI	Anfotericina B
Coulomb (C)	-58.6761	-83.475
Lennard-Jonnes (LJ)	-158.865	-126.96

### 5.9 PRODUÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (NLCs)

Os doze NLCs foram produzidos durante os testes de pré-formulação com a variação de diversos parâmetros no objetivo de encontrar uma formulação com tamanho de partícula reduzido, homogênea e estável, em que a substância de interesse fosse posteriormente encapsulada. A maior parte das formulações exibiram aparência macroscópica branco-leitosa e reflexo azulado, indicativos de dispersões homogêneas em escala nanométrica. O diâmetro hidrodinâmico variou entre 101,3 e 1973 nm, com Pdl de 0,09 a 1 e potenciais zeta superiores a -20| mV (TABELA 11).

**Tabela 11** - Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta encontrados para as formulações produzidas usando Lipoid® S100 (1%) como surfactante lipofílico

NLC	MCT®	Precirol®	Pluronic®	Tamanho (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
1	1	1	1	113,5±0,8	0,38±0,02	-20,4±0,3
2	2	1	1	101,3±0,9	0,19±0,01	-24,4±0,9
3	5	1	1	101,9±2,0	0,27±0,01	-29,7±0,1
4	3	3	1	420,2±6,3	0,37±0,02	-29,5±0,8
5	6	3	1	316,5±1,2	0,17±0,49	-24,2±0,2
6	10	3	1	1368,3±137,4	0,53±0,07	-23,0±0,9
7	1	1	3	186,7±3,8	0,56±0,02	-24,7±0,8
8	2	1	3	750,7±158,1	1,00±0,00	-22,2±1,1
9	5	1	3	245,9±9,3	0,27±0,02	-27,0±0,2
10	6	3	3	1654,3±329	0,43±0,20	-21,7±0,4

O tamanho de partícula é uma das propriedades físico-químicas mais críticas no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, influenciando diretamente sua estabilidade, biodisponibilidade, liberação controlada e interações biológicas (ISLAM *et al.*, 2025). Em geral, partículas de até 200 nm são preferidas para aplicações biomédicas, pois apresentam maior área de superfície específica, melhor penetração em tecidos biológicos e maior eficiência de internalização celular. Além disso, partículas menores tendem a evitar a rápida depuração pelo sistema mononuclear fagocítico, aumentando o tempo de circulação sistêmica (ZHANG, 2020).

A homogeneidade do sistema é outro parâmetro essencial, comumente avaliado pelo índice de polidispersão (Pdl), o qual quantifica a distribuição dos tamanhos das partículas em uma dispersão. Valores inferiores a 0,3 são geralmente indicativos de uma distribuição estreita e sistemas homogêneos, os quais favorecem a liberação controlada dos fármacos e a estabilidade cinética, reduzindo fenômenos de agregação ou

sedimentação indesejados (DANAEI *et al.*, 2018).

A estabilidade eletrostática, por sua vez, é frequentemente avaliada pelo potencial zeta, que reflete a magnitude da repulsão eletrostática entre partículas em suspensão. Valores absolutos de potencial zeta superiores em módulo são tradicionalmente associados a sistemas estáveis, nos quais a repulsão entre partículas é suficiente para prevenir a agregação. Sistemas instáveis, com potenciais zeta próximos de zero, tendem a apresentar crescimento de partículas, floculação e perda de propriedades desejadas ao longo do tempo (WILAR *et al.*, 2024).

Quando analisados os resultados de caracterização das formulações, percebe-se um aumento progressivo no tamanho médio das partículas com o aumento das concentrações de MCT e Precirol®, tendo o NLC 6 atingido  $1368,3 \pm 137,4$  nm e o NLC 10  $1654,3 \pm 329$  nm. Concentrações elevadas de Pluronic® F-68 também tenderam a aumentar o tamanho das partículas, mesmo que de forma menor, tendo o NLC 8 atingido um tamanho médio de  $750,7 \pm 158,1$  nm. Esses comportamentos podem ser atribuídos a diversos fatores físico-químicos relacionados às propriedades individuais de cada componente e suas interações durante o processo de emulsificação e solidificação. O MCT, por exemplo, ao ser incorporado em maiores proporções, pode levar à formação de núcleos lipídicos mais volumosos e menos estáveis, resultando em partículas de maior tamanho, em que não há concentração de tensoativo suficiente para estabilizar o sistema (UCHÔA<sub>b</sub> *et al.*, 2025).

A elevação da concentração de Precirol® também tende a aumentar a viscosidade da fase lipídica fundida, dificultando a dispersão eficiente durante a emulsificação. Isso pode resultar na formação de partículas maiores devido à menor eficiência na quebra das partículas lipídicas, como visto também por Abdullah *et al.* (2024), em que partículas maiores foram produzidas em concentrações elevadas de lipídio sólido. Além disso, o aumento do conteúdo de lipídio sólido pode levar a uma cristalização mais pronunciada, influenciando negativamente a uniformidade e o tamanho das partículas.

Embora o Pluronic® F-68 também aja como surfactante, promovendo a estabilização das partículas, suas concentrações elevadas podem levar a um aumento na viscosidade da fase aquosa, visto sua estrutura polimérica. Essa elevação na viscosidade pode reduzir a eficiência da emulsificação, resultando em partículas maiores. Além disso, concentrações mais altas de Pluronic® podem ter promovido a formação de agregados, contribuindo para o aumento do tamanho das partículas.

Em relação ao Pdl, observou-se que o aumento das concentrações dos componentes também levou a uma maior heterogeneidade no sistema, como nos casos dos NLCs 6 e 10 ( $0,53\pm0,07$  e  $0,43\pm0,20$ , respectivamente). Isso sugere uma distribuição de tamanhos de partículas mais ampla, possivelmente devido à formação de agregados ou à presença de partículas de diferentes tamanhos resultantes de uma emulsificação menos eficiente. Quanto ao potencial zeta, todos os sistemas mantiveram valores altos, acima de  $-20,4\pm0,3$  mV, indicando uma certa estabilidade eletrostática, ou seja, o aumento das concentrações dos componentes não apresentou uma correlação direta com alterações significativas nesse parâmetro.

Dessa forma, a escolha da formulação 2 foi baseada na sua propriedade de gerar partículas de tamanho reduzido ( $101,3\pm0,9$  nm), distribuição homogênea ( $0,19\pm0,01$ ) e potencial zeta dentro da faixa considerada ideal para estabilidade coloidal ( $-24,4\pm0,9$  mV). Esses atributos são fundamentais para assegurar o desempenho desejado do sistema nanoparticulado, tanto em termos de estabilidade físico-química quanto de eficácia biológica.

Após a escolha da formulação, foi realizada a incorporação do composto FERAI para avaliar seu impacto sobre a homogeneidade do sistema. Observou-se que a adição do ativo provocou apenas variações discretas nos parâmetros avaliados, com o tamanho médio aumentando para  $116,63\pm2,52$  nm, o PDI levemente elevando-se para  $0,23\pm0,005$  e o potencial zeta permanecendo praticamente inalterado em  $-24\pm0,5$  mV. Essas alterações sutis indicam que a introdução do FERAI não comprometeu a integridade físico-química da formulação.

## 5.10 TESTE DE CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DE FERAI-NANO

Buscando avaliar se a forma nanoparticulada de FERAI resultaria em uma redução da citotoxicidade e uma maior potência inibitória da *L. braziliensis*, foram realizados os mesmos testes inicialmente avaliados na FERAI, em FERAI-NANO, e os resultados foram comparados.

Os resultados apresentados na TABELA 12 demonstram que a FERAI-NANO exibiu um perfil de baixa citotoxicidade em macrófagos murinos J774, com valores de CC<sub>50</sub> superiores a 50 µM, de forma similar a FERAI livre. Esses resultados demonstram relevância clínica, uma vez que as moléculas avaliadas exibem maior seletividade contra as formas parasitárias de *L. braziliensis*, com baixa citotoxicidade em células hospedeiras de mamíferos.

A FERAI apresentou uma CE<sub>50</sub> de 14,08 ± 0,5 µM contra promastigotas, enquanto a FERAI-NANO mostrou uma atividade superior com CE<sub>50</sub> de 12,25 ± 0,12 µM, o que equivale a uma potência de 1,15 vezes da FERAI-NANO em comparação com a FERAI livre. No que diz respeito ao IS, os valores foram superiores a 5, indicando um bom potencial terapêutico.

Os resultados apresentados, quando comparados com a AB, utilizada como controle positivo, mostra que apesar da AB apresentar atividade antiparasitária (CE<sub>50</sub> = 0,32 ± 0,01 µM), ela possui uma citotoxicidade significativamente maior (CC<sub>50</sub> = 3,6 ± 0,50 µM) que as formas livre e nanoparticulada da FERAI (CC<sub>50</sub> = >50 µM), o que reforça os desafios encontrados associados ao seu uso clínico, como efeitos colaterais e toxicidade sistêmica. A violeta de genciana, por sua vez, mostrou-se altamente citotóxico (CC<sub>50</sub> = 0,7 ± 0,09 µM), confirmando sua utilização como droga citotóxica de referência.

**Tabela 12** - Avaliação da citotoxicidade ( $CC_{50}$ ), metade da concentração máxima efetiva para 50% das formas promastigotas ( $CE_{50}$ ) e Índice de Seletividade (IS) das chalconas

Composto	$CC_{50} \pm D.P.$ Mφ J774 / $\mu M$	Promastigotas $CE_{50} \pm DP$ ( $\mu M$ )	IS promastigotas <i>L. braziliensis</i>
<b>FERAI</b>	>50	14,08 $\pm$ 0,5	6,8
<b>FERAI-NANO</b>	>50	12,25 $\pm$ 0,12	5,8
AB	3,6 $\pm$ 0,50	0,32 $\pm$ 0,01	11,25
VG	0,7 $\pm$ 0,09	ND	ND

Legenda: valores calculados a partir de dois experimentos independentes. DP: desvio padrão.

AB: anfotericina B. VG: violeta de genciana.

A eficácia da FERAI-NANO em comparação à FERAI livre pode ser explicada pelas vantagens as quais o processo de nanoformulação fornece às substâncias candidatas a novos fármacos. Dentre elas, pode-se destacar: maior solubilidade, liberação controlada e maior penetração celular.

Estudos recentes têm demonstrado que nanoformulações de compostos antileishmania podem melhorar significativamente sua atividade biológica. Exemplo disso foi a nanoformulação de um produto natural, o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*, que apresentou uma redução a 0% da viabilidade de *Leishmania tropica* e *Leishmania major* na concentração de 2560  $\mu g/mL$  (GHANBARIASAD *et al.*, 2021). Além disso, trabalhos como o de Coelho *et al.* (2020), destacam que um sistema de liberação de nanoemulsão contendo chalconas sintéticas contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, foi considerado um veículo mais conveniente para a administração das chalconas, com propriedade para inibir o crescimento

parasitário com maior eficiência do que suas formas livres quando testados *in vitro* contra amastigotas de *L. amazonensis*. Em conjunto, esses achados sugerem que eles são candidatos potenciais, especialmente a 3'-(trifluorometil)-chalcona, para o desenvolvimento de novos fármacos antileishmania.

Uma hipótese que possa fundamentar a maior atividade da FERAII-NANO contra promastigotas em relação à FERAII livre é que a nanoformulação pode estar facilitando a interação do composto com o parasito, possivelmente através de uma maior internalização mediada por macrófagos. Alguns estudos demonstram que nanopartículas são preferencialmente internalizadas por células fagocíticas, aumentando a concentração local do fármaco em sítios de infecção (COLINO; LANAÖ; GUTIERREZ-MILAN, 2020; ALMEIDA *et al.*, 2021; MORENO-MENDIETA *et al.*, 2022).

Esse processo, denominado fagocitose, geralmente está associado à captação de partículas grandes. Contudo, diversos estudos já relataram a fagocitose de partículas nanométricas, tais como ouro, prata e nanopartículas poliméricos. Uma vez administrado no corpo humano, as nanopartículas são dispersas em um fluido fisiológico, como mucosa, fluido linfático ou sangue, em que irão interagir com diferentes proteínas que serão adsorvidas em sua superfície, gerando a chamada "coroa proteica". As opsoninas, que são imunoglobulinas e proteínas do complemento presentes na coroa proteica, passam a ser reconhecidas por receptores opsônicos (FcR) e receptores do complemento, resultando na internalização da nanopartícula. Além desses, há também a expressão de receptores não opsônicos (por exemplo, receptores de manose) nos fagócitos, que possuem a capacidade de interagir diretamente com os grupos moleculares na superfície das nanopartículas (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012; KUHN *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2021).

Um outro aspecto que pode ser observado nos nossos resultados, é a menor variabilidade nos dados de CE<sub>50</sub> da FERAII-NANO (DP = 0,12 µM) em comparação à FERAII livre (DP = 0,5 µM), o que indica uma maior reproduzibilidade, o que é crucial para o desenvolvimento de formulações

farmacêuticas padronizadas.

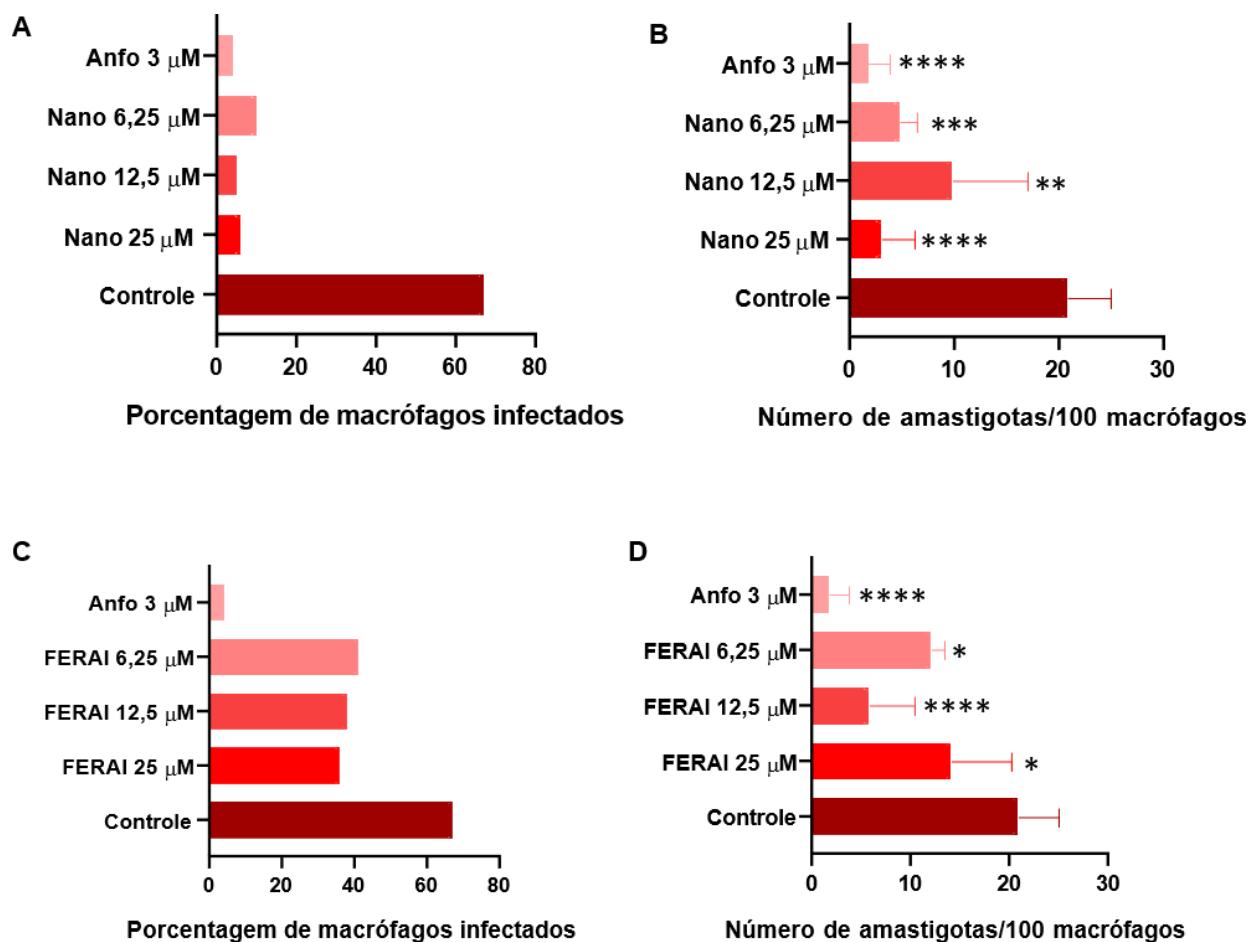
### **5.11 INFECÇÃO *in vitro* DE MACRÓFAGOS MURINOS E TRATAMENTO COM FERAI-NANO**

A FIGURA 23 apresenta os efeitos da FERAI e da FERAI-NANO em macrófagos infectados com *L. braziliensis*, avaliando tanto a porcentagem de células infectadas (A e C) tanto como o número de parasitos intracelulares por 100 macrófagos (B e D) após 96 h de tratamento.

No ensaio de percentual de macrófagos infectados, a FERAI-NANO mostrou uma redução dessas células infectadas de forma significativa ( $p < 0,05$ ) de forma não dependente de concentração da substância utilizada, ou seja, todas as concentrações apresentaram um efeito inibitório similar, sendo constatado a partir das porcentagens de inibição de aproximadamente 58%, 62% e 61%, correspondente as concentrações 6,25; 12,5; e 25, respectivamente, quando comparado ao grupo controle positivo (FIGURA 23A). O mesmo ocorreu com a FERAI na sua forma livre (FIGURA 23C) com os valores de inibição de aproximadamente 25%, 29% e 31% para as concentrações 6,25; 12,5; e 25, respectivamente. Além disso, a FERAI-NANO na concentração de 12,5 inibiu com potência similar a anfotericina B (63%), o que não ocorreu para a FERAI na forma livre que obteve uma eficácia inferior.

Na avaliação do número de parasitos intracelulares, o tratamento com FERAI-NANO reduziu o número de parasitos de 21 (grupo controle) para aproximadamente 5, 10 e 3 parasitos nas concentrações de 6,25; 12,5; e 25, respectivamente. Já a FERAI mostrou eficácia moderada, com aproximadamente 12, 6 e 14 parasitos nas mesmas concentrações, respectivamente. A análise comparativa demonstrou que a formulação nanoparticulada foi significativamente mais eficaz em todas as concentrações testadas.

**Figura 23 - Efeito da FERAI e da sua forma nanoparticulada contra parasitos intracelulares de *L. braziliensis***



Legenda: o percentual de macrófagos infectados (A e C) e o número de parasitos intracelulares por 100 macrófagos (B e D) foram determinados após 96h de tratamento. Os resultados são representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . A anfotericina B foi utilizada como fármaco de referência.

Os resultados demonstram que a nanoformulação agiu potencializando a atividade antileishmania da chalcona FERAI, com melhora significativa na eficácia em todas as concentrações, sendo similar ao efeito da anfotericina B, nos quesitos testados. Este achado corrobora com os estudos já publicados e citados anteriormente, que demonstram os benefícios da nanoencapsulação na atividade de compostos antileishmania (COLINO; LANAQ; GUTIERREZ-MILAN, 2020; ALMEIDA *et al.*, 2021; MORENO-MENDIETA *et al.*, 2022).

Os efeitos de redução de percentual de macrófagos infectados e do número de parasitos intracelulares apresentados pela FERAI-NANO parece

não depender das concentrações utilizadas, o que pode decorrer de mecanismos farmacocinéticos melhorados, como uma maior internalização celular e liberação sustentada do princípio ativo. Como discutido no tópico anterior, as nanopartículas são preferencialmente internalizadas por macrófagos através do processo de endocitose mediada por receptores (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012; KUHN *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2021), o que pode explicar que doses mais baixas de FERAI-NANO já possuem efeito superior à de FERAI livre. O perfil farmacocinético melhorado pode resultar em uma liberação sustentada da chalcona de dentro do material nanoparticulado, o que mantém concentrações terapêuticas por períodos prolongados, potencializando o efeito antileishmania. Tudo isso também pode estar somado a uma maior estabilidade da formulação, atribuindo proteção à chalcona contra degradação enzimática. Dessa forma, a FERAI-NANO se apresenta como um importante composto a ser tratado em mais estudos posteriores que corroborem com a hipótese de que a FERAI pode ser uma possível alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose.

## 6. CONCLUSÕES

- Os quatro compostos testados não apresentaram citotoxicidade significativa em comparação com a AB;
- Dos compostos testados, FERA1 apresentou a maior potência contra promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*, e também reduziu tanto a porcentagem de macrófagos infectados por *Leishmania*, quanto o número de parasitos intracelulares *in vitro*;
- Os resultados do teste de ROS indicaram que o composto possivelmente atua aumentando os níveis de ROS no parasito e isso pode ser um dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antileishmania de FERA1;
- O encaixe molecular revelou que FERA1 interage com UDP-glicosil pirofosforilase, com inibição mais forte e mais potente de di-hidro-orotato desidrogenase e tripanotiona redutase;
- A tripanotiona redutase, um possível alvo para FERA1 em *L. braziliensis* apresentou RMSD mais estável e energias de interação de Coulomb e Lennard-Jones também;
- A formulação nanoparticulada de FERA1 apresentou baixa citotoxicidade e maior potência contra formas de promastigotas de *L. braziliensis*, também reduziu a infecção e o número de amastigotas em macrófagos murinos;
- Os resultados indicam que FERA1 é um candidato promissor para o desenvolvimento de novos fármacos antileishmania, combinando seletividade, um mecanismo de ação multifatorial e a possibilidade de otimização por nanoencapsulação. Estudos adicionais poderão avaliar sua eficácia em modelos *in vivo*, bem como possíveis sinergias com drogas já estabelecidas.

## Referências

- ABADÍAS-GRANADO, I.; DIAGO, A.; CERRO, P. A.; PALMA-RUIZ, A. M.; GILABERTE, Y. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 112, n. 7, 2021.
- ABDULLAH, Y.; GUO, Z.; SONG, Y.; CAO, J.; XIAO. Impact of cocoa butter and medium chain triglycerides ratios on processing stability, supersaturation, and digestive properties of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers. **LWT**, v. 197, 2024.
- ABRAHAM, M. J.; MURTOLE, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1, n. 19, 2015.
- ADINEHBEIGI, K.; JALALI, M. H. R.; SHAHRIARI, A.; BAHRAMI, S. *In vitro* antileishmanial activity of fisetin flavonoid via inhibition of glutathione biosynthesis and arginase activity in *Leishmania infantum*. **Pathogens and Global Health**, v. 111, n. 4, 2017.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 233, p. 80-86, 2021.
- AL-KAMEL, M. A. Stigmata in cutaneous Leishmaniasis: Historical and new evidence-based concepts. **Our Dermatol Online**, v. 8, n. 1, p. 81-90, 2017.
- AL-KHIKANI, F. H.; AL-JANABI, A. A. Topical amphotericin B formulas: Promising new application. **International Journal of Medical Science and Current Research**, v. 2, n. 4, p. 187-96, 2019.
- ALMEIDA, M. S.; SUSNIK, E.; DRASLER, B.; TALADRIZ-BLANCO, P.; PETRI-FINK, A.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B. Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, v. 50, p. 5397-5434, 2021.
- ALONSO, L.; MENEGATTI, R.; GOMES, R. S.; DORTA, M. L.; LUZIN, R. M.; LIÃO, L. M.; ALONSO, A. Antileishmanial activity of the chalcone derivative LQFM064 associated with reduced fluidity in the parasite membrane as assessed by EPR spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 151, 2020.
- ALSEEKH, S.; SOUZA, L. P.; BENINA, M.; FERNIE, A. R. The style and

- substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. **Phytochemistry**, v. 174, 2020.
- ALTI, D.; RAO, M. V.; RAO, D. N.; MAURYA, R.; KALANGI, S. K. Gold–Silver Bimetallic Nanoparticles Reduced with Herbal Leaf Extracts Induce ROS-Mediated Death in Both Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania donovani*. **ACS Omega**, v. 5, n. 26, 2020.
- ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. An overview of biopolymer nanostructures for encapsulation of food ingredients. **Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes**, v. 1, p. 1-35, 2019.
- AXMEDOVICH, M. F.; SAMADOVNA, S. G.; OBIDOVICH, S. S. Observation of immunological changes during clinical cycles of skin leishmaniosis. **ACADEMICIA: An International Multidisciplinary Research Journal**, v. 11, n. 5, p. 618-622, 2021.
- BAILEY, F.; MONDRAGON-SHEM, K.; HOTEZ, P.; RUIZ-POSTIGO, J. A.; AL-SALEM, W.; ACOSTA-SERRANO, A.; MOLYNEUX, D. H. A new perspective on cutaneous leishmaniasis – Implications for global prevalence and burden of diseases estimates. **Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, 2017.
- BALLART, C.; TORRICO, M. C.; VIDAL, G.; TORRICO, F.; LOZANO, D.; GALLEGOS, M.; PINTO, L.; ROJAS, E.; AGUILAR, R.; DOBAÑO, C.; ARES-GOMEZ, S.; PICADO, A. Clinical and immunological characteristics of tegumentary leishmaniasis cases in Bolivia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, 2021.
- BEACH, M. A.; NAYANATHARA, U.; GAO, Y.; ZHANG, C.; XIONG, Y.; WANG, Y.; SUCH, G. K. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. **Chemical Reviews**, v. 124, n. 9, p. 5505-5616, 2024.
- BERMAN, J. Liposomal Amphotericin B Treatment and the Leishmaniases. **Am J Trop Med Hyg**, v. 101, n. 4, p. 727–728, 2019.
- BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T. F.; WILLIAMS, G. J.; MEYER, E. F. J.; BRICE, M. D.; RODGERS, J. R.; KENNARD, O.; SHIMANOUCHI, T.; TASUMI, M. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 112, p. 535-542, 1997.
- BONDI, A. Van der Waals Volumes and Radii. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 68, p. 441, 1964.
- BRAGA, S. S. Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of

- drug repurposing. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, p. 111660, 2019.
- 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.
- BRITO, R. C. F.; AGUIAR-SOARES, R. D. D. O.; CARDOSO, J. M. D. O.; COUR-A-VITAL, W.; ROATT, B. M.; REIS, A. B. Recent Advances and New Strategies in Leishmaniasis Diagnosis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 104, p. 8105–8116, 2020.
- BRUGGEMANN, R. J.; JENSEN, G. M.; LASS-FLÖRL, C. Liposomal amphotericin B—the past. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 2, 2022.
- BULTÉ, D.; BOCKSTAL, v. L.; DIRKX, L.; KERKHOF, V. D. M.; DE TREZ, C.; TIMMERMANS, J. P.; HENDRICKX, S.; MAES, L.; CALJON, C. Miltefosine enhances infectivity of a miltefosine-resistant *Leishmania infantum* strain by attenuating its innate immune recognition. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 7, 2021.
- BURZA, S.; CROFT, S.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 392, p. 951–970, 2018.
- CALDERON-ANYOSA, R.; GALVEZ-PETZOLDT, C.; GARCIA, P. J.; CARCAMO, C. P. Housing characteristics and leishmaniasis: A systematic review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 6, p. 1547–1554, 2018.
- CAMPOS, K. R.; COLEMAN, P. J.; ÁLVAREZ, J. C.; DREHER, S. D.; GARBACCIO, R. M.; TERRETT, N. K.; TILLYER, R. D.; TRUPPO, M. D.; PARMEE, E. E. R. The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. **Science**, v. 363, n. 6424, 2019.
- CARSTENS-KASS, J.; PAULINI, K.; LYPACZEWSKI, P.; MATLASHEWSKI, G. A review of the leishmanin skin test: A neglected test for a neglected disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 7, p. e0009531, 2021.
- CARVALHO, R. C.; PEREIRA, C. R.; BARÇANTE, T. A.; DE CASTRO, J. C.; ALVARENGA, I. M.; DE SÁ PEREIRA, J. P.; VIEIRA, L. C.; CHEREM, J.; BARÇANTE, J. M. P. Leishmaniose: doenças negligenciadas também pelos profissionais de saúde. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA**

**LATINOAMERICANA**, v. 21, n. 12, p. 24165-24189, 2023.

CECÍLIO, P.; SILVA, A. C.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Informações básicas sobre os vetores da *leishmania* e suas interações com parasitas

*Leishmania. Communications biology*, v. 5, n. 1, p. 305, 2022.

CHALLAPA-MAMANI, M. R.; TOMÁS-ALVARADO, E.; ESPINOZA-BAIGORRIA, A.; LEÓN-FIGUEROA, D. A.; SAH, R.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; BARBOZA, J. J. Molecular docking and molecular dynamics simulations in related to *leishmania donovani*: An update and literature review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 10, p. 457, 2023.

CHARLTON, N. C.; MASTYUGIN, M.; TOROK, B.; TOROK, M. Structural Features of Small Molecule Antioxidants and Strategic Modifications to Improve Potential Bioactivity. **Molecules**, v. 28, n. 3, 2023.

CHEN, S. Biosynthesis of natural products from medicinal plants: Challenges, progress and prospects. **Chineses Herbal Medicines**, v. 16, n. 1, p. 1-2, 2024.

COELHO, D.; VELEIRINHO, B.; MAZZARINO, L.; ALBERTI, T.; BUZANELLO, E.; OLIVEIRA, R. E.; YUNES, R. A.; MORAES, M.; STEINDEL, M.; MARASCHIN, M. Polyvinyl alcohol-based electrospun matrix as a delivery system for nanoemulsion containing chalcone against *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2020.

COFFENG, L. E.; RUTTE, E. A. L.; MUÑOZ, J.; ADAMS, E. R.; PRADA, J. M.; VLAS, S. J.; MEDLEY, G. F. Impact of changes in detection effort on control of visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 5, 2020.

COLINO, C. I.; LANA, J. M.; GUTIERREZ-MILLAN, C. Targeting of Hepatic Macrophages by Therapeutic Nanoparticles. **Front. Immunol.**, v. 11, 2020.

COSTA, C. A.; LOPES, R. M.; FERRAZ, L. S.; ESTEVES, G. N. N.; DI IORIO, J. F.; SOUZA, A. A.; DE OLIVEIRA, I. M.; MANARIN, F.; JUDICE, W. A. S.; STEFANI, H. A.; RODRIGUES, T. Cytotoxicity of 4-substituted quinoline derivatives: Anticancer and antileishmanial potential. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 115511, 2020.

COSTA, M. S.; GONÇALVES, Y. G.; TEIXEIRA, S. C.; NUNES, D. C. O.; LOPES, D. S.; SILVA, C. V.; SILVA, M. S.; BORGES, B. C.; SILVA, M. J. B.; RODRIGUES, R. S.; RODRIGUES, V. M.; POELHSITZ, G. V.; YONEYAMA, K. A. G. Increased ROS generation causes apoptosis-like death: Mechanistic

- insights into the anti-*Leishmania* activity of a potent ruthenium(II) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 195, p. 1-12, 2019.
- COSTA, N. T. C.; PEREIRA, A. M. S.; SILVA, C. C.; SOUZA, E. O.; OLIVEIRA, B. C.; FERREIRA, L. F. G. R.; HERNANDES, M. Z.; PEREIRA, V. R. A. Exploring Bioinformatics Solutions for Improved Leishmaniasis Diagnostic Tools: A Review. **Molecules**, v. 29, n. 22, p. 5259, 2024.
- CRUZ, J. H. A.; MOREIRA, I. C. S.; ALVES, M. F. V.; OLIVEIRA, H. M. B. F.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; ALVES, M. A. S. G. Análise da atividade farmacológica e toxicológica do monoterpeno relacionado à odontologia: estudos *in silico*. **Archives of Health Investigation**, v. 8, n. 11, p. 674-680, 2019.
- DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; DAVARANI, F. H.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 57, 2018.
- DAOUAD, N. E.; BORAH, P.; DEB, P. K.; VENUGOPALA, K. N.; HOURANI, W.; ALZWEIRI, M.; BARDAAWEEL, S. K.; TIWARI, V. ADMET Profiling in Drug Discovery and Development: Perspectives of *In Silico*, *In Vitro* and Integrated Approaches. **Current Drug Metabolism**, v. 22, n. 7, 2021.
- DEVEOGLU, O.; KARADAG, R. A Review on the Flavonoids – A Dye Source. **International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences**, v. 31, n. 3, p. 188-200, 2019.
- DÍAZ, Y. M. Z.; AMBROGGIO, E. E.; FANANI, M. L. Miltefosine inhibits the membrane remodeling caused by phospholipase action by changing membrane physical properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1862, n. 10, 2020.
- DIXIT, K. K.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Advancement in molecular diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. **Indian journal of dermatology**, v. 65, n. 6, p. 465-472, 2020.
- DUARTE, J. L.; MOTA, L. J. T.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica das folhas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Ipê Amarelo). **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 4, p. 33-43, 2014.
- ESCALONA-MONTAÑO, A. R.; ZUÑIGA-FABIAN, M.; CABRERA, N.; MONDRAGÓN-FLORES, R.; GÓMEZ-SANDOVAL, J. N.; ROJAS-BERNABÉ,

- A.; GONZÁLEZ-CANTO, A.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L.; PÉREZ-MONTFORT, RUY.; BECKER, I.; AGUIRRE-GARCÍA, M. M. Protein Serine/Threonine Phosphatase Type 2C of *Leishmania mexicana*. **Original Research**, v. 11, 2021.
- ESCRIVANI, D. O.; CHARLTON, R. L.; CARUSO, M. B.; BURLE-CALDAS, G. A.; BORSODI, M. P. G.; ZINGALI, R. B.; ARRUDA-COSTA, N.; PAMEIRA-MELLO, M. V.; JESUS, J. B.; SOUZA, A. M. T.; ABRAHIM-VIEIRA, B.; FREITAG-POHL, S.; POHL, E.; STEEL, P. G. Chalcones identify cTXNPx as a potential antileishmanial drug target. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 11, 2021.
- EZZAT, A.; WU, M.; LI, X.; KWON, C. Computational prediction of drug–target interactions using chemogenomic approaches: an empirical survey. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1337-1357, 2019.
- FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular *docking*. **Quant. Biol.**, v. 7, n. 83, 2019.
- FANTECELLE, C. H., et al. Senescence-related genes are associated with the immunopathology signature of American tegumentary leishmaniasis lesions and may predict progression to mucosal leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, 2024.
- FERRARI, C. K. B. Oxidative Stress and Antioxidants in Host Defense in Leishmaniasis. **Oxidative Stress in Microbial Diseases**, p. 245-256, 2019.
- FIOCRUZ<sub>a</sub>. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Leishmaniose. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/doenca/leishmaniose>>. Acesso em: 09 de Agosto de 2024.
- FIOCRUZ<sub>b</sub>. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>. Acesso em: 12 de agosto de 2024.
- FLANNAGAN, R. S.; JAUMOUILLÉ, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. **Annu Rev Pathol**, v. 7, p. 61-98, 2012.
- FLOWJO. Version 10.6.1; Becton, Dickinson and Company, Ashland, OR, USA, 2017.
- FONSECA-SILVA, F.; INÁCIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive oxygen species production and

- mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**, v. 6, p. 1–7, 2011.
- FREIRE, M. L, RÊGO, F. D.; COTA, G.; PASCOAL-XAVIER, M. A.; OLIVEIRA, E. Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review. **PLOS ONE**, 2021.
- FRÉZARD, F.; AGUIAR, M. M. G.; FERREIRA, L. A. M.; RAMOS, G. S.; SANTOS, T. T.; BORGES, G. S. M.; VALLEJOS, V. M. R.; MORAIS, H. L. O. Liposomal Amphotericin B for Treatment of Leishmaniasis: From the Identification of Critical Physicochemical Attributes to the Design of Effective Topical and Oral Formulations. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, 2022.
- FU, Y.; ZHAO, J.; CHEN, Z. Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular *Docking* and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, 2018.
- GAO, M.; SKOLNICK, J. A novel sequence alignment algorithm based on deep learning of the protein folding code. **Bioinformatics**, v. 37, n. 4, p. 490-496, 2021.
- GARCIA, A. R.; OLIVEIRA, D. M. P.; JESUS, J. B.; SOUZA, A. M. T.; SODERO, A. C. R.; VERMELHO, A. B.; LEAL, I. C. R.; SOUZA, R. O. M. A.; MIRANDA, L. S. M.; PINHEIRO, A. S.; RODRIGUES, I. A. Identification of Chalcone Derivatives as Inhibitors of *Leishmania infantum* Arginase and Promising Antileishmanial Agents. **Frontiers Chemistry**, v. 8, 2021.
- GARRIDO-JAREÑO, M.; SAHUQUILLO-TORRALBA, A.; CHOUMAN-ARCAS, R.; CASTRO-HERNÁNDEZ, I.; MOLINA-MORENO, J. M.; LLAVADOR-ROS, M.; GÓMEZ-RUIZ, M. D.; LÓPEZ-HONTANGAS, J. L.; BOTELLA-ESTRADA, R.; SALAVERT-LLETI, M.; PEMÁN-GARCÍA, J. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: experience of a Mediterranean hospital. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 24, 2020.
- GHANBARIASAD, A.; VALIZADEH, A.; GHADIMI, S. N.; FEREIDOUNI, Z.; OSANLOO, M. Nanoformulating *Cinnamomum zeylanicum* essential oil with an extreme effect on *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, 2021.
- GHATEE, M. A.; TAYLOR, W. R.; KARAMIAN, M. The Geographical Distribution of Cutaneous Leishmaniasis Causative Agents in Iran and Its

- Neighboring Countries, A Review. **Front. Public Health**, v. 8, 2020.
- GOMES, A. N. P.; CAMARA, C. A.; SOUSA, A. S.; SANTOS, F. A. R.; SANTANA FILHO, P. C.; DORNELES, G. P.; ROMÃO, P. R. T.; SILVA, T. M. S. Chemical composition of bee pollen and leishmanicidal activity of *Rhusflavone*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, p. 176-183, 2021.
- GOEL, R. K.; SINGH, D.; LAGUNIN, A.; POROIKOV, V. PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, p. 1509-1914, 2010.
- GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. **N. Engl. J. Med.**, v. 295, p. 765-770, 1976.
- GROLL, A. H.; RIJNDERS, B. J. A.; WALSH, T. J.; ADLER-MOORE, J.; LEWIS, R. E.; BRÜGGERMANN, R. J. M. Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety and Efficacy of Liposomal Amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 4, p. S260–S274, 2019.
- GROMACS, version 2.1; Sphinx&Alabaster, Netherlands, 2022.
- GUEDES, C. E. S.; DIAS, B. R. S.; PETERSEN, A. L. D. O. A. *In vitro* evaluation of the anti-leishmanial activity and toxicity of PK11195. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 4, 2018.
- GUERY, R., et al. Clinical diversity and treatment results in Tegumentary Leishmaniasis: A European clinical report in 459 patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, 2021.
- GULIY, O. I.; FOMIN, A. S.; ZHNICHKOVA, E. G.; KOZLOV, S. V.; STAROVEROV, S. A.; DYKMAN, L. A. Polymeric micelles for targeted drug delivery systems. In *Pharmaceutical Nanobiotechnology for Targeted Therapy*. Cham: **Springer International Publishing**, p. 521-559, 2022.
- HAN, X. Y.; LI, H. B.; WEI, J. H.; XU, X. Y.; LI, Y.; CHE, Y. Q. Serological characteristics and clinical implications of IgG subclasses in visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 29, n. 2, p. 152-160, 2024.
- HARDY, K. Paleomedicine and the use of plant secondary compounds in the Paleolithic and Early Neolithic. **Evolutionary Anthropology**, v. 28, n. 2, 2021.
- HATAMI, Hossein et al. Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis in the Population Covered by Shahid Beheshti University of Medical Sciences in Iran from 2011 to 2021. **International Journal of Infection**, v. 9, n. 4, 2022.

- HERNANDÉZ-RIVERA, J. L.; ESPINOZA-HICKS, J. C.; CHACÓN-VARGAS, K. F.; CARRILLO-CAMPOS, J.; SÁNCHEZ-TORRES, L. E.; CAMACHO-DÁVILA, A. A. Synthesis, characterization and evaluation of prenylated chalcones ethers as promising antileishmanial compounds. **Molecular Diversity**, v. 27, p. 2073-2092, 2023.
- HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P.; BAQUERO, L. P.; LARROTA, H. R. Chapter 14 - Flavonoids: Potential Therapeutic Agents by Their Antioxidant Capacity. **Bioactive Compounds, Health Benefits and Potential Applications**, p. 265-288, 2019.
- HERNANDÉZ-VELÁZQUEZ, E. D.; ALBA-BETANCOURT, C.; ALONSO-CASTRO, A. J.; ORTIZ-ALVARADO, R.; LÓPEZ, J. A.; MEZA-CARMEN, V.; SOLORIO-ALVARADO, C. R. Metformin, a biological and synthetic overview. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 86, 2023.
- HU, Y.; HAMMARLUND-UDENAES, M.; FRIDÉN, M. Understanding the Influence of Nanocarrier-Mediated Brain Delivery on Therapeutic Performance Through Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 10, p. 3425-3433, 2019.
- HU, Y.; HU, C.; PAN, G.; YU, C.; ANSARI, M. F.; BHEEMANABOIANA, R. R. Y.; CHENG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, J. Novel chalcone-conjugated, multi-flexible end-group coumarin thiazole hybrids as potential antibacterial repressors against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 222, 2021.
- HUSNAIN, A.; RASOOL, S.; SAEED, A.; HUSSAIN, H. K. Revolutionizing Pharmaceutical Research: Harnessing Machine Learning for A Paradigm Shift in Drug Discovery. **International Journal of Multidisciplinary Sciences and Arts**, v. 2, n. 2, 2023.
- IKEOGU, N. M.; AKALUKA, G. N.; EDECHI, C. A.; SALAKO, E. S.; ONYI, n. LAGHA, C.; BARAZANDEH, A. F.; UZONNA, J. E. *Leishmania* immunity: advancing immunotherapy and vaccine development. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1201, 2020.
- ISLAM, S.; AHMED, M. M. S.; ISLAM, M. A.; HOSSAIN, N.; CHOWDHURY, M. A. Advances in Nanoparticles in Targeted Drug Delivery- A Review. **Results in Surfaces and Interfaces**, 100529, 2025.
- JAIN, S.; SAHU, U.; KUMAR, A.; KHARE, P. Metabolic pathways of *Leishmania*

- parasite: Source of pertinent drug targets and potent drug candidates. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p. 1590, 2022.
- JITAREANU, A.; TATARINGA, G.; ZBANCIOC, A. M.; TRIFAN, A. Bromination-A versatile tool for drugs optimization. **The Medical-Surgical Journal**, v. 122, n. 3, 2018.
- KALANI, M.; SHAMS, S. R.; NAMDARNIA, S.; CHOOPANIZADEH, M.; JAMSHIDI, J.; MORAVEJ, A. Interleykine-22 gene variants are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, 2021.
- KARAK, P. BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FLAVONOIDS: AN OVERVIEW. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 4, p. 1567-1574, 2019.
- KARAMI, M.; GORGANI-FIROUZJAEE, T.; CHEHRAZI, M. Prevalence of cutaneous Leishmaniasis in the Middle East: a systematic review and meta-analysis. **Pathogens**, v. 117, n. 4, 2023.
- KONG, L.; JU, F.; ZHENG, W.; ZHU, J.; SUN, S.; XU, J.; BU, D. ProALIGN: Directly learning alignments for protein structure prediction via exploiting context-specific alignment motifs. **Journal of Computational Biology**, 2022.
- KOSTOVA, I. Special Issue: “Rational Design and Synthesis of Bioactive Molecules”. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 18, 2024.
- KOVACEVIC, N.; BECIRAGIC, D.; CAUSEVIC, M. Acetylsalicylic Acid (Aspirin): Past, Present, and Future. **Sarajevo Medical Journal**, v. 1, n. 2, 2024.
- KUHN, D. A.; VANHECKE, D.; MICHEN, B.; BLANK, F.; GEHR, P.; PETRI-FINK, A.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. **Beilstein J Nanotechnol**, v. 24, n. 5, p. 1625-36, 2014.
- KUMARI, D.; MAHAJAN, S.; KOUR, P.; SINGH, K. Virulence factors of *Leishmania* parasite: Their paramount importance in unraveling novel vaccine candidates and therapeutic targets. **Life Sciences**, v. 306, 2022.
- LABBÉ, F., et al. Genomic analysis of two phlebotomine sand fly vectors of *Leishmania* from the New and Old World. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, 2023.
- LAGO, J.; SILVA, J. A.; BORJA, L.; FRAGA, D. B. M.; SCHRIEFFR, A.; ARRUDA, S.; LAGO, E.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. Clinical and histopathologic features of canine tegumentary leishmaniasis and the molecular

characterization of *Leishmania braziliensis* in dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2019.

LAI, X.; WANG, X.; HU, Y.; SU, S.; LI, W.; LI, S. Editorial: Network Pharmacology and Traditional Medicine. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, 2010.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LAZAR, L. T. Y.; ABASS, K. S. Morphology, life cycle, pathogenesis and virulence factors of genus *Leishmania*: A review. **Plant Archives**, v. 20, n. 2, p. 4057-4060, 2020.

LEE, B. J.; WEYERS, M.; HAYNES, R. K.; KOOY, F. V. D. Discovery of artemisinin in *Artemisia annua*, its current production, and relevance to sub-Saharan Africa. **South African Journal of Botany**, v. 153, p. 21-27, 2023.

LEITE, F. F.; RODRIGUES, L. C.; OLIVEIRA, B. H. M.; DUARTE, G. D.; FERREIRA, M. D. L.; SOUSA, N. F.; VANDERLEY, S. E. R.; CARDOSO, L. L.; KEESEN, T. S. L.; ARAÚJO, R. S. A.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; MENDONÇA-JÚNIOR, F. J. B. *In vitro* and *in silico* evaluation of the anti-leishmania activity of synthetic chalcones. **Natural Product Research**, 2024.

LIU, Y.; QIAN, J.; LI, J.; XING, M.; GRIERSON, D.; CHONGDE, S.; XU, C.; LI, X.; CHEN, K. Hydroxylation decoration patterns of flavonoids in horticultural crops: chemistry, bioactivity, and biosynthesis. **Horticulture Research**, v. 9, 2022.

LIN, X.; LI, X.; LIN, X. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1375, 2023.

LOGGE, R.; DESCOTEAUX, A. Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. **Eur. J. Immunol.**, v. 36, p. 2735-2744, 2006.

LOURENÇO, E. M. G.; DI IÓRIO, J. F.; SILVA, F.; FIALHO, F. L. B.; MONTEIRO, M. M.; BEATRIZ, A.; PERDOMO, R. T.; BARBOSA, E. G.; OSES, J. P.; ARRUDA, C. C. P.; JÚDICE, W. A. S.; RAFIQUE, J.; LIMA, E. P.

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.

LOURENÇO, E. M. G.; SILVA, F.; NEVES, A. R.; BONFÁ, I. S.; FERREIRA, A. M. T.; MENEZES, A. C. G.; SILVA, M. E. C.; SANTOS, J. T.; MARTINES, M. A.; PERDOMO, M. T.; TOFFOLI-KADRI, M. C.; BARBOSA, E. G.; SABA, S.; BEATRIZ, A.; RAFIQUE, J.; ARRUDA, C. C. P.; LIMA, D. P. Investigation of the Potential Targets behind the Promising and Highly Selective Antileishmanial Action of Synthetic Flavonoid Derivatives. **ACS Infectious Diseases**, v. 9, n. 10, 2023.

LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDALL, W. B.; BAKKER, P. I.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins**, v. 50, n. 3, p. 437-450, 2003. MACHADO, P. R. L.; LAGO, A.; CARDOSO, T. M.; MAGALHÃES, A.; CARVALHO, L. P.; LAGO, T.; CARVALHO, A. M.; COSTA, R.; CARVALHO, E. M. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 30, n. 3, p. 510-518, 2024.

MACHADO, P. R. L.; PRATES, F. V.; BOAVENTURA, V.; LAGO, T.; GUIMARÃES, L. H.; SCHRIEFER, A.; CORTE, T. W. F.; PENNA, G.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. MACHADO. A double-blind, randomized trial to evaluate miltefosine and topical granulocyte macrophage colony-stimulating factor in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 7, p. e2465-e2469, 2021.

MAHMOD, A. I.; OQAL, M.; KHALID, A. M.; AFIFI, F. U.; TALIB, W. H. Phytochemical analysis, antioxidant, and antitumor activity of *Ligustrum ovalifolium* leaves grown in Jordan: an *in vitro* and *in vivo* study. **Pharmacia**, v. 71, p. 1-10, 2024.

MAIA, M. S.; SILVA, J. P. R.; NUNES, T. A. L.; SOUSA, J. M. S.; RODRIGUES, G. C. S.; MONTEIRO, A. F. M.; TAVARES, J. F.; RODRIGUES, A. F.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T. Virtual Screening and the *In Vitro* Assessment of the Antileishmanial Activity of Lignans. **Molecules**, v. 25, p. 2281, 2020.

MAJOLO, F.; DELWING, L. K. O. B.; MARMITT, D. J.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; GOETTERT, M. I. Medicinal plants and bioactive natural compounds for

- cancer treatment: Important advances for drug discovery. **Phytochemistry Letters**, v. 31, p. 196-207, 2019.
- MANIMARAN, V.; NIVETHA, R. P.; TAMILANBAN, T.; NARAYANAN, J.; VETRISELVAN, S.; FULORIA, N. K.; CHINNI, S. V.; SEKAR, M.; FULORIA, S.; WONG, L. S.; BISWAS, A.; RAMACHAWOLRAN, G.; SELVARAJ, S. Nanogels as novel drug nanocarriers for CNS drug delivery. **Front. Mol. Biosci.**, v. 10, 2023.
- MANNAN, S. B., et al. Prevalence and associated factors of asymptomatic leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **Parasitology international**, v. 81, p. 102229, 2021.
- MAURÍCIO, I. L. *Leishmania* Taxonomy. **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**, p. 15-30, 2018.
- MASTACHI-LOZA, S.; RAMÍREZ-CANDELERO, T. I.; BENÍTEZ-PUEBLA, L. J.; FUENTES-BENITES, A.; GONZALEZ-ROMERO, C.; VÁZQUEZ, M. A. Chalcones, a Privileged Scaffold: Highly Versatile Molecules in [4+2] Cycloadditions. **Chemistry an Asian Journal**, v. 17, n. 20, 2022.
- MAZIRE, P. H.; SAHA, B.; ROY, A. Immunotherapy for visceral leishmaniasis: A trapeze of balancing counteractive forces. **International immunopharmacology**, v. 110, p. 108969, 2022.
- MEIRA, C. S.; SANTO, R. F. E.; SANTOS, T. B.; ORGE, I. D.; SILVA, D. K. C.; GUIMARÃES, E. T.; SOARES, M. B. P. Betulinic acid derivative BA5, a dual NF- $\kappa$ B/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity. **European Journal of Pharmacology**, 2017.
- MELLO, T. F. P.; BITENCOURT, H. R.; PEDROSO, R. B.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 27-34, 2014.
- METWALY, A. M.; GHONEIM, M. M.; EISSA, I. H.; ESEHEMY, I. A.; MOSTAFA, A. E.; HEGAZY, M. M.; AFIFI, W. M.; DOU, D. Traditional ancient Egyptian medicine: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 10, 2021.
- MILINCIC, D. D.; POPOVIC, D. A.; LEVIC, S. M.; KOSTIC, A. Z.; TESIC, Z. L.; NEDOVIC, Z. A.; PESIC, M. B. Application of Polyphenol-Loaded Nanoparticles in Food Industry. **Nanomaterials**, v. 9, n. 11, 2019.

- MIRANDA-SAPLA, M. M.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; ASSOLINI, J. P.; CARLOTO, A. C. M.; BORTOLETI, B. T. S.; GONÇALVES, M. D.; TAVARES, E. R.; RODRIGUES, J. H. S.; SIMÃO, A. N. C.; YAMAUCHI, L. M.; NAKAMURA, C. V.; VERRI JR, W. A.; COSTA, I. N.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R. *trans*-chalcone modulates *Leishmania amazonensis* infection *in vitro* by Nrf2 overexpression affecting iron availability. **European Journal of Pharmacology**, v. 853, p. 275-288, 2019.
- MONTANER-ANGOITI, E.; LLOBAT, L. Is leishmaniasis the new emerging zoonosis in the world? **Veterinary Research Communications**, v. 47, p. 1777-1799, 2023.
- MONTEIRO, P. Q.; SCHAEFFER, E.; SILVA, A. J. M.; ALVES, C. R.; SOUZA-SILVA, F. A Virtual Screening Approach to Evaluate the Multitarget Potential of a Chalcone Library with Binding Properties to Oligopeptidase B and Cysteine Proteinase B from *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 26, n. 5, 2025.
- MORENO-MENDIETA, S.; GUÍLLEN, D.; VASQUEZ-MARTÍNEZ, N.; HERNANDÉZ-PANDO, R.; SÁNCHEZ, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R. Understanding the Phagocytosis of Particles: the Key for Rational Design of Vaccines and Therapeutics. **Pharmaceutical Research**, v. 39, p. 1823-1849, 2022.
- MOTA, W. J. S.; GUEDES, B. N.; JAIN, S.; CARDOSO, J. C.; SEVERINO, P.; SOUTO, E B. Classical and innovative drugs for the treatment of *Leishmania* infections. **Discover Public Health**, v. 21, n. 122, 2024.
- MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose tegumentar. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt>. Acesso em: 10 de agosto de 2024.
- MULE, S. N.; SAAD, J. S.; FERNANDES, L. R.; STOLF, B. S.; CORTEZ, M.; PALMISANO, G. Protein glycosylation in *Leishmania* spp. **Mol. Omics**, 16, 407-424, 2020.
- NACHBAGAUER, R.; FESER, J.; NAFICY, A.; BERNSTEIN, D. I.; GUPTILL, J.; WALTER, E. B.; BERLANDA-SCORZA, F.; STADLBAUER, D.; WILSON, P. C.; AYDILLO, T. A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial. **Nature Medicine**, v. 27, n. 106, 2021.

- NAFARI, A.; CHERAGHIPOUR, K.; SEPAHVAND, M.; SHAHROKHI, G.; GABAL, E.; MAHMOUDVAND, H. Nanoparticles: New agents toward treatment of leishmaniasis. **Parasite epidemiology and control**, v. 10, p. e00156, 2020.
- NARDELLA, F.; GALLÉ, J. B.; BOURJOT, M.; WENIGER, B.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavonoids. **Natural Antimicrobial Agents**, p. 163-194, 2018.
- NEVES, M. A.; NASCIMENTO, J. R.; MACIEL-SILVA, V. L.; SANTOS, A. M.; JUNIOR, J. J. G. V.; COELHO, A. J. S.; LIMA, M. I. S.; PEREIRA, S. R. F.; ROCHA, C. Q. Anti-*Leishmania* activity and molecular docking of unusual flavonoids-rich fraction from *Arrabidaea brachypoda* (Bignoniaceae). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 259, 2024.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, 2020.
- OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmaniose. 2024. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose#:~:text=Quatro%20pa%C3%ADs%20concentram%2068%25%20dos,%2C%20Sud%C3%A3o%2C%20Brasil%20e%20Qu%C3%A1nia>>. Acesso em 23 de agosto de 2024.
- OPREA, T. I. Chemoinformatics in drug discovery. **Weinheim: Wiley-VCH**, p. 493, 2005.
- ORTALLI, M.; ILARI, A.; COLOTTI, G.; IONNA, I. D.; BATTISTA, T.; BISI, A.; GOBBI, S.; RAMPA, A.; MARTINO, R. M. C. D.; GENTILOMI, G. A.; VARANI, S.; BELLUTI, F. Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 152, p. 527-541, 2018.
- OSMAN, M. S.; AWAD, T. A.; SHANTIER, S. W.; GARENALBI, E. A.; OSMAN, W.; MOTHANA, R. A.; NASR, F. A.; ELHAG, R. I. Identification of some chalcone analogues as potential antileishmanial agents: an integrated *in vitro* and *in silico* evaluation. **Arabian Journal of Chemistry**, 2022.
- PAGNIEZ, J.; PETITDIDIER, E.; PARRA-ZULETA, O.; PISSARRA, J.; BRAS-GONÇALVES, R. A systematic review of peptide-based serological tests for the diagnosis of leishmaniasis. **Parasite**, v. 30, 2023.
- PAL, R.; TELI, G.; AKHTAR, M. J.; MATADA, G. S. P. The role of natural anti-

- parasitic guided development of synthetic drugs for leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 258, 2023.
- PASS filter online, version 2.0; Way2Drug; Moscow, Russia, 2011.
- PASSOS, C. L. A.; FERREIRA, C.; SOARES, D. C.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal effect of synthetic trans-resveratrol analogs. **PLoS one**, v. 10, 2015.
- PATIL, M.; MURUMKAR, C. The Classes and Biosynthesis of Flavonoids. **Flavonoids as nutraceuticals**, p. 19, 1<sup>a</sup> ed., 2023.
- PATINO, L. H.; IMAMURA, H.; CRUZ-SAAVEDRA, L.; PAVIA, P.; MUSKUS, C.; MÉNDEZ, C.; DUJARDIN, J. C.; RAMÍREZ, J. D. Major changes in chromosomal somy, gene expression and gene dosage driven by SbIII in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 9485, 2019.
- PENA, H. P.; BELO, V. S.; XAVIER-JÚNIOR, J. C. C.; TEIXEIRA-NETO, R. G.; MELO, S. N.; PEREIRA, D. A.; FONTES, I. C.; SANTOS, I. M.; LOPES, V. V.; TAFURI, W. L.; ROMERO, G. A. S.; SILVA, E. S. Accuracy of diagnostic tests for American tegumentary leishmaniasis: a systematic literature review with meta-analyses. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 10, 2020.
- PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; MENG, E. C.; COUCH, G. S.; CROLL, T. I.; MORRIS, J. H.; FERRIN, T. E. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, 2021.
- PHAM, J. V.; YILMA, M. A.; FELIZ, A.; MAJID, M. T.; MAFFETONE, N.; WALKER, J. R.; KIM, E.; CHO, H. J.; REYNOLDS, J. M.; SONG, M. C.; PARK, S. R.; YOON, Y. J. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**, 2019.
- PINHO, A. C. B.; WIŚNIEWSKI, J. R.; DIAS-LOPES, G.; SABOIA-VAHIA, L.; CUPOLILLO, E.; JESUS, J. B.; ALMEIDA, R. P.; PADRÓN, G.; MENNA-BARRETO, R.; CUERVO, P.; Nitric Oxide Resistance in *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* Involves Regulation of Glucose Consumption, Glutathione Metabolism and Abundance of Pentose Phosphate Pathway Enzymes. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, 2022.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

- PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J.; BARRETT, M. P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOLOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 12, 2017.
- PRASAD, R. D.; CHARMOKE, N.; SHRIVASTAV, O. P.; PRASAD, S. R.; MOGHE, A.; SAMANT, A.; SARVALKAR, P. D.; PRASAD, N. R. A Review on Concept of Nanotechnology in Veterinary Medicine. **ES Food & Agroforestry**, v. 4, 2021.
- RAJ, S.; SASIDHARAN, S.; BALAJI, S. N.; DUBEY, V. K.; SAUDAGAR, R. Review on natural products as an alternative to contemporany anti-leishmanial therapeutics. **Journal of Proteins and Proteomics**, v. 11, p. 135-158, 2020.
- REZAEI, A.; FATHI, M.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, v. 88, p. 146-162, 2019.
- RIBEIRO, L. R.; SILVA, S. N.; SALIBA, M. F.; CARVALHO, J. P.; COTA, G. Safety profile of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **PloS one**, v. 19, n. 12, 2024.
- RIEZK, A.; BOCXLAER, K. V.; YARDLEY, V.; MURDAN, S.; CROFT, S. L. Activity of amphotericin B-loaded chitosan nanoparticles against experimental cutaneous leishmaniasis. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 4002, 2020.
- ROATT, B. M.; CARDOSO, J. M. O.; BRITO, R. C. F.; COURAS-VITAL, W.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, A. B. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 8965-8977, 2020.
- ROCHA, V. P. C.; ROCHA, C. Q.; QUEIROZ, E. F.; MARCOURT, L.; VILEGAS, W.; GRIMADI, G. B.; FURRER, P.; ALLÉMANN, E.; WOLFENDER, J. L.; SOARES, M. B. P. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. **Molecules**, v. 24, n. 1, 2019.
- RODRIGUES, M. G. M.; VIANA, J. A.; BASTOS, E. G. P. Epidemiological analysis of cases of visceral and human tegumentary leishmaniosis in the state of Tocantins in the years of 2009 to 2019. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, 2021.
- RODRÍGUEZ-VEGA, A.; LOSADA-BARRAGÁN, M.; BERBERT, L. R.;

- MESQUITA-RODRIGUES, C.; BOMBAÇA, A. C. S.; MENNA-BARRETO, R.; AQUINO, P.; CARVALHO, P. C.; PADRÓN, G.; JESUS, J. B.; CUERVO, P. Quantitative analysis of proteins secreted by *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains associated to distinct clinical manifestations of American Tegumentary Leishmaniasis. **Journal of Proteomics**, v. 232, 2021.
- ROY, A.; KHAN, A.; AHMAD, I.; ALGHAMDI, S.; RAJAB, B. S.; BABALGHITH, A. O.; ALSHAHRANI, M. Y.; ISLAM, S.; ISLAM, S. R. Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications. **BioMed Research International**, 2022.
- RUDRAPAL, M.; KHAN, J.; DUKHYIL, A. A. B.; ALAROUSY, R. M. I. I.; ATTAH, E. I.; SHARMA, T.; KHAINAR, S. J.; BENDALE, A. R. Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. **Molecules**, v. 26, n. 23, 2021.
- RUGANI, J. N.; GONTIJO, C. M. F.; FRÉZARD, F.; SOARES, R. P.; MONTE-NETO, R. L. Antimony resistance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates from atypical lesions associates with increased ARM56/ARM58 transcripts and reduced drug uptake. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.
- RUIZ-POSTIGO, J. A.; JAIN, S. Chapter 13 Pentavalent antimonials in the treatment of human leishmaniasis. **Antimony**, 2021.
- SADYBEKOV, A. V.; KATRITCH, V. Computational approaches streamlining drug discovery. **Nature**, v. 616, p. 673-685, 2023.
- SAFE, S.; JAYARAMAN, A.; CHAPKIN, R. S.; HOWARD, M.; MOHANKUMAR, K.; SHRESTHA, R. Flavonoids: structure–function and mechanisms of action and opportunities for drug development. **Toxicological Research**, v. 37, p. 147–162, 2021.
- SAGGAR, S.; MIR, P. A.; KUMAR, N.; CHAWLA, A.; UPPAL, J.; SHILPA; KAUR, A. Traditional and Herbal Medicines: Opportunities and Challenges. **Pharmacognosy Research**, v. 14, n. 2, 2022.
- SAHA, D.; JHA, A. N. Computational multi-target approach to target essential enzymes of *Leishmania donovani* using comparative molecular dynamic simulations and MMPBSA analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 34, n. 7, 2023.
- SALEHI, B.; QUISPE, C.; CHAMKHI, I.; OMARI, N. E.; BALAHBIB, A.; SHARIFI-RAD, J.; BOUYAHYA, A.; AKRAM, M.; IQBAL, M.; DOCEA, A. O.;

- CARUNTU, C.; LEYVA-GÓMEZ, G.; DEY, A.; MARTORELL, M.; CALINA, D.; LOPEZ, V.; LES, F. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. **Frontiers in Pharmacology**, 2021.
- SAMOTA, M. K.; YADAV, D. K.; KOLI, P.; KAUR, M.; KAUR, M.; RANI, H.; SELVAN, S. S.; MAHALA, P.; TRIPATHI, K.; KUMAR, S. Exploring natural chalcones: innovative extraction techniques, bioactivities, and health potential. **Sustainable Food Technol.**, v. 2, p. 1456-1468, 2024.
- SAMPAOLESI, S.; NICOTRA, F.; RUSSO, L. Glycans in Nanomedicine, Impact and Perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, 2019.
- SANGENITO, L. S.; DA SILVA SANTOS, V.; D'AVILA-LEVY, C. M.; BRANQUINHA, M. H.; SOUZA DOS SANTOS, A. L.; DE OLIVEIRA, S. S. Leishmaniasis and Chagas disease—neglected tropical diseases: treatment updates. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 174-177, 2019.
- SANTANA<sub>a</sub>, M. B. R.; MIRANDA, G. O.; CARVALHO, L. P. ATP-binding cassette transporters and drug resistance in cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 151, 2025.
- SANTANA<sub>b</sub>, N. S.; SIQUEIRA, L. B. O.; NASCIMENTO, T.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; MATOS, A. P. S.; RICCI-JUNIOR, E. Nanoparticles for the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 25, n. 2, p. 24, 2023.
- SANTIAGO-SILVA, K. M.; BORTOLETI, B. T. S.; OLIVEIRA, L. N.; MAIA, F. L. A.; CASTRO, J. C.; COSTA, I. C.; LAZARIN, D. B.; WARDELL, J. L.; WARDELL, S. M. S. V.; ALBUQUERQUE, M. G.; LIMA, C. H. S.; PAVANELLI, W. R.; BISPO, M. L. F.; GONÇALVES, R. S. B. Antileishmanial activity of 4,8-Dimethoxynaphthalenyl chalcones on *Leishmania amazonensis*. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, 2022.
- SANTOS, R. F. D.; SILVA, T.; BRITO, A. C. D. S.; INÁCIO, J. D.; VENTURA, B. D.; MENDES, M. A. P.; AZEVEDO, B. F.; SIQUEIRA, L. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E.; DUTRA, P. M. L.; SILVA, S. A. G. Therapeutic effect of oral quercetin in hamsters infected with *Leishmania Viannia braziliensis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2023.
- SCHREIFER, A. L. F.; SOUZA, R. S.; GUIMARÃES, L. H.; GÓES-NETO, A.;

- SCHREIFER, A. Papel do parasito e do hospedeiro na expressão clínica das leishmanioses. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 139, n. 1, 2005.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581, 2016.
- SCOTTI, M. T.; HERRERA-ACEVEDO, C.; MENEZES, R.; MARTIN, H. J.; MURATOV, E.; SILVA, Á. Í. D. S.; ALBUQUERQUE, E. F.; CALADO, L. F.; COY-BARRERA, E.; SCOTTI, L. MolPredictX: Online Biological Activity Predictions by Machine Learning Models. **Molecular Informatics**, v. 41, n. 12, 2022.
- SHARIFI-RAD, J.; QUISPE, C.; PATRA, J. K.; SINGH, Y. D.; PANDA, M. K.; DAS, G.; ADETUNJI, C. O.; MICHAEL, O. S.; SYTAR, O.; POLITO, L.; ZIVKOVIC, J.; CRUZ-MARTINS, N.; KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M.; EKIERT, H.; CHOUDHARY, M. I.; AIATOLÁ, S. A.; TYNYBEKOV, B.; KOBARFARD, F.; MUNTEANA, A. C.; GROZEA, I.; DAŞTAN, S. D.; BUTNARIU, M.; SZOPA, A.; CALINA, D. Paclitaxel: Application in Modern Oncology and Nanomedicine-Based Cancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2021.
- SHI, Y.; ZHANG, C.; LI, X. Traditional Medicine in India. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 8, p. 51-55, 2021.
- SHIZARDI, M. R. Lipsosomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 10, 2019.
- SILVA, R. P.; VAITKEVICIUS-ANTÃO, V.; DE ANDRADE, T. A. S.; DE OLIVEIRA SILVA, A. C.; DE OLIVEIRA, G. A.; TRAJANO-SILVA, L. A. M.; NAKASONE, E. K. N.; PAIVA-CAVALCANTI, M. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental parasitology**, v. 199, p. 9-16, 2019.
- SIVAKUMAR, K. C.; HAIXIAO, J.; NAMAN, C. B.; SAJEEVAN, T. P. Prospects of multitarget drug designing strategies by linking molecular docking and molecular dynamics to explore the protein–ligand recognition process. **Drug Development Research**, v. 81, n. 6, 2020.
- SOUSA-BATISTA, A. J.; ARRUDA-COSTA, N.; ESCRIVANI, D. O.; REYNAUD, F.; AÇO, P. G.; ROSSI-BERGMANN, B. Single-dose treatment for cutaneous leishmaniasis with an easily synthesized chalcone entrapped in polymeric

- microparticles. **Parasitology**, v. 147, n. 9, 2020.
- SOUSA-BATISTA, A. J.; ARRUDA-COSTA, N.; PACIENZA-LIMA, W.; CARVALHO-GONDIM, F.; SANTOS, R. F.; DA-SILVA, S. A. G.; RÉ, M. I.; ROSSI-BERGMANN, B. *In Vivo* Safety and Efficacy of Chalcone-Loaded Microparticles with Modified Polymeric Matrix against Cutaneous Leishmaniasis. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 51, 2023.
- SOUZA, P. S.; BIBÁ, G. C. C.; MELO, E. D. N.; MUZITANO, M. F. Chalcones against the hallmarks of cancer: a mini-review. **Natural Product Research**, v. 36, n. 18, 2022.
- STAFFEN, I. V.; BANHUK, F. W.; TEMIOTTO-PELISSIER, F.; BORTOLETI, B. T. S.; PAVANELLI, W. R.; AYALA, T. S.; MENOLLI, R. A. Chalcone-rich extracts from *Lonchocarpus cultratus* roots present *in vitro* leishmanicidal and immunomodulatory activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 74, n. 1, p. 77-87, 2022.
- STEBUT, E. V. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**, p. 191-202, 2015.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Liposomal Amphotericin B and Leishmaniasis: Dose and Response. **J Glob Infect Dis.**, v. 2, n. 2, p. 159-166, 2010.
- SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H.; FISCHER, C.; JUNGE, K.; BRYCESON, A.; BERMAN, J. Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, n. 28, 2002.
- SUNTER, J. D.; MOREIRA-LEITE, F.; GULL, K. Dependency relationships between IFT-dependent flagellum elongation and cell morphogenesis in *Leishmania*. **Open Biol.**, v. 8, n. 11, 2018.
- SURABHI, S.; SINGH, B. COMPUTER AIDED DRUG DESIGN: AN OVERVIEW. **Journal of Drug Delivery Therapeutics**, v. 8, n. 5, 2018.
- TAO, J.; JIA, W. Leishmania. **Molecular Medical Microbiology**. Chapter 154, p. 3061-3068, 2024.
- THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, 2006.
- TIWARI, P. C.; PAL, R.; CHAUDHARY, M. J.; NATH, R. Artificial intelligence

revolutionizing drug development: Exploring opportunities and challenges. **Drug Development Research**, v. 84, p. 1652-1663, 2023.

TOLOSA, L.; DONATO, M. T.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. **Methods in Molecular Biology**; Springer: New York, p. 333, 2014.

TRIPATHI, L. K.; NAILWAL, T. K. Leishmaniasis: an overview of evolution, classification, distribution, and historical aspects of parasite and its vector. **Phatogenesis, Treatment and Prevention of Leishmaniasis**, p. 1-25, 2021.

TRIPATHI, M. K.; AHMAD, S.; TYAGI, R.; DAHIYA, V.; YADAV, M. K. Fundamentals of molecular modeling in drug design. In **Computer Aided Drug Design (CADD): From Ligand Based Methods to Structure-Based Approaches**; Rudrapal, M.; Egbuna, C., eds.; Elsevier, 2022.

UCHÔA<sub>a</sub>, A.F.C.; FORMIGA, A.L.D.; ALVES, A.E.F.; CARDOSO, A.L.M.R.; PEREIRA, G.M.D.A.; CARVALHO, L.M.M.; DA SILVA, L.F.A.; PEREIRA, P.S.D.S.; DE SOUZA, P.H.O.; JALES, S.T.L.; SILVA, A. L.; SOUZA, R. R. M.; SOBRAL, M. V.; SILVA, M. S.; BARBOSA FILHO, J. M. XAVIER-JÚNIOR, F. H. Optimization and Functionalization of Copaiba Oil-Loaded Nanostructured Lipid Carriers to Improve Cytotoxicity against Breast Cancer Cells. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.**, v. 105, 2025.

UCHÔA<sub>b</sub>, A.F.C.; FORMIGA, A.L.D.; CARDOSO, A.L.M.R.; PEREIRA, G.M.D.A.; CARVALHO, L.M.M.; SOUZA, P.H.O.; SILVA, A. L.; SOUZA, R. R. M.; SOBRAL, M. V.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; XAVIER-JÚNIOR, F. H. Optimized and Functionalized Carvacrol-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Enhanced Cytotoxicity in Breast Cancer Cells. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 363, 2025.

VALENCIA, S.; QUIÑONES, W.; ROBLEDO, S.; MARÍN-LOAIZA, J. C.; DURANGO, D.; GIL, J. Antiparasitic Activity of Coumarin–Chalcone (3-Cinnamoyl-2H-Chromen-2-Ones) Hybrids. **Chemistry & Biodiversity**, 2024.

VALERO, N. N. H.; URIARTE, M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 119, p. 365-384. 2020.

WANG, S.; DONG, G.; SHENG, C. Structural Simplification of Natural Products. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 6, 2019.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F.T.; BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.;

- LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. 296-303, 2018.
- WHO. Leishmaniasis. World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 20 de julho de 2023.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 07 de Agosto de 2024.
- WHO. World Health Organization. Leishmaniasis situation and trends. Disponível em: <[https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/)>. Acesso em: 10 de janeiro de 2025.
- WILAR, G.; SUHANDI, C.; WATHONI, N.; FUKUNAGA, K.; KAWAHATA, I. Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems Enhance Treatment of Cognitive Defects. **Int J Nanomedicine**, v. 19, p. 11357–11378, 2024.
- YADAGIRI, G.; SINGH, A.; ARORA, K.; MUDAVATH, S. L. Immunotherapy and immunochemotherapy in combating visceral leishmaniasis. **Frontiers in Medicine**, v. 10, p. 1096458, 2023.
- YAN, B. X.; SUN, Y. Q. Glycine Residues Provide Flexibility for Enzyme Active Site. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 6, 1997.
- YANG, Z.; ELE, J.; HOU, T.; CAO, D. Application of Negative Design To Design a More Desirable Virtual Screening Library. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 9, 2020.
- YIN, Y.; ZHANG, X.; GAO, Z.; LIU, Y. The Research Progress of Chalcone Isomerase (CHI) in Plants. **Molecular Biotechnology**, v. 61, p. 32-52, 2019.
- YIZENGAW, E.; NIBRET, E. Effects of cutaneous leishmaniasis on patients' quality of life. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, n. 598, 2024.
- YU, W.; MACKERELL, A. D. In **Antibiotics Methods and Protocols**. SASS, P., ed.; Tübingen, Germany, p. 85, 2016.
- ZHANG, B.; JIN, Y.; ZHANG, L.; WANG, H.; WANG, X. Ninety years of pentamidine: The development and applications of pentamidine and its analogs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 26, 2022.
- ZHANG, H. Molecularly Imprinted Nanoparticles for Biomedical Applications. **Advanced Materials**, v. 32, 1806328, 2020.

- ZHANG, X.; STEVENS, R. C.; XU, F. The importance of ligands for G protein-coupled receptor stability. **Trends Biochem. Sci.**, v. 40, n. 2, 2015.
- ZHEOAT, A. M.; ALENEZI, S.; ELMAHALLAWY, E. K.; UNGOGO, M. A.; ALGHAMDI, A. H.; WATSON, D. G.; IGOLI, J. O.; GRAY, A. I.; KONING, H. P.; FERRO, V. A. Antitrypanosomal and antileishmanial activity of chalcones and flavonones from *Polygonum salicifolium*. **Pathogens**, v. 10, n. 2, 2021.

## ANEXOS

## Anexo 1 -

**Journal of  
the Brazilian  
Chemical  
Society**  
**Article**

**Computer-Aided Drug Design Studies in Association with *in vitro*  
Antileishmanial Tests for New Chalcones**

*Gleice R. da Silva,<sup>a</sup> Franciscnaira S. Santos,<sup>b,c</sup> Fernando F. Leite,<sup>a</sup> Chonny A. H. Acevedo,<sup>b,d</sup>  
Natália F. de Sousa,<sup>a</sup> Gabriela B. Grimaldi,<sup>b</sup> Milena B. P. Soares,<sup>b,c</sup> Elísalva T. Guimarães,<sup>b,c</sup>  
Marcus T. Scotti,<sup>b,d</sup> Luis Cezar Rodrigues,<sup>a</sup> Francisco J. B. Mendonça Júnior,<sup>a</sup> Eloísa H. Campana,<sup>a</sup>  
José M. Barbosa Filho,<sup>b,d</sup> Hemerson I. F. Guimarães,<sup>b,c,d</sup> and Felipe Q. S. Guerra<sup>b,c,d,e</sup>*

<sup>a</sup>*Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,  
Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil*

<sup>b</sup>*Laboratório de Histotécnica e Cultura Celular, Departamento de Ciências da Vida,  
Universidade do Estado da Bahia, 41150-000 Salvador-BA, Brazil*

<sup>c</sup>*Laboratório de Engenharia Teciudal e Imunofarmacologia, Instituto Gonçalo Moniz,  
Fundação Oswaldo Cruz, 40296-710 Salvador-BA, Brazil*

<sup>d</sup>*Instituto Senai de Inovação em Sistemas Avançados em Saúde, SENAI/CIMATEC,  
41650-010 Salvador-BA, Brazil*

<sup>e</sup>*Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos,  
Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil*

<sup>f</sup>*Laboratório de Síntese e Veterização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba,  
58071-160 João Pessoa-PB, Brazil*

<sup>g</sup>*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil*

<sup>h</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências da Vida,  
Universidade do Estado da Bahia, 41150-000 Salvador-BA, Brazil*

*In silico and in vitro tests can reveal promising anti-leishmania activity for natural products and their derivatives. The aim of this study was to investigate *in silico* the pharmacological activities of potential new chalcones and their leishmanicidal potential *in vitro*. The *in silico* study was carried out using the PASS, MolPredictX and Molegro Virtual Docker 6.0 programs. Antiparasitic activity was assessed in axenic promastigote and amastigote forms of *Leishmania brasiliensis*. The cytotoxicity tests used the 377G8 cell line. The chalcones exhibited 50% cytotoxic concentration values (CC<sub>50</sub>) values > 50 µM. Chalcone **4** (named FERA1) presented the best activity with concentration for 50% of promastigotes and intracellular parasites forms (EC<sub>50</sub>) of 9.75 ± 1.7 and 10.13 ± 1.7 µM for promastigote and amastigote, respectively. Reactive oxygen species (ROS) testing presented increased ROS levels in the parasite at the FERA1 concentrations of 10 µM (56.33%), 20 µM (61.76%) and 30 µM (67.13%). Molecular docking revealed interactions (binding energy) between FERA1 and the enzymes UDP-glycosyl pyrophosphorylase (-56.8384), dihydroorotate-dehydrogenase (-132.276) and trypanothione-reductase (-151.281). Our results demonstrated the anti-leishmanial activity of chalcones, especially FERA1, with a noted raising of ROS levels in the parasite. Molecular docking revealed dihydroorotate dehydrogenase and trypanothione reductase as potential pharmacological targets for FERA1.*

**Keywords:** flavonoids, computer-aided drug design, homology modeling, molecular docking, pharmacological activity, MolPredictX

\*e-mail: fipq@academico.ufpb.br  
Editor handled this article: Paula Henzem-de-Mello (Associate)

 This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

**Anexo 2 -**

22 a 25  
setembro 2024

Certificamos que o trabalho intitulado

**INVESTIGATION OF THE IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF CHALCONE  
(E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-YL]-3-(3-BROMO-4-ETHOXY-5-METHOXYPHENYL)PROP-2-EN-1-ON  
E ON MACROPHAGES AND LYMPHOCYTES IN VITRO AND IN PAW EDEMA MURINE MODEL**

de autoria de **Laísia Falcão Alonso Uzêda, Beatriz Cerqueira dos Santos, Catarina Araujo Menezes Campos, Gleice Rayanne Silva, Fernando Leite Ferreira, Felipe Sarmento Guerra, Luis Cesar Rodrigues, Hemerson Iury Ferreira Magalhães, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, Milena Botelho Pereira Soares, Elisalva Teixeira Guimarães** foi apresentado por Laísia Falcão Alonso Uzêda, Beatriz Cerqueira dos Santos, Catarina Araujo Menezes Campos, Elisalva Teixeira Guimarães no **59º MEDTROP - Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, realizado no Centro de Convenções Rebouças, de 22 a 25 de setembro de 2024, na forma de apresentação **E-pôster**.

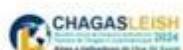
São Paulo, 25 de setembro de 2024.

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse: <http://certificados.sociedades.org.br> e use o código: RactDz4R0

Prof. Dr. Marcus Vinícius Lacerda  
Coordenador da Comissão Eletrotécnica

Prof. Dr. Hélio Gato  
Presidente do MEDTROP-2024

Rosâlia Moraes Torres  
Presidente SBMT



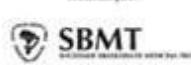
**CHAGAS LEISH 2024**  
Encontro Brasileiro de Pesquisas e Tratamento da Doença de Chagas



**Reuniões Satélites**



**Realização**



**SBMT**

**CERTIFICADO**

## Anexo 3 -

## Acta Tropica

FERAI, A NOVEL BROMINATED CHALCONE, INDUCES ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS, APOPTOSIS LIKE-DEATH, AND REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION IN *Leishmania braziliensis*

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Short Communication
<b>Section/Category:</b>	Molecular parasitology, malaria, Plasmodium, drug resistance, diagnosis, epidemiology + control, ins
<b>Keywords:</b>	Leishmaniasis; Chalcones; Apoptosis; Mitochondria; Ultrastructure
<b>Corresponding Author:</b>	ELISALVA GUIMARAES, Ph.D. Universidade do Estado da Bahia BRAZIL
<b>First Author:</b>	Francisnaira da Silva Santos
<b>Order of Authors:</b>	Francisnaira da Silva Santos Gleice Rayanne Silva Laisia Alonso Uzêda Catarina Araújo Menezes Campos Fernando Leite Ferreira Felipe Sarmento Guerra Luis Cesar Rodrigues Hemerson Iury Ferreira Magalhães Francisco Jaime Bezerra Junior Mendonça Milena Botelho Pereira Soares ELISALVA GUIMARAES, Ph.D.
<b>Abstract:</b>	Chalcones present a potential as bioactive agents due to their simple structure and possibility of generating more active molecules through strategic structural changes. In a previous study, our research group evaluated the <i>in vitro</i> antileishmanial activity of (E)-1-benzo [d][1,3] dioxol-5-yl)-3-(bromo-4-ethoxy-5-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (FERAI) against <i>Leishmania braziliensis</i> promastigotes and amastigotes. This study aimed to investigate the mechanisms of action of this molecule in <i>L. braziliensis</i> parasites. Ultrastructural changes were analyzed by scanning or transmission electron microscopy. Membrane mitochondrial potential, ROS production and cell death pattern were evaluated by flow cytometry. Ultrastructural analysis by scanning electron microscopy demonstrated morphological alterations in promastigotes, such as cell body retraction and plasmatic membrane lysis. Lipid inclusions, mitochondrial changes, nuclear swelling and flagellar loss was observed by transmission electron microscopy. FERAI induced mitochondrial membrane depolarization, an increase in ROS production, and a pattern of cell death by apoptosis in <i>L. braziliensis</i> promastigotes. The combination of FERAI and amphotericin B, a reference drug in the pharmaceutical industry, revealed a synergistic effect against this parasite. Conclusions: The synergistic effect with amphotericin B and the elucidation of the mechanisms of action demonstrate the importance of FERAI as a promising alternative in the development of drugs against leishmaniasis.