

**Daiane Dias Ferreira**

**Estudos Farmacológicos de Novos Compostos  
Semissintéticos com Potencial Terapêutico na  
Doença de Chagas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**Área de concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

**Orientador:** Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

**São Paulo**

**2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Ferreira, Daiane Dias

Estudos farmacológicos de novos compostos semi-sintéticos com potencial terapêutico na doença de Chagas / Daiane Dias Ferreira, São Paulo. – 2018.

Tese (Doutor em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisa laboratorial em Saúde Pública.

Orientação: Prof<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> André Gustavo Tempone Cardoso

1. Doença de chagas/terapia.
2. Trypanosoma cruzi/parasitologia.
3. Produtos biológicos/uso terapêutico.
4. Farmacocinética/farmacocinética.
5. Lauraceae/química.

SES/CCD/CD-381/2018

***Dedico esse trabalho à  
minha avó Amélia (in memorian)  
responsável pela maior herança  
da minha vida: minha Educação.***

*“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade.”*

*(Julio Verne)*

## **AGRADECIMENTOS**

Desafio tão grande quanto escrever essa Tese, foi utilizar apenas duas páginas para agradecer as pessoas que fizeram parte desta trajetória que marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Sendo assim, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela oportunidade e ao Instituto Adolfo Lutz pela infra-estrutura.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado.

Ao meu orientador professor doutor André Gustavo Tempone pela oportunidade e confiança depositadas, pelo conhecimento e incentivo, além da paciência dia após dia. Acima de tudo por ter contribuído para meu crescimento profissional me desafiando a encarar o inverno escocês e mergulhar numa área de conhecimento totalmente nova para mim. “Valeu chefinho”.

A minha querida mãe Zaira pelo imenso apoio, amor, paciência, carinho, compreensão e estímulo para realizar este trabalho. Obrigada “Sem Lar”.

A minha família pelo incentivo e apoio na realização dessa conquista, principalmente minha prima Eliane que foi fundamental durante o tempo que estive fora realizando parte deste projeto e se tornou uma especialista em transferências do tipo “Western Union”.

A família Paulista, pelo incentivo e por acreditarem no meu potencial para realização deste projeto. “Vocês não são da área”, mas depois de todo esse tempo, já é quase como se fossem.

Ao meu namorado Paulo Henrique que sempre me apoiou e contribuiu de forma decisiva para que eu pudesse realizar o sonho de estudar no exterior, ao financiar meu curso de inglês e me ajudar a pagar as despesas durante o tempo em que morei na Escócia. Obrigada “Dr.”, nada disso teria sido possível se não fosse por você.

Aos técnicos de laboratório Matília Nascimento e Vicente Duarte pela assistência e ajuda laboratorial prestada, além do companheirismo e amizade ao longo desta jornada.

Aos amigos do Laboratório de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, a Dra. Samanta por compartilhar seu conhecimento, e em especial a Thaís que sempre me faz rir com suas “pérolas” durante as conversas, a Maiara Romanelli que será sempre minha “amadora” preferida, a Maiara Amaral que com sua espontaneidade me conquistou, a Viviane pelo seu jeitinho meigo que encanta, e por fim a Juliana Tonini pelo companheirismo, amizade e trabalho em equipe. Obrigada “meninas” vocês também fazem parte dessa conquista.

As pessoas que me receberam numa sexta feira de frio e neve, num país que me encantou por sua beleza e cultura. Obrigada a todos do *Wellcome Centre for Anti-Infectives Research (WCAIR)* e o *Drug Discovery Unit*, principalmente ao “*In Vivo Team*”, pela paciência e dedicação ao compartilharem seus conhecimentos, experiências profissionais e pessoais. Não poderia deixar de agradecer a minha amiga Érika pela ajuda, por me acolher nesse país que agora é sua nova casa e claro pelas dicas de viagem. “Thank you guys.”

Enfim, sou grata a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte desse trabalho.

## RESUMO

A doença de Chagas afeta mais de 8 milhões de pessoas nos países em desenvolvimento, e dispõe de uma terapia ultrapassada e altamente tóxica. Considerando o Brasil uma das maiores biodiversidades do mundo, compostos de sua flora podem contribuir como novos protótipos farmacêuticos. Neolignanais, isoladas da planta *Nectandra leucantha*, apresentaram previamente atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e neste trabalho, serviram como base para a semissíntese de uma série de 24 análogos. Estudos *in vitro* demonstraram que 19 compostos não apresentaram citotoxicidade em células de mamífero até 200  $\mu\text{M}$ . Seis compostos apresentaram atividade contra as formas tripomastigotas ( $\text{CE}_{50}$  8 a 76  $\mu\text{M}$ ) e 8 compostos contra os amastigotas intracelulares ( $\text{CE}_{50}$  7 a 16  $\mu\text{M}$ ). Estudos da relação estrutura-atividade biológica (SAR), demonstraram que a presença de pelo menos uma cadeia lateral alílica era importante para a atividade anti-*T. cruzi* e que o grupo fenol não era essencial. O composto **8** foi eficaz contra as duas formas do parasita e eliminou 100% das formas amastigotas no interior dos macrófagos, sendo escolhido para estudos de mecanismo de ação. O composto **8** afetou rapidamente a mitocôndria do *T. cruzi*, causando uma intensa despolarização do potencial de membrana mitocondrial, com diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Apesar disso, não afetou a permeabilidade nem o potencial elétrico da membrana plasmática do parasita. Estudos de microscopia eletrônica de varredura também revelaram uma morfologia celular sem alterações da membrana plasmática. Análise em citometria de fluxo, demonstraram que o composto **8** não alterou os níveis das citocinas IL-6, IL-10 e da quimiocina MCP-1 após o tratamento de macrófagos infectados. Modelos preditivos *in silico* de propriedades físico-químicas, identificaram instabilidade metabólica para o composto **8** devido à presença do grupo éster, os quais foram corroborados por modelos *in vitro* de estabilidade em plasma de camundongo. Estas neolignanais representam estruturas promissoras para estudos de novos candidatos contra *T. cruzi* e futuras modificações químicas deverão abordar as questões farmacocinéticas antes dos estudos de eficácia *in vivo*.

## ABSTRACT

Chagas disease affects more than 8 million people in developing countries and the available therapy is old and highly toxic. Considering Brazil one of the biggest biodiversity in the world, compounds from the flora can contribute as new pharmaceutical prototypes. Neolignans, isolated from the plant *Nectandra leucantha*, previously showed anti-*Trypanosoma cruzi* activity and served as the basis for the semi-synthesis of a series of 24 analogues. *In vitro* studies demonstrated that 19 compounds caused no cytotoxicity in mammalian cells up to 200  $\mu\text{M}$ . Six compounds showed activity against trypomastigote forms ( $\text{IC}_{50}$  8 to 76  $\mu\text{M}$ ) and 8 compounds against intracellular amastigotes ( $\text{IC}_{50}$  7 to 16  $\mu\text{M}$ ). Studies of the structure activity relationships (SAR) showed that the presence of at least one allylic side chain was important for anti-*T. cruzi* activity and that the phenol group was not essential. Compound **8** was chosen for mechanism of action studies as it was effective against both forms of the parasite and eliminated 100% of the intracellular amastigotes. Compound **8** rapidly affected the mitochondria of *T. cruzi*, causing an intense depolarization of the mitochondrial membrane potential, with decreasing levels of reactive oxygen species. Nevertheless, it affected neither the permeability nor the electrical potential of the plasma membrane. Scanning electron microscopy studies also revealed a cellular morphology without alterations in plasma membrane. Flow cytometric analysis showed no alteration of the cytokines IL-6, IL-10 and the chemokine MCP-1 after treatment of infected macrophages with compound **8**. *In silico* predictive models of physicochemical properties, identified a metabolic instability for compound **8** due to the presence of the ester group, which were corroborated by *in vitro* models of stability in mouse plasma. These neolignans represent promising structures for studies of new candidates against *T. cruzi* and future chemical modifications should address pharmacokinetic issues prior to *in vivo* efficacy studies.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine Triphosphate
BZ	Benznidazol
CBA	Cytometric Bead Array
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica 50%
CCCP	Carbonyl cyanide 3 chlorophenylhydrazone
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva 50%
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNDi	Drug for Neglected Diseases initiative
EM	Espectrometria de Massa
FDA	Food and Drug Administration
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAL	Instituto Adolfo Lutz de São Paulo
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IS	Índice de seletividade
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos-1
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MM	Massa Molecular
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide

ND	Não Determinado
NFX	Nifurtimox
PAINS	Pan-Assay Interference Compounds
PBS	Phosphate Buffered Saline
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI 1640	Meio Roswell Park Memorial Institute 1640
SAR	Structure Activity Relationship
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SFB	Soro Fetal Bovino
TNF	Tumor Necrosis Factor
$\Delta\psi_p$	Potencial de Membrana Plasmática
$\Delta\psi_m$	Potencial de Membrana Mitocondrial

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Perfil de Produtos Alvo para doença de Chagas. ....	38
<b>Tabela 2.</b> Estrutura e massa molecular (MM) do desidrodieugenol B, metildesidrodieugenol B e derivados semissintéticos. ....	52
<b>Tabela 3.</b> Atividade de neolignanas semi-sintéticas contra formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> , citotoxicidade em células de mamíferos NCTC e Índice de Seletividade. ....	65

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição global de casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais, 2006-2010 .....	18
<b>Figura 2.</b> Principais espécies de triatomíneos relacionados à transmissão da doença de Chagas no Brasil. (A) <i>T. infestans</i> , (B) <i>P. megistus</i> , (C) <i>T. brasiliensis</i> , (D) <i>T. sordida</i> , (E) <i>T. pseudomaculata</i> e (F) <i>R. neglectus</i> .....	20
<b>Figura 3.</b> Ciclo de Transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de ação proposto dos fármacos nifurtimox e benznidazol... ..	28
<b>Figura 5.</b> Estruturas químicas dos fármacos amiodarona (A) e posaconazol (B) ..	31
<b>Figura 6.</b> Estrutura química do fármaco fexinidazol .....	31
<b>Figura 7.</b> Pipeline para a Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Fármacos .....	34
<b>Figura 8.</b> Origem dos 1562 fármacos desenvolvidos no período de 1981 a 2014 (em porcentagem), (B) macromolécula biológica: peptídeos, proteínas, etc; (N) produto natural inalterado; (NB) extrato botânico; (ND) produto natural modificado: semissintético; (S) fármaco totalmente sintético; (S/NM) composto sintético indicando inibição competitiva do substrato do produto natural (S*), (S*/NM) composto sintético com um farmacóforo natural; /NM indicando uma inibição competitiva; e (V) vacina; .....	42
<b>Figura 9.</b> <i>Nectandra leucantha</i> Nees & Mart (Lauraceae).....	45
<b>Figura 10.</b> Esqueletos carbônicos de lignanas e neolignanas.....	46
<b>Figura 11.</b> Estrutura do composto desidrodieugenol B isolado dos galhos e folhas de <i>N. leucantha</i> .....	47
<b>Figura 12.</b> Aspectos morfológicos de macrófagos infectados e tratados com o composto <b>8</b> . (A) macrófagos infectados e não tratado (controle), (B) macrófagos infectados e tratados com o composto <b>8</b> (30 µM). Microscopia óptica (A - aumento 1000X, B - aumento 400X). Seta amarela: núcleo do macrófago. Seta vermelha: amastigota de <i>T. cruzi</i> .....	67
<b>Figura 13.</b> Avaliação por espectrofluorimetria da permeabilidade da membrana plasmática de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com o composto <b>8</b> na CE <sub>50</sub> (64µM) utilizando o fluoróforo Sytox Green® (excitação 485 nm e emissão 520 nm) .....	70

<b>Figura 14.</b> Avaliação por espectrofluorimetria da permeabilidade da membrana plasmática de macrófagos tratados com o composto <b>8</b> na CE <sub>50</sub> (64µM) utilizando o fluoróforo Sytox Green® (excitação 485 nm e emissão 520 nm) .....	71
<b>Figura 15.</b> Microscopia eletrônica de varredura de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com o composto <b>8</b> na CE <sub>50</sub> (64µM). (A) e (B) controle não tratado, (C) e (D) parasita tratado com o composto <b>8</b> por 60 minutos.....	72
<b>Figura 16.</b> Avaliação do potencial de membrana plasmática de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , avaliados por citometria de fluxo e tratados com o composto <b>8</b> na CE <sub>50</sub> (64µM), utilizando a sonda bisoxonol .....	73
<b>Figura 17.</b> Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com o composto <b>8</b> na CE <sub>50</sub> (64µM), utilizando a sonda JC-1 (excitação 488 nm e emissão 563/574 nm) .....	74
<b>Figura 18.</b> Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com o composto <b>8</b> na CE <sub>50</sub> (64µM) .....	75
<b>Figura 19.</b> Dosagem de citocinas em macrófagos medulares não infectados, tratados com o composto <b>8</b> em três concentrações utilizando o kit CBA .....	76
<b>Figura 20.</b> Dosagem de citocinas em macrófagos medulares infectados com tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e tratados com o composto <b>8</b> em três concentrações diferentes, utilizando o kit CBA .....	77
<b>Figura 21.</b> Estabilidade em plasma de camundongo do composto <b>8</b> (A), avaliada por cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). (B) estrutura do desidrodieugenol B 1.....	79
<b>Figura 22.</b> Clearance em hepatócitos de camundongo do composto <b>8</b> (A), avaliado por cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). (B) estrutura do metabólito glicurinado; (C) estrutura do desidrodieugenol B 1. ....	80

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 Doença de Chagas .....	17
1.1.1 Histórico.....	17
1.1.2 Distribuição Geográfica e Situação no Brasil .....	17
1.1.3 Vetores e Agente Etiológico .....	19
1.1.4 Fases e Patogenia .....	24
1.1.5 Imunologia da doença de Chagas.....	25
1.1.6 Fármacos Disponíveis e Experimentais.....	27
1.2 Desenvolvimento e Importância no Planejamento de Novos Fármacos....	32
1.3 Química Medicinal .....	39
1.4 Importância dos Produtos Naturais.....	40
1.5 Família Lauraceae .....	43
1.6 <i>Nectandra leucantha</i> .....	44
1.7 Justificativa e Relevância .....	48
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	49
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
3.1 Reagentes .....	50
3.2 Animais de Experimentação .....	50
3.3 Parasitas.....	50
3.4 Células de Mamíferos .....	51
3.5 Derivados Semissintéticos.....	51
3.6 Determinação <i>In vitro</i> da Concentração Efetiva 50% (CE <sub>50</sub> ).....	55
3.7 Determinação <i>In vitro</i> da Concentração Citotóxica 50% (CC <sub>50</sub> ) .....	55
3.8 Amastigotas Intracelulares.....	56
3.9 Determinação do Índice de Seletividade .....	56

3.10 Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática.....	57
3.11 Alterações Morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)57	
3.12 Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ( $\Delta\psi_p$ ) .....	58
3.13 Alterações no Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....	59
3.14 Alterações na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) .....	59
3.15 Avaliação da Ativação de Macrófagos Medulares .....	60
3.16 Dosagem de Citocinas .....	61
3.17 Teste de Solubilidade .....	61
3.18 Índice de Hidrofobicidade Cromatográfica ( $\text{LogD}_{7.4}$ ) .....	62
3.19 Teste de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA) .....	62
3.20 Teste de Estabilidade em Plasma de Camundongo .....	63
3.21 Clearance em Hepatócitos de Camundongo.....	64
3.22 Análise Estatística.....	64
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
4.1 Determinação <i>In vitro</i> das Concentrações Efetiva 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) e Citotóxica ( $\text{CC}_{50}$ ) .....	65
4.2 Estudos <i>in silico</i> de Biodisponibilidade, PAINS e Análise da Relação Estrutura-Atividade (SAR) dos Derivados Semissintéticos de Neolignanas....	68
4.3 Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática .....	70
4.4 Alterações Morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 71	
4.5 Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ( $\Delta\psi_p$ ) .....	72
4.6 Alterações no Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ).....	73
4.7 Alterações na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) .....	74
4.8 Dosagem de Citocinas .....	75
4.9 Solubilidade cinética .....	77
4.10 Lipofilicidade $\text{LogD}_{7.4}$ .....	78
4.11 Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA) ...	78

4.12 Estabilidade em Plasma .....	78
4.13 <i>Clearance</i> em Hepatócitos de Camundongo.....	79
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>



# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Doença de Chagas**

### **1.1.1 Histórico**

Descoberta em 1909 por Carlos Chagas, médico e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz na cidade mineira de Lassance, a doença foi descrita por ele em seus vários aspectos, relativos à transmissão, ao parasita e às características clínicas (Kropf, 2005). No entanto, estudos relacionados à paleoparasitologia baseados na biologia molecular, demonstram que a infecção por *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas podem ser tão antigas quanto à presença humana no continente americano (Aufderheide et al., 2004; Lima et al., 2008; Fernandes et al., 2008; Araújo et al., 2009). Desenvolvimentos culturais, como agricultura e padrões de assentamentos permanentes ou semipermanentes, contribuíram para formação de um ambiente ideal na disseminação do *T. cruzi*, tornando a doença humana uma ocorrência puramente coincidente (Ferreira et al., 2011, Guhl et al., 2014).

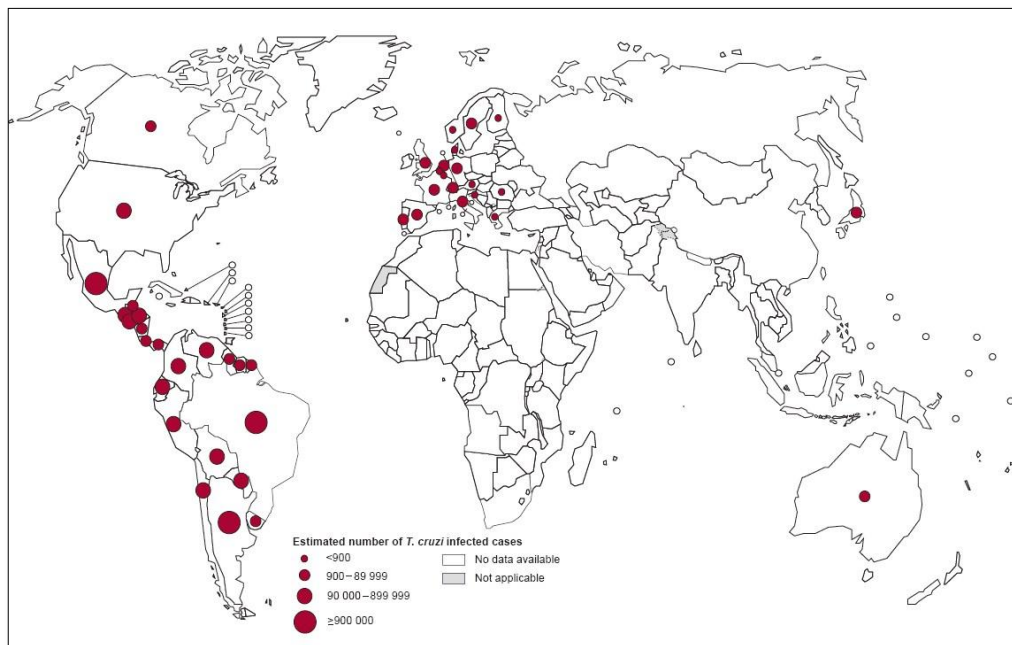
### **1.1.2 Distribuição Geográfica e Situação no Brasil**

Conhecida também como tripanossomíase americana, a doença de Chagas continua sendo um importante problema de saúde pública na América Latina, onde aproximadamente 6-7 milhões de pessoas estão infectadas e cerca de 28 milhões estão em risco de infecção (Rassi et al., 2012; Bern, 2015; WHO, 2018).

No Brasil dados apontam cerca de 2-3 milhões de pessoas infectadas (Akhavan, 2000; Dias, 2007; Ramos Jr. et al., 2010) e aproximadamente 6.000 mortes são registradas por ano (Martins-Melo et al., 2012a, Martins-Melo et al., 2012b; Martins-Melo et al., 2012c). As maiores prevalências da doença de Chagas são relatadas na Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) e

Paraguai (2,5%). O Brasil juntamente com Argentina e México abrigam quase 60% de todas as pessoas infectadas com o *T. cruzi* na América Latina (Rassi et al., 2010).

Historicamente, a transmissão e a morbidade estavam restritas à América do Sul, América Central e partes da América do Norte (México e sul dos Estados Unidos) (Rassi et al., 2012). No entanto, em função das migrações internacionais de áreas endêmicas para áreas não endêmicas e alguns modos de transmissão como transfusões, alimentos e doação de órgãos, a disseminação da doença expandiu-se para além de suas fronteiras geográficas naturais (Schmunis e Yadon, 2010; Gascon et al., 2010). Atualmente, a doença de Chagas tem recebido grande atenção como um problema emergente nos EUA, Canadá, Austrália e Japão (Gascon et al., 2010; Jackson et al., 2014). Na Europa, os casos importados estão emergindo principalmente na Espanha (Muñoz et al., 2009), na França (Lescure et al., 2008), e na Suíça (Jackson et al., 2010) (**Figura 1**).



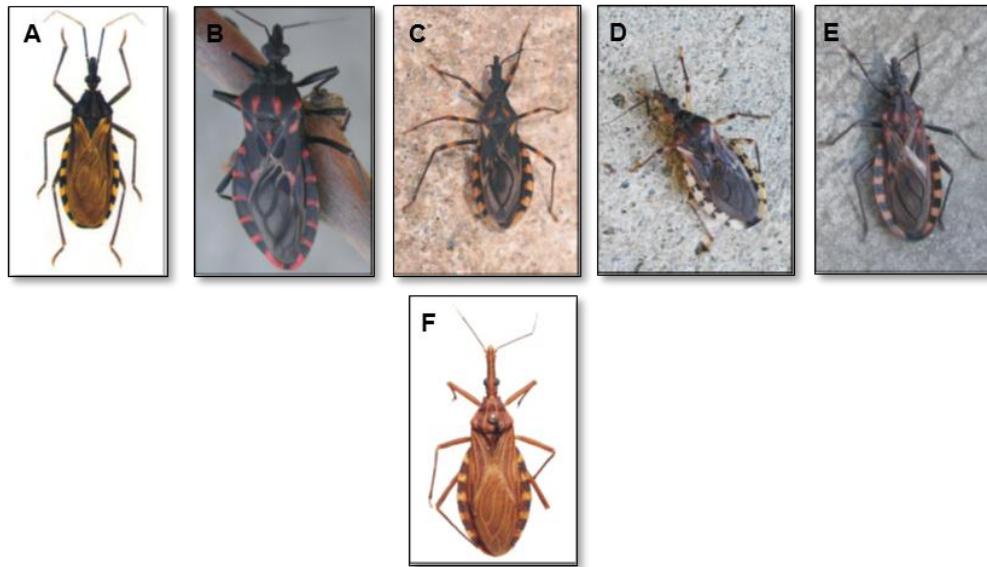
**Figura 1.** Distribuição global de casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais, 2006-2010. **Fonte:** WHO, 2018.

É evidente que a doença de Chagas representa um grande desafio global para os serviços de saúde sendo necessários esforços no âmbito de infraestrutura adequada, além de pessoal treinado capaz de atender essa população em crescente expansão (Schmunis, 2007; Tanowitz et al., 2011).

### 1.1.3 Vetores e Agente Etiológico

Os vetores da doença de Chagas são os insetos hematófagos da ordem Heteroptera, família Reduviidae, mais conhecidos como triatomíneos, devido à denominação da subfamília Triatominae (Lent e Wygodzinky, 1979). A subfamília Triatominae apresenta 148 espécies distribuídas em 18 gêneros (Tartarotti et al., 2006; Abad-Franch et al., 2013; Alevi et al., 2013; Poinar, 2013).

Recentemente, 65 espécies de triatomíneos foram identificadas no Brasil (Gardim et al., 2014) relacionadas à transmissão da doença de Chagas, destacando-se: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, *Triatoma pseudomaculata* e *Rhodnius neglectus*, (Dias e Schofield, 1998; Silistino-Souza et al., 2013) **(Figura 2)**.



**Figura 2.** Principais espécies de triatomíneos relacionados à transmissão da doença de Chagas no Brasil. (A) *T. infestans*, (B) *P. megistus*, (C) *T. brasiliensis*, (D) *T. sordida*, (E) *T. pseudomaculata* e (F) *R. neglectus*. **Fonte:** Jurberg et al., 2014.

A princípio, esses insetos eram encontrados em ambientes silvestres, apresentando como reservatórios tatus, gambás entre outros roedores fazendo da doença de Chagas, primitivamente uma endozootia (Tartarotti et al., 2004). No entanto, a doença passou a ser considerada um problema de saúde pública, a partir da domiciliação dos triatomíneos, devido à destruição gradativa dos biomas naturais provocando redução significativa da fauna silvestre e conseqüente escassez de alimentos. Uma vez na área urbana, os reservatórios domésticos passaram a ser os gatos, cachorros, ratos, coelhos e o próprio homem (Barreto e Ribeiro, 1979).

Historicamente, o controle de vetores tem sido utilizado como a principal estratégia para prevenir a transmissão da doença de Chagas. Quando realizado de forma adequada através da pulverização residual interna, apresenta um efeito duradouro, mesmo em ambientes com vetores domiciliados (Cucunubá et al., 2018).

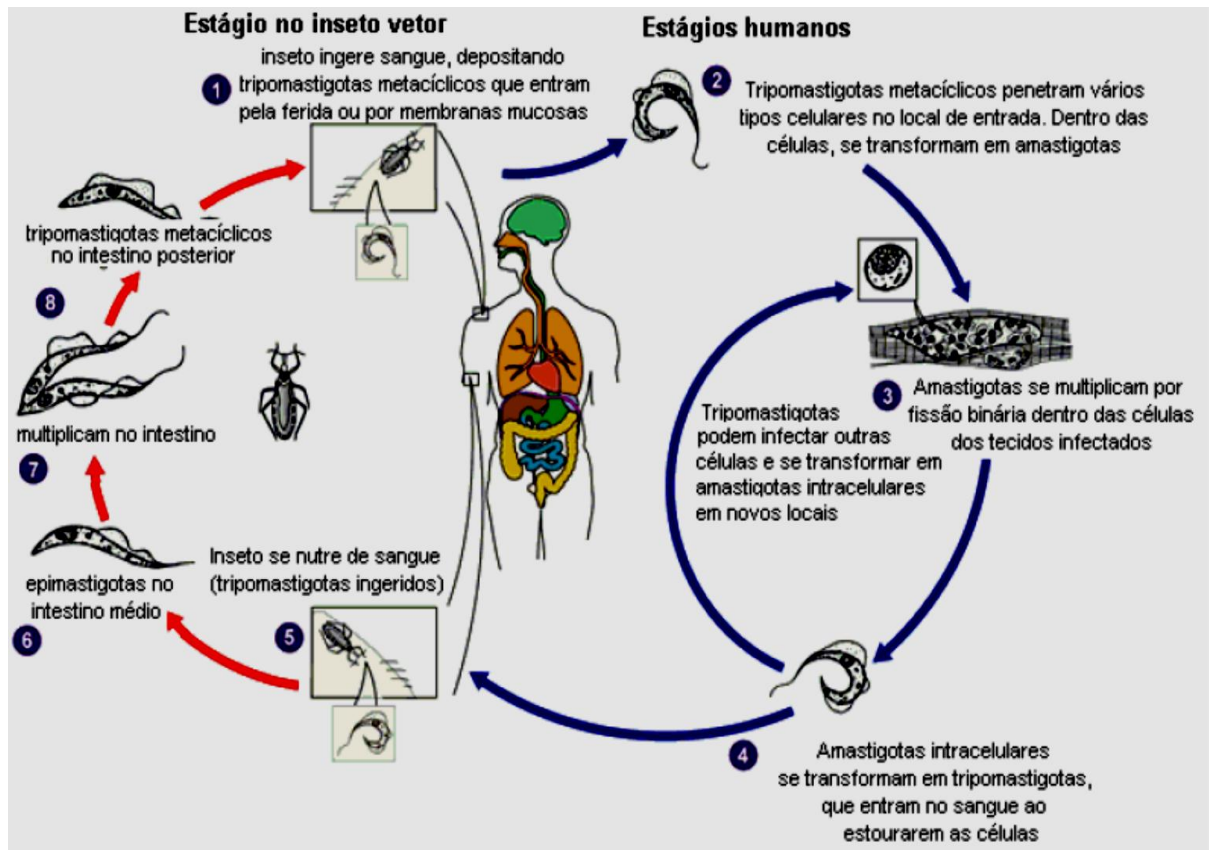
Na década de 50, o governo brasileiro deu início a campanhas para controlar os vetores da doença de Chagas em algumas regiões do país, no entanto, só em meados dos anos 80 essas campanhas foram estendidas para todo o território (Pereira e Navarro, 2013). Em 1991, houve um marco no combate à doença de Chagas na América do Sul. Os chamados países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) adotaram uma resolução denominada “Ação para eliminar o *T. infestans*”, disponibilizando milhões de dólares no controle do vetor e em testes nos bancos de sangue (Moraes-Souza, 1999; Silveira e Pimenta, 2011).

Outras duas iniciativas também surgiram para ampliar o combate a doença de Chagas. Uma delas incluiu os países Andinos envolvendo Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (Guhl e Vallejo, 1999) e a outra, os países da América Central, envolvendo Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Panamá (Ponce, 1999). Essas campanhas para erradicação de vetores apresentaram resultados tão significativos que alguns países receberam da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), uma certificação de livres de transmissão vetorial, incluindo o Uruguai (1997), Chile (1999), e o Brasil em (2006) (Pereira e Navarro, 2013). No entanto, a transmissão intradomiciliar ainda ocorre em muitas regiões endêmicas, particularmente em populações de difícil acesso em comunidades rurais isoladas da América Latina (Cucunubá et al., 2017). Como resultado, áreas antes consideradas livres de transmissão, estão sendo repovoadas com vetores infectados por *T. cruzi*, levando a casos recentes de doença de Chagas aguda (Andrade et al., 2014).

Normalmente, os triatomíneos apresentam hábitos noturnos e durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados com *T. cruzi*, ingerem as formas tripomastigotas que, após sofrerem multiplicação e metaciclogênese no tubo digestivo, são eliminadas nas fezes quando um novo repasto ocorre, podendo infectar novos hospedeiros vertebrados

(Chagas, 1933; Brener et al., 2000). É importante destacar, que além da transmissão vetorial através da picada do inseto, outras vias de infecção também são de grande importância, como por exemplo, transmissão congênita, amamentação, via transfusional e transmissões excepcionais como, acidental em laboratório, por transplantes de órgãos, oral e sexual (Brener et al., 2000; Dias, 2006). Atualmente a infecção oral pelo *T. cruzi* é a via de transmissão mais documentada no Brasil. Surto têm sido reportados na região amazônica associados principalmente ao consumo de açaí contaminado (Nóbrega et al., 2009), bem como suco de cana de açúcar (Bastos et al., 2010).

O *T. cruzi* pertence a um ecossistema exclusivamente americano, sendo encontrado em extensas áreas do continente, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile (Dias et al., 2002). É um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, que apresenta um único flagelo e o cinetoplasto, uma organela que contém DNA e se localiza na mitocôndria. Suas formas evolutivas são: tripomastigotas (forma infectante), epimastigotas (forma presente no vetor) e amastigotas (multiplicam-se dentro das células do hospedeiro) (Telleria et al., 2006). Uma vez, no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* invadem diferentes tipos celulares, principalmente do sistema fagocitário mononuclear incluindo os macrófagos aonde irão se multiplicar sob a forma de amastigotas (Costa et al., 2006) dando continuidade ao ciclo (**Figura 3**).



**Figura 3.** Ciclo de Transmissão do *Trypanosoma cruzi*. **Fonte:** adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention, 2018.

A complexidade da doença está diretamente relacionada a grande variabilidade genética do parasita. Até meados dos anos 80, as cepas de *T. cruzi* eram subdivididas em três grupos (zimodemas): I, II e III (Rassi et al., 2010; Zingales, 2011). No entanto, evidências moleculares recentes confirmaram a existência de seis Unidades Discretas de Tipagem (DTU) para as atuais linhagens de *T. cruzi* sendo: TcI-TcVI e um novo genótipo encontrado em morcegos denominado de TcBat (Flores-López e Machado, 2011). Cada uma dessas DTUs apresentam características relacionadas a sua distribuição geográfica, associações eco-epidemiológicas e manifestações clínicas da doença (Zingales et al., 2012).

#### 1.1.4 Fases e Patogenia

A doença de Chagas é caracterizada por apresentar duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda podem ocorrer sintomas de febre, linfadenomegalia localizada na região da picada (sinal de Romaña ou chagoma de inoculação) e hepato-esplenomegalia, no entanto, normalmente ela passa despercebida, uma vez que, seus sintomas são semelhantes aos de várias outras infecções (Pereira-Chioccola, 1998; Marcondes et al., 2000; Rassi et al., 2010; Pereira e Navarro, 2013). A fase aguda dura de 4 a 8 semanas e se caracteriza pelo predomínio do parasita circulante na corrente sanguínea (Wanderley et al., 2010). A mortalidade pode variar de 5 a 10% nessa fase e geralmente envolve crianças que morrem de miocardite e/ou mieloencefalite (Murcia et al., 2013).

Na fase crônica também pode ocorrer a forma indeterminada da doença, na qual o paciente não apresenta sintomatologia importante do ponto de vista clínico, nem resultados anormais nos exames complementares do coração e do tubo digestivo. Cerca de 60% dos pacientes apresentam esse tipo de quadro clínico, que se mostra como o melhor prognóstico para os pacientes crônicos (Soares-Sobrinho et al., 2007; Pereira e Navarro, 2013). Porém, aproximadamente 20-40% dos indivíduos infectados evolui com manifestações da doença, por exemplo, a miocardite grave com cardiomegalia, megaesôfago e megacólon, entre outras (Rassi Junior e Rassi, 1998; Rassi Junior e Marin-Neto, 2000; Sathler-Avelar et al., 2009). Vale a pena destacar, que a doença de Chagas tem sido relacionada como uma das principais causas mundiais de miocardite (Feldman e McNamara, 2000). Além disso, estima-se que nos próximos 5 anos, aproximadamente 200.000 pessoas morrerão de cardiomiopatia chagásica (Pecoul et al., 2016).

Sabe-se que a permanência do parasita nos tecidos do hospedeiro desempenha um papel importante na agressão do miocárdio, sendo assim, acredita-se que ao eliminar o parasita, ou ao menos reduzir sua



quantidade pode-se melhorar a eficácia da resposta imune e a progressão da doença (Marin-Neto et al., 2007; Sosa-Estani et al., 2009). Ainda assim, é importante ressaltar que a gravidade da doença depende também de outros fatores, como a virulência do parasita, a quantidade do inóculo e a suscetibilidade do paciente (Rassi et al., 2000; Coll-Cárdenas et al., 2004; Almeida-Leite et al., 2007).

### **1.1.5 Imunologia da doença de Chagas**

O contato entre o *T. cruzi* e as células do hospedeiro humano desencadeia uma forte resposta imune inata e adaptativa, que desempenham um papel importante durante as fases aguda e crônica da doença (Acevedo et al., 2018). Nesse sentido, o sistema imunológico do hospedeiro durante a fase aguda da doença, atua no controle da infecção e disseminação do parasita, enquanto na fase crônica, produz diferentes respostas relacionadas à manifestação ou ausência de sintomas (Boscardin et al., 2010; Basso, 2013). Além disso, dados da literatura vem reforçando a ideia da importância do antecedente genético do hospedeiro na manifestação dos sintomas na doença de Chagas (Frade et al., 2013; Luz et al., 2016).

Células fagocíticas, como os monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, se apresentam como a primeira linha de defesa contra os patógenos. Sendo assim, a detecção e fagocitose de microrganismos e restos celulares, é viabilizada pela presença de receptores presentes principalmente na membrana de monócitos e neutrófilos, que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Acevedo et al., 2018).

Dentre os receptores mais relevantes no reconhecimento do *T. cruzi*, estão os receptores do tipo Toll-like (TLRs). Atualmente, foram identificados 10 tipos de TLRs em humanos e 13 em camundongos

(Dolasia et al., 2018). No entanto, a expressão dessas moléculas que detectam esses PAMPs, se apresenta de forma diferente entre pacientes chagásicos e indivíduos não infectados. Dessa forma, o perfil das células TH1, TH2, TH17 e Treg acabam sendo impactadas na formação das respostas de memória imunológica (Pinto et al., 2018). Tais respostas estão relacionadas à ativação do sistema complemento, recrutamento de macrófagos e células natural killer, ativação de células T CD4 e CD8, bem como, produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-17 (Cutrullis et al., 2017).

Sabe-se que, durante a infecção pelo *T. cruzi*, as citocinas sintetizadas são capazes de induzir ou regular a produção de quimiocinas em macrófagos e cardiomiócitos tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Lopez et al., 2018). Normalmente as células TH1 são as responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias, enquanto as células TH2 têm uma função anti-inflamatória e estando envolvidas na resposta mediada pelos anticorpos (Basso, 2013). Nesse sentido, como resultado desse processo, a regulação da resposta celular ocorre devido a uma redução na ativação de células dendríticas e na atividade microbicida do macrófago (Basso, 2013).

Estudos experimentais demonstraram que a resistência à infecção pelo *T. cruzi*, estava diretamente relacionada ao perfil de citocinas TH1, tais como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 (Sanoja et al., 2013). No entanto, a produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-22, IL-6, IL-10 e CCL2 e a expressão de CD40, CD80, MHC-II, PD-L1, CCR5 e CCR7 podem ser diferentes, dependendo da cepa do parasita (Poveda et al., 2014, da Costa et al., 2014).

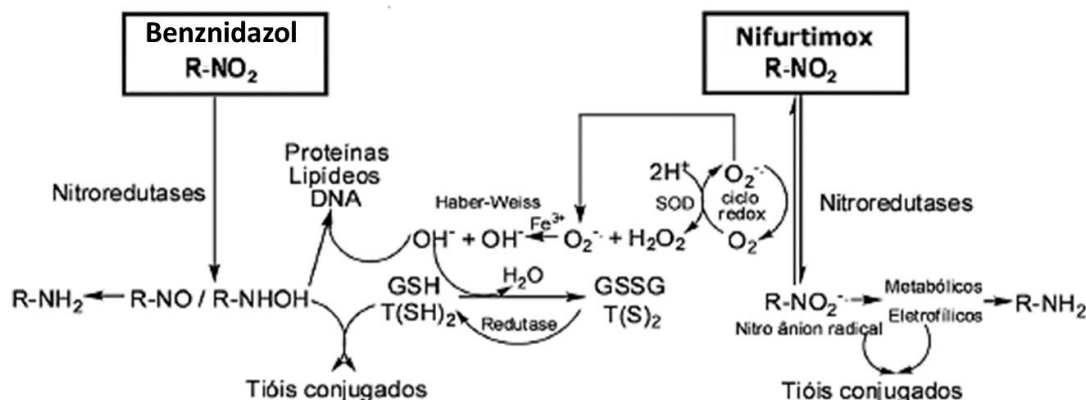
Sendo assim, a variedade entre os diferentes perfis de resposta TH no hospedeiro, são definidos de acordo com as citocinas produzidas e suas funções, uma vez que, a predominância de um ou outro perfil de resposta depende da natureza do patógeno, permitindo a ativação dos mecanismos mais convenientes para a sua eliminação (Sallusto, 2016).

### 1.1.6 Fármacos Disponíveis e Experimentais

O tratamento da doença de Chagas baseia-se, na eliminação do parasita durante a fase aguda e na atenuação dos sintomas durante a fase crônica com o uso de cardiotônicos e antiarrítmicos, para o coração, ou através de cirurgias corretivas do esôfago e do cólon (Kirchhoff, 1996).

Os primeiros compostos desenvolvidos experimentalmente para o tratamento específico da doença de Chagas, após a sua descoberta em 1909, foram o Atoxyl (arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético (antimônio trivalente) e o cloreto de mercúrio que, mostraram-se ineficazes para esse propósito (Croft, 1999; Coura e Castro, 2002).

Em 1952, Packchanian foi o primeiro a demonstrar experimentalmente que os compostos nitrofuranos, eram promissores para o tratamento da doença de Chagas (Packchanian, 1952). Mais tarde, Brener em 1961 usou nitrofurazona para curar camundongos cronicamente infectados (Brener, 1961). Porém, somente no final da década de 60 o primeiro medicamento foi introduzido para o tratamento da doença de Chagas, conhecido como nifurtimox (NFX) (Cançado, 1968). O composto apresenta atividade contra as formas tripomastigotas e amastigotas do parasita (Coura e Castro, 2002). Seu mecanismo de ação envolve a redução parcial do NFX para um radical nitro-aniônico seguido pela auto-oxidação para regenerar o nitrofurano original e produzir superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (Docampo, 1990; Soares-Sobrinho et al., 2007) **(Figura 4)**.



**Figura 4.** Mecanismo de ação proposto dos fármacos nifurtimox e benznidazol. **Fonte:** Dias et al., 2009.

Dessa forma, o *T. cruzi* que é deficiente em mecanismos de desintoxicação metabólica para o oxigênio, torna-se altamente suscetível, particularmente ao peróxido de hidrogênio sendo portanto, mais sensível à oxidação do que as células dos hospedeiros (Docampo e Moreno, 1986; Docampo, 1990).

No entanto, a partir da década de 80 o NFX teve sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul em decorrência dos inúmeros efeitos adversos que causava como anorexia, perda de peso, parestesia, sonolência ou excitabilidade psíquica, e sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e cólicas intestinais ocasionais (Soares-Sobrinho et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Marin-Neto et al., 2009). Além disso, a resistência apresentada pelas cepas, somada ao desinteresse dos laboratórios farmacêuticos em continuar a produção de um medicamento não lucrativo, também contribuíram para a descontinuidade do seu uso (Coura e Castro, 2002).

No final da década de 70, Grunberg e colaboradores demonstraram pela primeira vez que o benznidazol (BZ) um derivado nitroimidazólico

também era ativo contra o *T. cruzi* (Grunberg et al., 1967). O composto demonstrou ter eficácia semelhante à da nitrofurazona nas fases aguda e crônica da doença (Ferreira, 1974). Além disso, apresentava menos efeitos tóxicos sendo considerado o tratamento de primeira escolha, com base em um melhor perfil de efeitos colaterais do que o NFX, bem como evidências mais amplas de sua eficácia (Bern et al., 2007), com vários estudos experimentais e clínicos sendo publicados posteriormente (Schenone et al., 1975; Ferreira, 1976; Andrade e Figueira, 1977; Barclay et al., 1978). Supostamente, o mecanismo de ação do BZ parece estar relacionado a formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos gerados quando, ocorre a redução do grupo nitro a um grupo amino pela ação das nitroreduases (Maya et al., 2007; Wilkinson et al., 2008) (**Figura 4**). Esses mecanismos envolvem modificações covalentes de macromoléculas, como DNA, proteínas e lipídeos, não produzindo espécies reativas de oxigênio (Moreno et al., 1982; Docampo e Moreno, 1984; Docampo, 1990).

Assim, é hipotetizado que o efeito tripanocida do BZ é causado pela ligação covalente de seus metabólitos reduzidos a macromoléculas do parasita (Maya et al., 2004). Além disso, o BZ e seus metabólitos podem afetar o metabolismo da tripanotona do *T. cruzi* (Maya et al., 1997) e melhorar a fagocitose aumentando a morte do parasita através da produção de IFN- $\gamma$  e inibição da NADH-fumarato redutase (Turrens et al., 1996; Murta et al., 1999). No entanto, os metabólitos eletrofílicos formados através do mecanismo de ação de ambos os fármacos, também atuam em outros sistemas do hospedeiro em função de sua alta reatividade, contribuindo para os efeitos citotóxicos observados durante o tratamento dos pacientes (Dias et al., 2009).

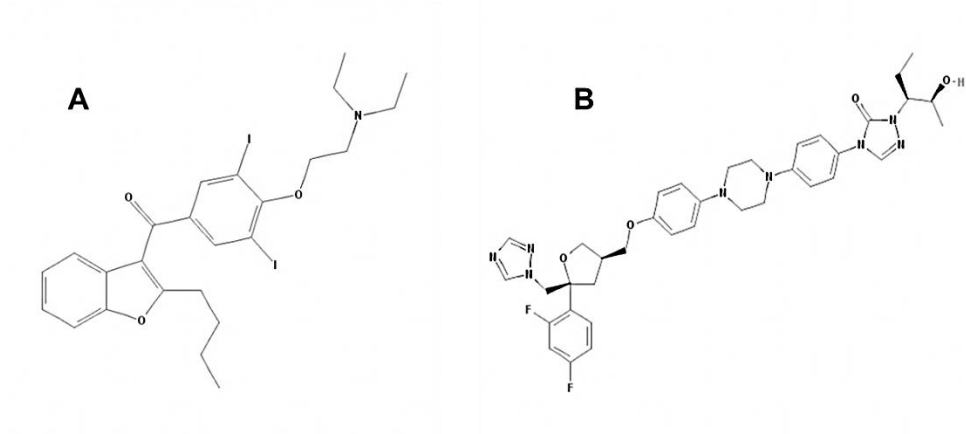
Os efeitos adversos estão mais relacionados a manifestações cutâneas (hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas, edema generalizado) que respondem bem ao uso de anti-histamínicos, além

disso, febre, linfadenopatia, dor articular e muscular também podem estar presentes (Castro et al., 2006; Pinazo et al., 2010).

O NFX e o BZ têm sido utilizados no tratamento da doença de Chagas há mais de 40 anos. Ambos os compostos são administrados por via oral, porém, são rapidamente metabolizados pelo sistema do citocromo P450 sendo necessária a administração de doses múltiplas diariamente (Walton e Workman, 1987; Montalto de Mecca et al., 2002; Raether e Hanel, 2003; Mecca et al., 2008). Embora o uso desses medicamentos para tratar a fase aguda da doença seja amplamente aceito, sua utilização na fase crônica permanece controversa (Coura e Castro, 2002; Urbina e Docampo, 2003).

No entanto, não há dúvidas de que o ambiente de Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) para doença de Chagas tem sido muito ativo nos últimos anos. Desde a introdução do NFX e BZ, o alopurinol e os azóis itraconazol, fluconazol, cetoconazol, posaconazol e ravuconazol foram estudados em ensaios clínicos recentes (Molina et al., 2014; Morillo et al., 2015; *clinical trials*: NCT01489228; *clinical trials*: NCT01377480). Embora tenham contribuído com dados importantes e desempenhado um papel fundamental para melhor entendimento da doença, esses estudos, demonstraram a falha desses azóis em induzir a “cura parasitológica”, após um ano de acompanhamento (Apt et al., 2005; Rassi et al., 2007).

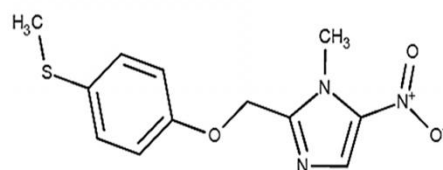
Atualmente apenas alguns ensaios clínicos para o tratamento da doença de Chagas estão em andamento. Em um deles, a amiodarona que é um agente antiarrítmico de classe III, freqüentemente utilizado para o tratamento de pacientes sintomáticos com a forma cardíaca da doença, demonstrou atividade direta contra o *T. cruzi*, *in vitro* e *in vivo*, além de potente atividade sinérgica com o posaconazol (Benaim et al., 2006) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Estruturas químicas dos fármacos amiodarona (A) e posaconazol (B). **Fonte:** PubMed Compound.

Nesse sentido, um estudo observacional demonstrou que o implante de um tipo de marcapasso (cardiovisor-desfibrilador) associado ao uso de amiodarona, reduziu o risco de mortalidade e morte súbita por todas as causas em comparação com o uso isolado do fármaco em pacientes chagásicos com doença cardíaca e arritmias (Gali et al., 2014). A data estimada para conclusão do estudo é 2019 (*clinical trials*: NCT01722942).

Outro fármaco em estudo clínico para a doença de Chagas é o fexinidazol, um nitro-imidazol redescoberto através de uma triagem dentre mais de 700 outros nitro-compostos para o tratamento da tripanossomíase humana Africana (doença do sono) (Torreele et al., 2010) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Estrutura química do fármaco fexinidazol. **Fonte:** DrugBank

O sucesso do fexinidazol contra esse outro tipo de tripanossomíase, bem como, o acúmulo de dados relacionados a toxicidade e segurança, também impulsionaram sua avaliação como candidato ao tratamento da doença de Chagas (Bahia et al., 2014a; Bahia et al., 2014b). Um estudo de Fase II de Prova de Conceito (PoC) do fexinidazol foi iniciado em 2014 em Cochabamba e Tarija, na Bolívia. A análise dos dados sugeriu altas taxas de eficácia e segurança do fármaco. Sendo assim, um novo estudo de PoC foi iniciado em 2017 em quatro locais na Espanha. A data de conclusão prevista é no segundo trimestre de 2019 (DNDi, 2018).

Embora avanços na identificação de novos candidatos a fármacos contra a doença de Chagas tenham sido realizados, a proposta terapêutica manteve-se a mesma durante mais de 40 anos resultando, na não existência, até hoje, de um medicamento eficaz para os pacientes principalmente em fase crônica (Pereira e Navarro, 2013). Apesar disso, o conhecimento aprofundado sobre as propriedades físico-químicas e biológicas destes fármacos têm possibilitado o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento dessa enfermidade (Soares-Sobrinho et al., 2007).

## **1.2 Desenvolvimento e Importância no Planejamento de Novos Fármacos**

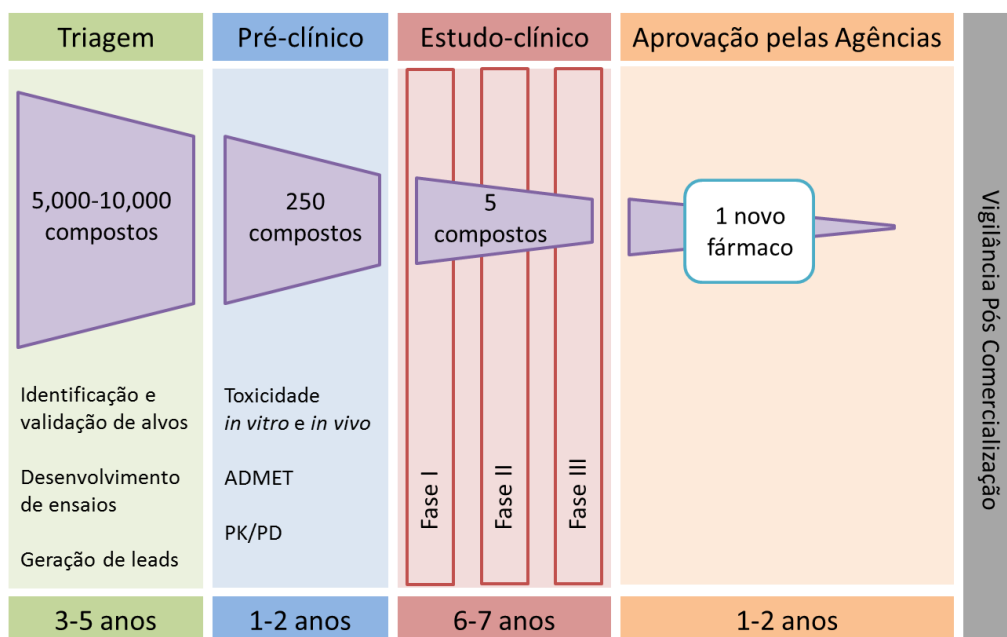
Aproximadamente 1 bilhão de pessoas no mundo sofrem com doenças tropicais negligenciadas (DTNs) como, doença do sono, doença de Chagas, leishmanioses, filariose, oncocercose e esquistossomose (Savioli et al., 2006). Os fármacos disponíveis para o tratamento da maioria delas apresentam sérias limitações, sendo importante destacar que, nos últimos 25 anos, de todos os medicamentos novos lançados no mercado, apenas 1% foram destinados a doenças negligenciadas (Trouiller et al., 2002).



Claramente, a última década evidenciou desafios sem precedentes para a indústria farmacêutica, resultando em uma escassez generalizada de estratégias para novos fármacos, além dos custos de P&D insustentáveis (Matthews et al., 2016). Apesar dos avanços na pesquisa, grande parte do conhecimento obtido até hoje é fragmentado e confuso, pois utiliza dados disponíveis na literatura, o que muitas vezes impede uma compreensão completa das complexas interações biológicas e a progressão bem-sucedida de candidatos a fármaco através de estratégias de desenvolvimento (Matthews et al., 2016).

É fato que a grande maioria das descobertas científicas básicas que se tornam produtos inovadores, é originária de laboratórios acadêmicos (Goodman, 2009; Silber, 2010; Silber, 2014). Porém, a indústria e a academia, as duas principais partes fundamentais nesse processo, continuam a trabalhar isoladamente, impulsionadas por diferentes objetivos, ignorando que suas competências e capacidades têm pouca sobreposição e são de fato, na verdade complementares (Matthews et al., 2016).

O caminho para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de uma molécula pequena envolve um processo exaustivo que inclui: pesquisa básica, identificação e validação de alvos, geração e otimização de compostos líderes (*lead*), testes pré-clínicos, ensaios clínicos de fases I, II e III em humanos, além da aprovação pelas agências reguladoras (**Figura 7**).



**Figura 7.** Pipeline para a Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Fonte:** Adaptado de [www.pharma.org](http://www.pharma.org), 2018.

O processo começa com a identificação e validação de alvos (proteínas, DNA, RNA, etc), seguido pela confirmação de um efeito terapêutico através de ensaios bioquímicos, de citotoxicidade, etc. Os resultados são então organizados para identificar compostos bioativos (*hits*) que, poderão ser otimizados em compostos *lead* (Matthews et al., 2016).

Esses compostos líderes, ainda serão modificados pela química medicinal através das relações estrutura-atividade (SAR), para melhorar as propriedades físico-químicas e farmacológicas, aumentando sua potência e seletividade. Esse processo envolve uma série de testes para avaliar características bio-farmacológicas eficazes, propriedades toxicológicas específicas, absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), uma vez que, normalmente são nesses estágios iniciais dos testes que a maioria dos compostos falha (Norris et al., 2014).

Durante o processo de descoberta de novos fármacos, a previsão dos parâmetros de ADME logo nos estágios iniciais da pesquisa é de extrema importância (Smith, 2001; Kerns e Di, 2003; Walker, 2004). Sendo assim, a otimização destas propriedades, através de modificações moleculares de compostos promissores, é essencial na seleção de candidatos com maiores probabilidades de não serem abandonados, mais adiante, na fase clínica, pois o fracasso nessa fase representa grandes perdas de tempo e dinheiro (Chaikin et al., 2000).

A ação de um fármaco, após ser administrado em humanos ou animais, pode ser dividida em três fases: fase farmacêutica, fase farmacocinética e fase farmacodinâmica. Durante a fase farmacêutica, ocorre a desintegração da forma de dosagem, seguida da dissolução da substância ativa. Na fase farmacocinética ocorrem os processos ADME, ou seja, “o que o organismo faz com o fármaco”. Já a fase farmacodinâmica, está relacionada com a interação do fármaco e seu alvo (receptor, enzimas etc.) conseqüentemente produzindo um efeito terapêutico, e pode ser entendida como “o que o fármaco faz no organismo” (Ariëns e Simonis, 1974). Sabe-se ainda, que a fase farmacocinética tem profundo impacto sobre o efeito farmacológico, uma vez que os processos de ADME determinam a concentração e o tempo despendido das moléculas do fármaco em seu sítio de ação (Abdel-Rahman e Kauffman, 2004).

Entretanto, muitos dos compostos que se mostram promissores nos testes *in vitro* não apresentam boa atividade em *in vivo* (Masimirembwa et al., 2003). Embora os modelos animais possam ser preditivos, em muitos casos, testes inadequados levam a falhas dispendiosas, sendo estas, significativas na fase de desenvolvimento pré-clínico dos programas de descoberta de fármacos (Breyer, 2014).

Apesar das pesquisas substanciais, a falta de alvos bem validados, ainda é um desafio, uma vez que, muitos genes considerados essenciais, são freqüentemente revelados como não “tão” essenciais

assim para o crescimento ou a sobrevivência do parasita (Wyatt et al., 2011). Sendo assim, o planejamento e otimização de uma molécula frente ao seu alvo terapêutico é apenas a ponta do “iceberg” na pesquisa de novos fármacos; pois o desafio, naturalmente, é traçar modificações moleculares que resultem em um fármaco com múltiplas propriedades aceitáveis, sobretudo com eficácia terapêutica, segurança, facilidade de formulação e que seja adequado para uso clínico (Pereira, 2007).

Atualmente, as principais abordagens experimentais/pré-clínicas para doença de Chagas baseiam-se nos inibidores do ergosterol, no metabolismo da tripanotona e do pirofosfato, nos análogos do lisofosfolípido, além da síntese de proteínas e purinas (Apt, 2010).

É evidente que, para que os projetos de desenvolvimento de novos fármacos tenham sucesso em fornecer o medicamento correto para o paciente certo, deve haver desde o início uma compreensão clara das características do produto final para seu uso terapêutico (Wyatt et al., 2011). Tais características são definidas no Perfil de Produtos-Alvo ou (*Target Product Profile - TPP*), que nada mais é, uma lista dos atributos essenciais necessários para que um fármaco específico seja um produto clinicamente bem sucedido e tenha um benefício substancial sobre as terapias já existentes (Wyatt et al., 2011).

Considerado uma ferramenta importante no planejamento estratégico e tomada de decisão, o TPP é utilizado para definir: a população de pacientes alvo; os níveis aceitáveis de eficácia e segurança; a dosagem; o esquema terapêutico; bem como, as propriedades e níveis aceitáveis do custo de um novo medicamento (Frearson et al., 2007; Tebbey e Rink, 2009). Além disso, também fornece informações necessárias para: seleção de alvos; triagem de compostos considerados *hits* como ponto de partida para otimização e melhor planejamento de ensaios clínicos (Wyatt et al., 2011). Mais importante ainda, esse tipo de matriz facilita o rápido encerramento de projetos que nunca beneficiarão os pacientes, permitindo o

realinhamento de recursos valiosos em áreas potencialmente mais produtivas (Wyatt et al., 2011).

Nesse sentido, podemos observar o TPP para doença de Chagas sugerido pela iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas, (*DNDi* - Drugs for Neglected Diseases initiative), uma organização sem fins lucrativos com a finalidade de desenvolver um modelo alternativo de P&D de medicamentos novos e acessíveis para as populações negligenciadas (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Perfil de Produtos-Alvo para doença de Chagas.

	<b>Aceitável</b>	<b>Ideal</b>
<b>População alvo</b>	Crônico	Crônico e agudo
<b>Cepas</b>	TcI, TcII, TcV e TcVI	Todas
<b>Distribuição Geográfica</b>	Global	Global
<b>Adulto/criança</b>	Adulto	Todos
<b>Eficácia clínica</b>	Não inferior ao benznidazol em áreas endêmicas	Superior ao benznidazol nas fases crônica e aguda da doença
<b>Segurança</b>	Superior ao benznidazol, com pouco monitoramento clínico e laboratorial	Superior ao benznidazol, sem necessidade de monitoramento clínico e laboratorial
<b>Atividade contra cepas resistentes</b>	Não necessário	Ativo contra cepas resistentes a nitrofuram e nitroimidazol
<b>Contraindicações</b>	Gestante/lactantes	Nenhuma
<b>Precauções</b>	Não genotóxico, não pró-arrítmico	Não genotóxico, não teratogênico, não pró-arrítmico
<b>Interações</b>	Interação clínica não significativa com antiarrítmicos e anticoagulantes	Nenhuma
<b>Apresentação</b>	Oral	Oral
<b>Estabilidade</b>	3 anos, zona climática IV	5 anos, zona climática IV
<b>Regime de dosagem</b>	Qualquer duração	<30 dias

Embora a busca por novos fármacos demande um longo tempo de estudo, grandes recursos financeiros e ainda um elevado risco de perda dos investimentos, a descoberta de medicamentos para doença de Chagas está entrando em uma nova era (Chatelain, 2015). Podemos olhar para o futuro com mais confiança, mesmo que ainda haja um longo caminho a percorrer para compreender a complexidade dessa doença e as interações parasita-hospedeiro (Chatelain, 2015).

### **1.3 Química Medicinal**

A utilização de estratégias moleculares e computacionais no desenvolvimento de fármacos, juntamente com abordagens de síntese orgânica, levaram a um aumento significativo na disponibilidade de dados biológicos, estruturais e químicos, tornando a pesquisa experimental e computacional intimamente conectadas (Juliano, 2013). A importância dessas abordagens têm sido corroboradas, pelo crescente número de publicações que descrevem o uso dessas estratégias na identificação de candidatos promissores a fármacos, muitos deles passando por ensaios clínicos e sendo aprovados para uso terapêutico (Eder et al., 2014).

Nesse contexto, a química medicinal acaba atuando em diversas áreas do conhecimento de forma multidisciplinar. Primeiramente, preparando ou selecionando compostos apropriados para testes biológicos. Caso um ou uma série de compostos apresente atividade contra determinado alvo, o químico medicinal irá atuar no entendimento dos possíveis mecanismos de ação, nos processos de interação molecular e estrutural, e se possível ainda, em níveis energéticos (Copeland, 2002).

O conhecimento a respeito da forma com que esses compostos são inativados através do metabolismo *in vivo* e os parâmetros físico-químicos que determinam a biodisponibilidade dos compostos quando

administrados pela via oral, também se fazem necessárias. Além disso, ainda é preciso estabelecer uma relação entre a estrutura química e a atividade biológica (SAR), visando melhorar a eficácia em modelos *in vitro* e a segurança nos modelos animais (Segel, 1993).

A análise de SAR é de extrema importância na otimização de compostos em química medicinal, uma vez que, a partir dos resultados obtidos, é possível planejar locais de substituição dos grupos funcionais que podem determinar atividades biológicas específicas capazes de aumentar a potência e a seletividade de compostos promissores (Bajorath, 2013). Outra abordagem é utilizar as relações quantitativas estrutura-atividade/propriedade (QSAR/QSPR), para estimar eventos associados à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) (Berhanu et al., 2012).

É evidente que cada vez mais, essas abordagens multidisciplinares e integradas irão se tornar indispensáveis na realização de estudos experimentais e computacionais para avaliar a farmacodinâmica e farmacocinética de moléculas com alto potencial para se tornarem candidatas a fármaco (Ferreira et al., 2018).

#### **1.4 Importância dos Produtos Naturais**

A natureza é um valioso reservatório de novos compostos bioativos. A utilização de produtos naturais para tratar moléstias é tão antiga quanto a civilização humana (Lahlou, 2013), tendo seu uso comprovado por documentos ancestrais originários da Índia, África do Norte e China (Phillipson, 2001).

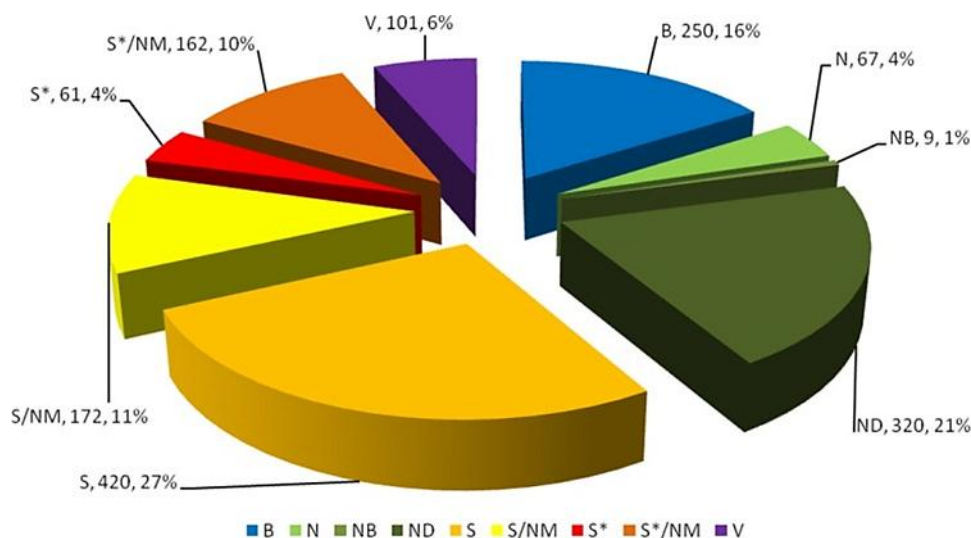
O “Ebers Papyrus”, o primeiro registro conhecido da prática farmacêutica egípcia, data de 1500 a.C. Nele constam, a utilização de mais de 700 compostos, principalmente de origem vegetal, detalhando a utilização em diferentes formulações, incluindo gargarejos, infusões,



pílulas e pomadas, com cerveja, leite, vinho e mel sendo comumente utilizados como veículos (Newman e Cragg, 2007). Outros escritos ainda incluem, a utilização do alho para problemas circulatórios e cardíacos e mandrake para alívio da dor (Kong et al., 2003).

Tradicionalmente, fármacos anticâncer tais como taxol (*Taxus brevifolia*), vinblastina (*Catharanthus roseus*) e fármacos antimaláricos como quinina (*Cinchona spp.*) e artemisinina (*Artemisia annua*), utilizadas em terapias combinadas como tratamento de primeira escolha, foram todas descobertas a partir de produtos naturais e são utilizados até hoje no tratamento dessas doenças (Thomford et al., 2018). Existem também numerosos produtos naturais como estratégia para descoberta de novos fármacos com promissora atividade contra tripanossomatídeos (Jones et al., 2013; Singh et al., 2014; Althaus et al., 2017).

Aproximadamente 60% de todos os fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) ou pela Agência Médica Europeia (EMA) têm produtos naturais como protótipo (**Figura 8**). Dentre esses fármacos, estão: o AZT e o aciclovir, provenientes de esponjas marinhas; o captopril desenvolvido a partir do veneno de serpentes; paclitaxel e morfina, ambas isoladas de plantas (Wani et al., 1971; Patridge et al., 2016), entre outros.



**Figura 8.** Origem dos 1562 fármacos desenvolvidos no período de 1981 a 2014 (em porcentagem), (B) macromolécula biológica: peptídeos, proteínas, etc; (N) produto natural inalterado; (NB) extrato botânico; (ND) produto natural modificado: semissintético; (S) fármaco totalmente sintético; (S/NM) composto sintético indicando inibição competitiva do substrato do produto natural (S\*), (S\*/NM) composto sintético com um farmacóforo natural; /NM indicando uma inibição competitiva; e (V) vacina; **Fonte:** Adaptado de Newman, 2016.

Atualmente, a medicina moderna é desenvolvida com base no conhecimento científico e nas tentativas observacionais dos cientistas. No entanto, o conhecimento relacionado à medicina tradicional tem sido um fator importante na investigação de plantas medicinais e na produção de produtos farmacêuticos, principalmente a partir do conhecimento antigo de nossos ancestrais (Brahmachari, 2012). Além disso, aproximadamente 80% dos medicamentos à base de plantas estão de acordo com seu uso etnofarmacológico (Dias et al., 2012).

A maioria dos programas para desenvolvimento de novos fármacos para protozoários utilizam a triagem fenotípica de bibliotecas químicas sintéticas para encontrar compostos ativos, porém, tais bibliotecas são muitas vezes limitadas em diversidade estrutural (Fox et al., 2006). Sendo assim, os produtos naturais oferecem uma fonte alternativa de

compostos químicos altamente subexplorados que podem ser utilizados como modelos para a síntese de novos fármacos (Koehn e Carter, 2005; Beghyn et al., 2008).

No entanto, a pesquisa de novos candidatos a fármacos a partir de produtos naturais é muitas vezes complexa, uma vez que, a atividade terapêutica dos extratos vegetais é geralmente devida à ação sinérgica e simultânea de vários compostos químicos (Li e Weng, 2017; Leonti e Verpoorte, 2017). Além disso, também existem compostos com componentes interferentes, como os taninos polifenólicos (Wall et al., 1996) e PAINS que se referem a compostos promíscuos, os quais, devido a suas características estruturais reativas, não estabelecem interações seletivas, podendo gerar resultados falso negativos em uma série de ensaios (Gläsera e Holzgrabe, 2016).

Apesar disso, é evidente que os avanços tecnológicos tornaram possíveis o entendimento da complexidade dos produtos naturais. Afinal, um número impressionante de fármacos *blockbuster* foram isolados ou sintetizados a partir de compostos de origem natural, fazendo dessa abordagem, uma estratégia com alto potencial de sucesso (Thomford et al., 2018).

## 1.5 Família Lauraceae

A ordem Laurales tem como maior representante a família Lauraceae (APG III, 2009), que é conhecida desde a antiguidade, por apresentar registros de espécies dos gêneros *Cinnamomum* Schaeff e *Persea* Mill, datados da época do imperador chinês Chen-Nung (2800 a.C). Outra espécie, bastante conhecida na história, na Europa Clássica, é *Laurus nobilis*, o louro, dedicado ao deus Apolo (Kostermans, 1952).

A família Lauraceae possui distribuição pantropical sendo bem representada na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar, porém

pouco representativa no sul da África (Cronquist, 1992). Possui cerca de 50 gêneros e 2.500-3.000 espécies (Rohwer 1993a; van der Werff e Richter 1996). No Brasil, estão presentes 23 gêneros e 434 espécies, dos quais 18 gêneros e 125 espécies foram descritos na região Nordeste do Brasil (Quinet et al., 2012). Em remanescentes de Floresta Atlântica, a família Lauraceae vem sendo apontada como uma das mais representativas, tanto em número de indivíduos quanto em riqueza de táxons (Quinet e Andreatta, 2002).

Em relação a aspectos econômicos, a família Lauraceae apresenta grande importância na indústria madeireira, sendo utilizada principalmente para mobiliários de luxo (*Ocotea porosa*) (Rizzini, 1971). Além disso, muitas plantas dessa família fornecem óleos essenciais e alcalóides empregados na perfumaria, cosmetologia e na produção de fármacos (Marques, 2001). A família Lauraceae também tem importância culinária, uma vez que, produz frutos comestíveis, como abacate (*P. americana*), especiarias, como canela (*C. verum*), folha de louro (*L. nobilis*) e cânfora (*C. camphora*) (Kubitzki e Kurz, 1984).

No entanto, do ponto de vista ecológico apesar da grande diversidade, a exploração econômica, tem elevado o número de espécies ameaçadas de extinção. De acordo com a lista referendada pela comunidade científica (IUCN 2009) no Brasil, aproximadamente 36 espécies da família Lauraceae estão ameaçadas de extinção.

### **1.6 *Nectandra leucantha***

Pertencente a família Lauraceae, o gênero *Nectandra* foi descrito por Rottboel em 1778, contendo apenas duas espécies, a partir de um manuscrito de Rolander (Rohwer, 1993b). Hoje são reconhecidas 114 espécies, sendo considerado o segundo maior gênero dentro da família Lauraceae no Novo Mundo, depois do gênero *Ocotea* spp., com aproximadamente 350 espécies (Rohwer, 1993b) (**Figura 9**).



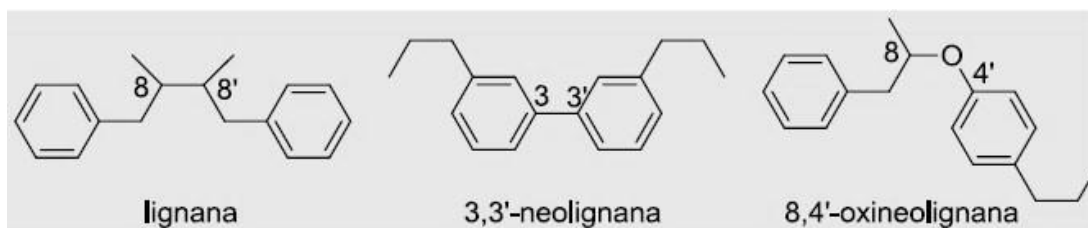
**Figura 9.** *Nectandra leucantha* Nees & Mart (Lauraceae). **Fonte:** UFRGS, 2018.

O gênero é restrito às Américas tropical e subtropical e quase todas as espécies ocorrem entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, onde são encontradas desde o norte da Flórida à Argentina (van der Werff, 1991). No Brasil, encontra-se representado por 43 espécies e possui grande diversidade na floresta Amazônica e Atlântica (Baitello et al., 2003).

O primeiro relato da composição química do gênero *Nectandra* foi publicado por Tapia em 1898, descrevendo a identificação do sesquiterpeno caparrapiol de *N. caparrapi*. Porém, a variedade de substâncias biossintetizadas por esse gênero compreende ainda, terpenos, flavonóides, fenilpropanóides, lignanas, neolignanas e alcalóides (Garcez et al., 2009; Macías-Villamizar et al., 2015; Grecco et al., 2016). Estudos conduzidos principalmente na década de 70, identificaram as neolignanas como os principais metabólitos do gênero *Nectandra* (Gottlieb, 1972; Gottlieb, 1988).

As lignanas e neolignanas compreendem uma classe de produtos naturais com uma grande diversidade de estruturas químicas, formadas pelo acoplamento de duas unidades fenilpropanóides (eugenol, álcool coniferílico, isoeugenol, etc) (Moss, 2000). A forma como estas unidades

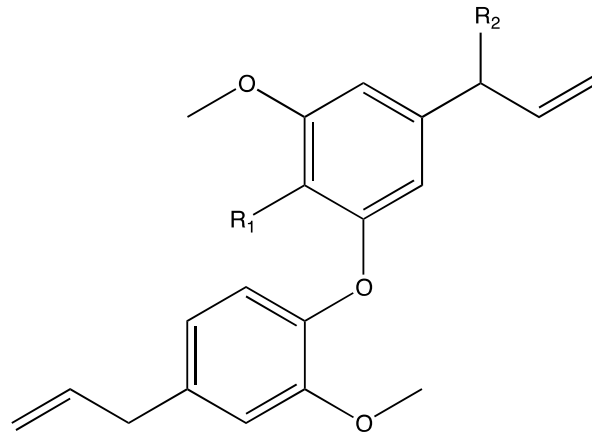
são ligadas entre si determinam sua classificação: as lignanas ligam-se pela posição 8 e 8' da cadeia alifática, enquanto que as neolignanas são geradas pela ligação de qualquer outra posição da unidade fenilpropanoide que não seja 8 e 8' (**Figura 10**) (Moss, 200).



**Figura 10.** Esqueletos carbônicos de lignanas e neolignanas.

As oxineolignanas (geradas das ligações C-O-C') apresentam uma variedade de atividades biológicas, como antifúngica, leishmanicida, antioxidante, esquistossomicida, etc (Zacchino et al., 1997; Alves et al., 1998; Barata et al., 2000; Kónya et al., 2001).

Nosso grupo foi pioneiro em descrever a atividade anti-*Leishmania* (*L.*) *donovani* de três neolignanas isoladas de galhos de *N. leucantha*, sendo que o composto desidrodieugenol B (**Figura 11**) foi o mais ativo contra as formas amastigotas e o menos citotóxico (Costa-Silva et al., 2015).



**Figura 11.** Estrutura do composto desidrodieugenol B isolado dos galhos e folhas de *N. leucantha*. **Fonte:** Costa-Silva et al., 2015.

A atividade imunomoduladora desse composto em macrófagos medulares infectados com *L. (L.) donovani*, também foi observada, apresentando redução dos níveis de citocinas IL-6 e IL-10, exacerbantes na leishmaniose visceral (Costa-Silva et al., 2015). Posteriormente, o grupo também descreveu a atividade anti-*T. cruzi* de neolignanas provenientes das folhas de *N. leucantha*, incluindo também o composto desidrodieugenol B. Esse mesmo trabalho, também demonstrou por estudos *in silico* que os compostos isolados não pertenciam a categoria de PAINS, além de não apresentarem potencial carcinogênico, mutagênico ou genotóxico (Grecco et al., 2017).

Considerando os resultados obtidos e a abundante presença do desidrodieugenol B, tanto nos galhos quanto nas folhas de *N. leucantha*, podemos sugerir a utilização desse composto como um protótipo promissor para a otimização, de uma neolignana mais potente e seletiva para o tratamento da doença de Chagas.

## 1.7 Justificativa e Relevância

A doença de Chagas tornou-se um grave problema de saúde pública, pois além de ser endêmica em 21 países da América Latina, está em expansão para áreas consideradas não endêmicas. Essa enfermidade afeta principalmente áreas pobres, onde o acesso aos cuidados médicos e aos medicamentos são limitados. Além disso, a terapia atual apresenta inúmeras desvantagens como longos esquemas posológicos de administração e toxicidade elevada. Cepas resistentes também dificultam o tratamento, uma vez que, os pacientes não respondem de forma adequada a medicação disponível. Sendo assim, a busca por novos tratamentos para a doença de Chagas é de extrema importância nos dias atuais. Considerando: **i)** a atividade anti-*T. cruzi* do desidrodieugenol B previamente observada; **ii)** perfil toxicológico seguro (determinado *in silico*) por não exibir potencial carcinogênico, mutagênico ou genotóxico; **iii)** não ser considerado um composto de interferência (PAINS); **iv)** ser um composto de baixa massa molecular e fácil síntese; **v)** ter atividade imunomodulatória *in vitro*, o presente trabalho se propôs estudar o potencial anti-*T. cruzi* de novos derivados semissintéticos do desidrodieugenol B e metildesidrodieugenol B.



## 2. OBJETIVOS

### Gerais

Estudar *in vitro* o potencial anti-*Trypanosoma cruzi* de novos derivados semissintéticos do desidrodieugenol B e metildesidrodieugenol B, isolados da planta *Nectandra leucantha* e selecionar um composto para avaliação dos possíveis mecanismos de ação antiparasitária, potencial imunomodulatório e do perfil farmacocinético.

### Específicos

1. Avaliar *in vitro* a Concentração Efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) em formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* de 24 novos derivados semissintéticos.
2. Avaliar *in vitro* a Concentração Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) em células de mamífero.
3. Estudar *in silico* a biodisponibilidade da série e avaliar sua semelhança a compostos de interferência (PAINS).
4. Avaliar as relações de estrutura-atividade (SAR) da série semissintética.
5. Estudar os possíveis mecanismos de ação de um composto ativo em ambas as formas do parasita, avaliando *in vitro*:
  - a. Alterações na permeabilidade da membrana plasmática;
  - b. Alterações no potencial de membrana plasmática ( $\Delta\psi_p$ );
  - c. Alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ );
  - d. Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS);
  - e. Alterações morfológicas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
6. Estudar o potencial imunomodulatório do composto selecionado em macrófagos medulares infectados e não infectados com o parasita.
7. Determinar o perfil farmacocinético *in vitro* do composto selecionado.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

Alamar Blue<sup>®</sup> (resazurin), meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) sem vermelho de fenol, meio Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-120 minutos-tetrazólio), foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Sytox Green<sup>®</sup>, Bisoxonol (Bis-(1,3-Diethylthiobarbituric Acid) Trimethine Oxonol), H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), JC-1 (5,5',6,6'- tetrachloro- 1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide), foram adquiridos da Molecular Probes<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>). Soro Fetal Bovino (SFB) foi obtido da Gibco e sulfato de gentamicina da Hipolabor Farmacêutica. Kit CBA (Cytometric Bead Array) Mouse Inflammation foi obtido da BD Biosciences e todos os outros reagentes não mencionados foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

#### 3.2 Animais de Experimentação

Camundongos BALB/c fêmeas foram fornecidos pelo biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL) e mantidos em caixas esterilizadas em ambiente controlado, recebendo água e alimento *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (Projeto CEUA-IAL/Pasteur nº 03/2011).

#### 3.3 Parasitas

As formas tripomastigotas foram cultivadas em células LLC-MK2 com meio RPMI-1640, suplementado com 2% de SFB a temperatura de 37°C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> (Kesper et al., 2000; Reimão et al., 2008). Tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) isolados de cultura celular foram

utilizados para a triagem *in vitro* e infecção de macrófagos para obtenção das formas amastigotas.

### 3.4 Células de Mamíferos

Fibroblastos de tecido conjuntivo de camundongos, NCTC clone 929 (ATCC<sup>®</sup> CCL-1<sup>™</sup>), foram fornecidos pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz-SP e mantidos em meio RPMI-1640 com 10% de SFB a 37°C em estufa com 5% CO<sub>2</sub>.

Macrófagos peritoneais foram coletados por meio da lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c com meio RPMI-1640 acrescido de 10% de SFB. Foram obtidos também macrófagos medulares, a partir da lavagem do fêmur de camundongos BALB/c em meio RPMI-1640 suplementado com 20% de SFB e 10% de sobrenadante de células NCTC, previamente incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante uma semana. Estas células, secretam no sobrenadante da cultura um fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), que é necessário para diferenciação das células de medula óssea em macrófagos medulares (Weischenfeldt e Porse, 2008).

### 3.5 Derivados Semissintéticos

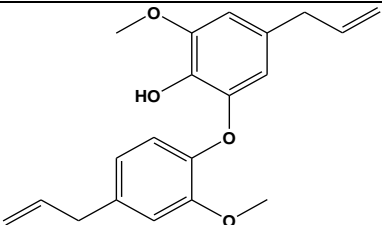
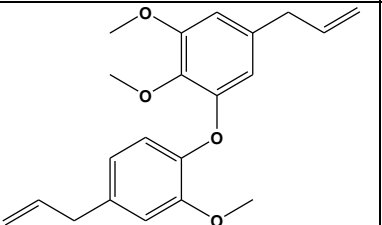
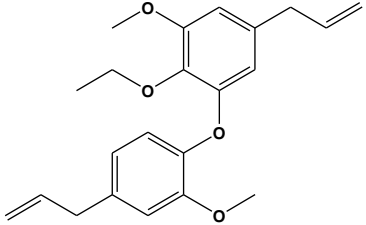
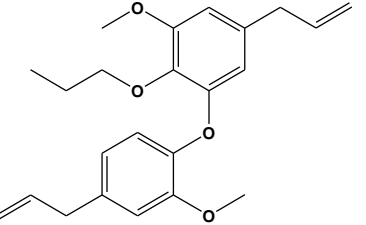
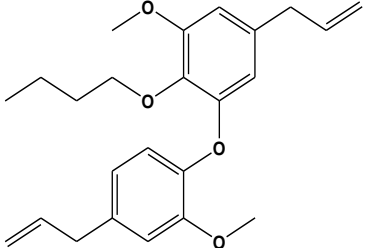
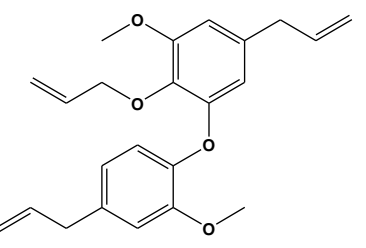
Através de uma parceria entre o Instituto Adolfo Lutz (São Paulo), a Universidade Federal do ABC (São Paulo) e a Universidade de Oxford (Reino Unido), 24 derivados semissintéticos foram preparados a partir de alterações químicas dos compostos desidrodieugenol B e metildesidrodieugenol B, isolados dos galhos da planta *N. leucantha*.

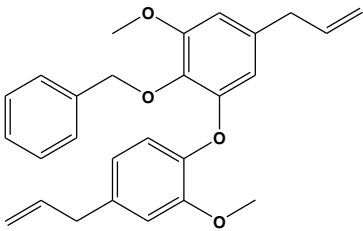
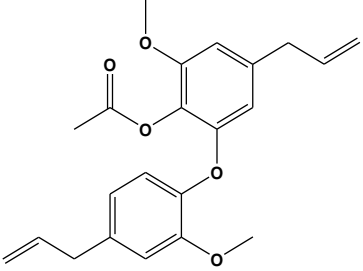
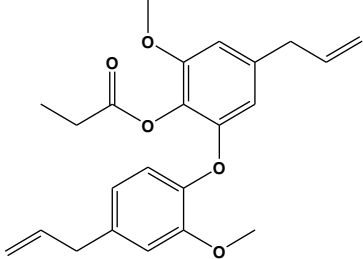
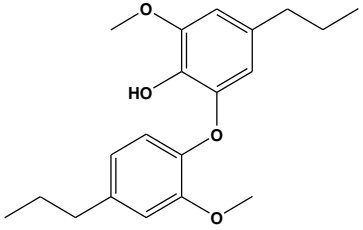
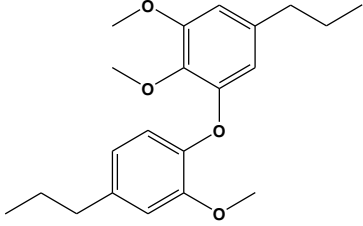
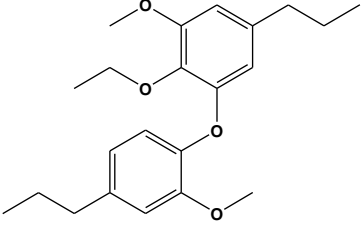
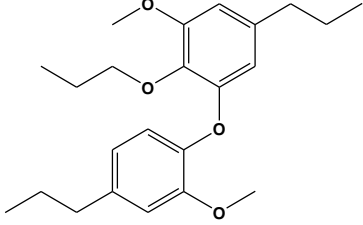
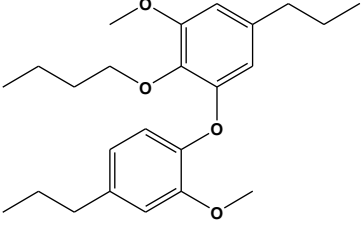
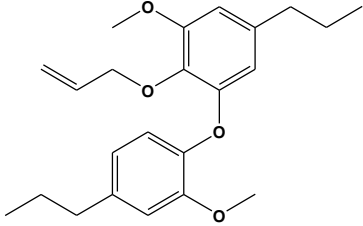
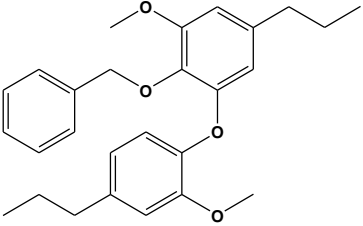
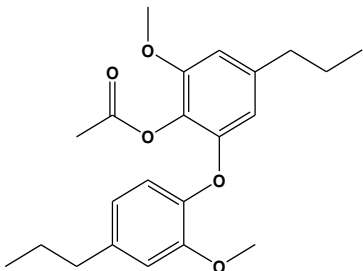
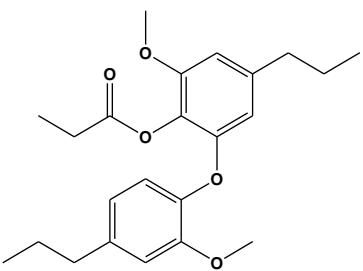
Os galhos foram coletados em março de 2014, no Parque Ecológico do Perequê, na cidade de Cubatão (São Paulo, Brasil) (Saraiva, 2018). As neolignanas foram isoladas pelo grupo do Prof<sup>o</sup> Dr. João Henrique Ghilardi Lago (Centro de Ciências Naturais e Humanas,

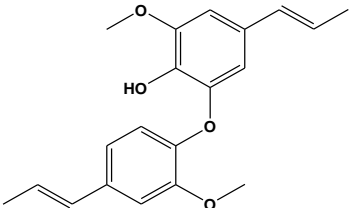
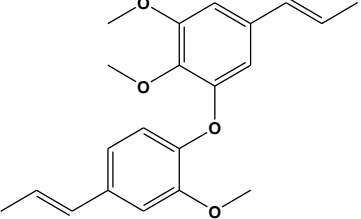
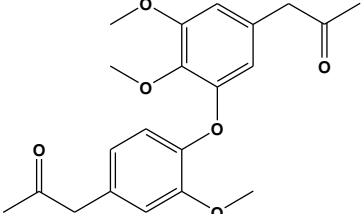
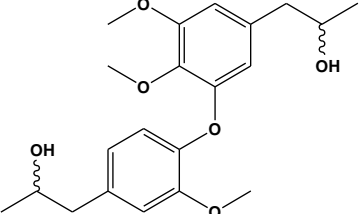
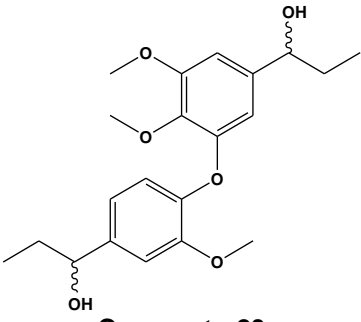
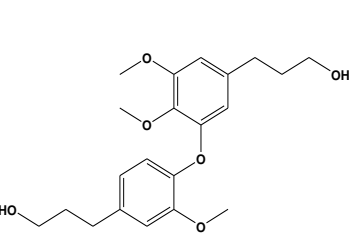
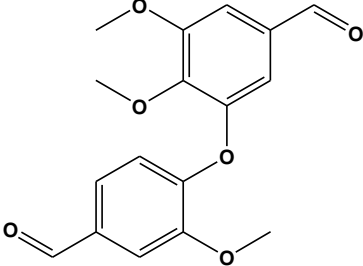
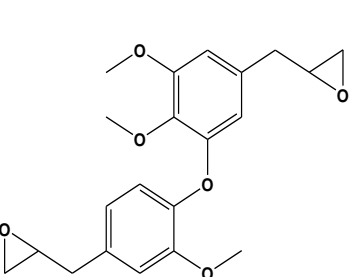
Universidade Federal do ABC, Santo André - SP) e as modificações químicas foram realizadas pelo grupo do Prof<sup>o</sup> Dr. Edward Anderson (Departamento de Química, Universidade de Oxford, Oxford-UK).

Os compostos foram alterados a partir da estrutura original das neolignananas previamente isoladas, sendo posteriormente, caracterizados por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e EM (Espectrometria de Massas) de alta resolução. O grau de pureza foi superior a 97%, comprovado por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Saraiva, 2018) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Estrutura e massa molecular (MM) do desidrodieugenol B, metildesidrodieugenol B e derivados semissintéticos.

Estrutura Molecular	MM	Estrutura Molecular	MM
 <p><b>Composto 1</b> desidrodieugenol B (Produto Natural)</p>	326,1518	 <p><b>Composto 2</b> metildesidrodieugenol B (Produto Natural)</p>	340,1675
 <p><b>Composto 3</b></p>	354,1831	 <p><b>Composto 4</b></p>	368,1988
 <p><b>Composto 5</b></p>	382,2144	 <p><b>Composto 6</b></p>	366,1831

 <p><b>Composto 7</b></p>	416,1988	 <p><b>Composto 8</b></p>	368,1624
 <p><b>Composto 9</b></p>	382,1780	 <p><b>Composto 10</b></p>	330,1831
 <p><b>Composto 11</b></p>	344,1988	 <p><b>Composto 12</b></p>	358,2144
 <p><b>Composto 13</b></p>	372,2301	 <p><b>Composto 14</b></p>	386,2457
 <p><b>Composto 15</b></p>	370,2144	 <p><b>Composto 16</b></p>	420,2301
 <p><b>Composto 17</b></p>	372,1937	 <p><b>Composto 18</b></p>	386,2093

 <p><b>Composto 19</b></p>	326,1518	 <p><b>Composto 20</b></p>	340,1675
 <p><b>Composto 21</b></p>	372,1573	 <p><b>Composto 22</b></p>	376,1886
 <p><b>Composto 23</b></p>	376,1886	 <p><b>Composto 24</b></p>	362,1729
 <p><b>Composto 25</b></p>	316,0947	 <p><b>Composto 26</b></p>	372,1573

Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO. Para os ensaios, a concentração do solvente não ultrapassou 0,5% (v/v) do volume final dos poços, para não causar danos adicionais aos parasitas e as células.

### **3.6 Determinação *In Vitro* da Concentração Efetiva 50% (CE<sub>50</sub>)**

Os compostos foram diluídos em série utilizando-se meio RPMI-1640 em placas de 96 poços e em seguida formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionadas na concentração ( $1 \times 10^6$  parasitas/poço).

As placas foram mantidas a temperatura de 37°C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> durante 24h. Após esse período para a determinação da viabilidade dos parasitas, foi adicionado 20 µL de resazurina a 10%. As placas permaneceram incubadas por mais 20h sob as mesmas condições.

Ao final do ensaio, a leitura foi realizada por absorbância em espectrofluorímetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 540 nm e emissão de 570 nm (Gehrke et al., 2013). Todos os experimentos realizados utilizaram o fármaco benznidazol como padrão e células não tratadas como controle negativo (100% viabilidade).

### **3.7 Determinação *In Vitro* da Concentração Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>)**

Células NCTC clone L-929 (ATCC) foram adicionadas ( $6 \times 10^4$  células/poço) em placas de 96 poços e incubadas a 37°C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> durante 48h com os compostos diluídos serialmente em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB.

A viabilidade celular foi determinada pela adição de MTT (0,5 mg/mL/poço) e incubação durante 4h. A reação foi interrompida com a adição de SDS (10%) e após 24h a leitura da placa foi realizada em espectrofluorímetro (FilterMax F5Multi-Mode) com absorbância de 570 nm (Tada et al., 1986).

O fármaco benznidazol foi utilizado como padrão e células não tratadas serviram como controle negativo (100% viabilidade). Para

verificar a possível ocorrência de interferências na absorvância, controles contendo apenas os compostos e MTT também foram utilizados.

### 3.8 Amastigotas Intracelulares

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram adicionados ( $1 \times 10^5$  células/poço) em placas NUNC de 16 poços em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, e incubados a 37°C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> durante 24h.

Posteriormente, foi realizada a infecção com tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção 10:1 (tripomastigotas/macrófago) e as placas foram incubadas durante 4h. Após esse período, foi realizada uma lavagem para remoção dos parasitas não internalizados, para o início do tratamento.

Os macrófagos infectados foram tratados com os compostos diluídos serialmente em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de SFB, por 48h sob as mesmas condições descritas anteriormente (Tempone et al., 2007). Ao final do experimento, as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Para determinação da concentração efetiva 50%, foram contados em microscópio óptico 200 macrófagos/poço e as respectivas amastigotas intracelulares presentes (Chang et al., 1986).

### 3.9 Determinação do Índice de Seletividade

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

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



### **3.10 Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática**

Para avaliar as possíveis alterações na permeabilidade da membrana plasmática celular, foi utilizada a sonda Sytox Green<sup>®</sup>, um marcador fluorescente de ácidos nucleicos e impermeável a células viáveis. O fluoróforo é capaz de penetrar facilmente na célula, quando está se encontra comprometida (Johnson e Spence, 2010). Desta forma, o aumento na captação da fluorescência, está diretamente relacionado à quantidade de fluoróforo que se liga aos ácidos nucleicos, indicando possíveis alterações na permeabilidade celular.

Tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionados ( $2 \times 10^6$  parasitas/poço) em placas pretas de 96 poços e incubados com Sytox Green<sup>®</sup> (1  $\mu$ M) a 37°C estufa com 5% CO<sub>2</sub> por 15 minutos, juntamente com o composto selecionado. A fluorescência foi monitorada a cada 20 minutos durante 60 minutos. Todas as leituras foram realizadas no espectrofluorímetro (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtros de excitação e emissão de 485 nm e 520 nm, respectivamente (Chicharro et al., 2001).

A permeabilização máxima foi obtida na presença de Triton-X100 0,5% (v/v) e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (100% viabilidade, membrana íntegra) (Kulkarni et al., 2009). Para verificar a possível ocorrência de interferências na fluorescência, controles contendo apenas o composto e o fluoróforo foram adicionados em todos os experimentos.

### **3.11 Alterações Morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Tripomastigotas de *T. cruzi* ( $1 \times 10^6$ ) foram incubados com o composto selecionado em meio RPMI-1640 sem SFB, a 37°C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> durante 60 minutos. Depois, os parasitas foram lavados

duas vezes em PBS, pH 7,2 e aderidos em lamelas previamente revestidas com poli-L-lisina aquosa a 0,1% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os parasitas foram ressuspensos e fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, contendo sacarose a 0,146 M e CaCl<sub>2</sub> 5 mM durante 60 minutos à temperatura ambiente. O preparo da amostra para análise foi feito conforme descrito em (Akers et al., 2013). As imagens foram analisadas e fotografadas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (Quanta-FEG).

### **3.12 Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ( $\Delta\psi_p$ )**

As possíveis alterações na despolarização do potencial de membrana plasmática foram medidas utilizando a sonda Bisoxonol; bis (1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina-oxonol [DiSBAC2 (3)] (Luque-Ortega e Rivas, 2010). Devido ao potencial negativo da membrana plasmática, a ligação dessa sonda fluorescente é impedida. Uma vez que, o potencial da membrana plasmática é alterado, a sonda insere-se na bicamada lipídica aumentando sua fluorescência.

Tripomastigotas de *T. cruzi* ( $2 \times 10^6$  parasitas/poço) foram lavados com HBSS + Glicose, e incubados com o composto selecionado a 37°C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> por 60 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,2  $\mu$ M de [DiSBAC2 (3)] num volume final de 500  $\mu$ L/tubo e incubou-se novamente a 37°C durante 10 minutos.

Após esse período, as amostras foram lidas em citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific). Gramicidina D (0,5  $\mu$ g/mL) foi utilizada como controle positivo do experimento. Parasitas não tratados foram utilizados como controles negativos. Dois experimentos independentes foram realizados, cada um com amostras duplicadas.

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

A sonda JC-1 é um marcador de potencial que se acumula na mitocôndria, cujo espectro de emissão varia entre o verde (530 nm) e o vermelho (590 nm). Em baixas concentrações, existe na forma de monômeros (fluorescência verde) e em altas concentrações, na forma de J-agregados (fluorescência vermelha). Considerando que a formação de J-agregados aumenta linearmente com o potencial da membrana mitocondrial, a despolarização pode ser analisada então pela diminuição da razão de fluorescência vermelha/verde (Cossarizza et al., 1993; Johnson e Spence, 2010).

Tripomastigotas de *T. cruzi* ( $2 \times 10^6$  parasitas/poço) foram incubados com o composto selecionado a 37°C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> por 120 minutos. Uma lavagem foi realizada e posteriormente JC-1 (10  $\mu$ M) foi adicionado. Após 20 minutos de incubação a fluorescência foi medida em citômetro de fluxo (Atunne NxT) com filtro de excitação 488 nm e emissão 530 nm (BL-1) e 574 nm (BL-2).

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado por meio da razão BL-2/BL-1 (vermelha/verde) (Mukherjee et al., 2002). A despolarização máxima foi obtida na presença de CCCP (50  $\mu$ M) e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (100% viabilidade, potencial normal).

### 3.14 Alterações na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A sonda H<sub>2</sub>DCFDA é um marcador não fluorescente, permeável a células. Após a clivagem de seus grupos acetato por esterases intracelulares e sofrer oxidação, é convertido para a forma fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). A utilização deste marcador torna

possível a observação de alterações celulares na produção de espécies reativas de oxigênio (Johnson e Spence, 2010).

Tripomastigotas de *T. cruzi* ( $2 \times 10^6$  parasitas/poço) foram adicionados em placas pretas de 96 poços e incubados a 37°C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> por 120 minutos juntamente com o composto selecionado. Posteriormente, H<sub>2</sub>DCFDA (5 μM) foi acrescentado, e após 15 minutos de incubação a fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtros de excitação e emissão de 485 nm e 520 nm, respectivamente (Mukherjee et al., 2002). Azida foi utilizada como controle positivo e parasitas não tratados como controle negativo (100% viabilidade, produção basal).

### **3.15 Avaliação da Ativação de Macrófagos Medulares**

Para complementar os estudos de mecanismo de ação, a ativação de macrófagos medulares também foi avaliada. Nesse sentido, é possível estabelecer se o composto induz uma resposta diretamente ligada ao parasita ou se a imunomodulação da célula hospedeira desempenha um papel significativo.

Macrófagos medulares ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram adicionados em placas de 24 poços e incubados a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Após esse período, foi realizada a infecção com tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção 10:1 (amastigotas/macrófago) e as placas foram novamente incubadas durante 4h. Foi realizada uma lavagem para remoção dos parasitas não internalizados. Posteriormente, os macrófagos foram tratados com o composto selecionado em três concentrações (40, 20 e 10 μM) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, por 48h sob as mesmas condições descritas anteriormente. Ao final da incubação, o sobrenadante dos poços foi coletado para realização dos estudos subsequentes de dosagem de

citocinas. Os experimentos foram realizados também utilizando macrófagos não infectados, sob as mesmas condições.

### **3.16 Dosagem de Citocinas**

O Kit CBA foi utilizado para quantificar as citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12p70. Através de *beads* de tamanho e intensidade de fluorescência conhecidos, analitos solúveis podem ser detectados. Essencialmente, o Kit contém *beads* de captura conjugadas a um anticorpo específico para a citocina de interesse e o reagente de detecção que é uma mistura de anticorpos conjugados, ligados ao fluoróforo PE.

Quando essas *beads* de captura e o reagente de detecção são incubados com uma amostra desconhecida contendo o analito, são formados os complexos sanduíche (*bead* de captura + analito + reagente de detecção). A fluorescência dos complexos é proporcional a quantidade de analito ligado e pode ser medida utilizando citometria de fluxo (Morgan et al., 2004).

A quantificação de citocinas foi realizada no sobrenadante obtido a partir de macrófagos infectados e não infectados utilizando o Kit CBA conforme as instruções do fabricante. As fluorescências foram medidas em citômetro de fluxo (BD LSRFortessa) e a análise dos dados foi realizada utilizando o software FCAP Array (v,3). A produção máxima de citocinas foi obtida na presença de LPS 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e células não tratadas foram utilizadas como controle negativo (100% viabilidade, produção basal).

### **3.17 Teste de Solubilidade**

A solubilidade aquosa do composto selecionado foi determinada utilizando nefelometria a laser. O composto foi solubilizado na

concentração de 10 mM em DMSO. A diluição em série foi realizada no intervalo de concentração entre 250 e 12  $\mu$ M em placa contendo água Milli-Q, não sendo ultrapassada a concentração final de 2,5% de DMSO (Hoelke et al., 2009). As amostras em triplicata foram transferidas para uma placa de poliestireno de fundo plano para leitura no equipamento NEPHELOstar (BMG Lab Technologies). A quantidade de dispersão do laser causada por partículas insolúveis (unidades de nefelometria relativa, UNR) foram plotadas em relação a concentração do composto utilizando uma regressão segmentar. A solubilidade aquosa foi determinada pelo ponto de inflexão em  $\mu$ M do composto testado.

### **3.18 Índice de Hidrofobicidade Cromatográfica (LogD<sub>7.4</sub>)**

O composto selecionado foi preparado a 0,25 mM a partir da solução estoque de 10 mM em 50/50 (acetonitrila/água) numa placa de 96 poços. Soluções individuais de 1 mg/mL dos 11 compostos de calibração: paracetamol, teofilina, cafeína, benzimidazole, colchicina, carbamazepina, índole, propiofenona, butirofenona, valerofenona e heptanofenona foram solubilizadas em DMSO. A mistura de calibração foi então preparada adicionando-se 100  $\mu$ l de cada uma das soluções de calibração individuais 1 mg/ml a 9 ml de 50/50 (acetonitrila/água) para obtenção de uma concentração final de 10  $\mu$ g/mL (Camurri e Zaramella, 2001). As amostras foram processadas em equipamento Shimadzu SIL-30AC M e analisadas no software Shimadzu LabSolutions v5.91.

### **3.19 Teste de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)**

O ensaio de permeabilidade foi realizado utilizando uma placa BD Gentest™ PAMPA pré-revestida de 96 poços. Cada poço foi dividido em duas câmaras; doadora e receptora, separadas por uma camada tripla lipídica construída em um filtro poroso. O composto foi preparado a partir

da solução estoque de 10 mM em solução salina tamponada com fosfato em pH 7,4 e diluído a 10  $\mu$ M. O composto foi então adicionado na câmara doadora da placa e apenas solução salina tamponada com fosfato foi adicionada na câmara receptora. A placa PAMPA permaneceu à temperatura ambiente por 5h. Após esse tempo, uma alíquota (100  $\mu$ l) foi então removida dos compartimentos doador e receptor sendo adicionadas em 80  $\mu$ l de acetonitrila contendo o padrão interno (donepezil 50 ng/mL) (Baragaña et al., 2016). As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 4°C em 3.270 rpm para sedimentação de proteína e o sobrenadante encaminhado para análise em UPLC-MS/MS no equipamento Quattro Premier XE (Waters Corp. EUA). Atenolol, propranolol e verapamil a 100  $\mu$ M foram utilizados como controles de baixa, média e alta permeabilidade respectivamente.

### **3.20 Teste de Estabilidade em Plasma de Camundongo**

O composto selecionado foi incubado na concentração de 50  $\mu$ M com plasma de camundongo em tampão fosfato pH 7,4. Os inibidores de esterase BNPP (4-Bis Phenyl Nitrophosphate) e PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) foram preparados a 10 mM e concentração final em plasma de 100  $\mu$ M, sendo utilizados como controles negativos do experimento. Após a adição do composto, imediatamente no tempo zero, e então aos 3, 6, 9, 15, 30 e 60 minutos, uma alíquota (80  $\mu$ L) da mistura de incubação foi removida e adicionada em 100  $\mu$ L de acetonitrila contendo o padrão interno (donepezil 50 ng/mL) para interrupção da reação (Yamaori et al., 2006). As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 4°C em 3.270 rpm para sedimentação de proteína e o sobrenadante encaminhado para análise em UPLC-MS/MS no equipamento Quattro Premier XE (Waters Corp. EUA). Procaína a 50  $\mu$ M foi utilizada como um controle positivo para confirmar o desempenho aceitável do ensaio.

### **3.21 Clearance em Hepatócitos de Camundongo**

O composto selecionado foi incubado na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  com hepatócitos de fígado de camundongo Balb/C (fêmeas) na concentração de  $(2,5 \times 10^5)$  células/poço) em meio WME (Williams Media E) e preparados de acordo com as normas do fabricante (Gibco/Invitrogen Life Technologies™). Imediatamente, no tempo zero, e então aos 5, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos, uma alíquota (50  $\mu\text{L}$ ) da mistura de incubação foi removida e adicionada em 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrila contendo o padrão interno (donepezil 50 ng/mL) para interrupção da reação (Arias et al., 1988). As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 4°C em 3.270 rpm para sedimentação de proteína e o sobrenadante encaminhado para análise em UPLC-MS/MS no equipamento Quattro Premier XE (Waters Corp. EUA). Verapamil a 0,5  $\mu\text{M}$  foi utilizado como um controle positivo para confirmar o desempenho aceitável do ensaio.

### **3.22 Análise Estatística**

A determinação dos valores de  $\text{CC}_{50}$  e  $\text{CE}_{50}$  foi realizada a partir de curvas sigmóides dose-resposta e a significância estatística entre amostras foi avaliada através dos valores de P pelo método One-way ANOVA, aplicando o teste Tukey's Multiple Comparison. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 5,0.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Determinação *In vitro* das Concentrações Efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e Citotóxica (CC<sub>50</sub>)

A atividade anti-*T. cruzi* foi avaliada utilizando-se o ensaio colorimétrico de resazurina. Dentre os 24 novos derivados de neolignananas (3 – 26), 6 compostos apresentaram concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) menor que 100 µM contra as formas tripomastigotas com valores de CE<sub>50</sub> entre 7 e 76 µM (**Tabela 3**).

A citotoxicidade foi determinada em células NCTC e após 48h de incubação a viabilidade foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. Dezenove compostos não apresentaram citotoxicidade em células de mamíferos até a concentração mais alta testada de 200 µM. Cinco compostos demonstraram toxicidade com valores de CC<sub>50</sub> entre 57 e 156 µM (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Atividade de neolignananas semissintéticas contra formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, citotoxicidade em células de mamíferos NCTC e Índice de Seletividade.

Composto	CE <sub>50</sub> tripomastigotas <i>T. cruzi</i> (µM) (DP)	CE <sub>50</sub> amastigotas <i>T. cruzi</i> (µM) (DP)	Citotoxicidade NCTC CC <sub>50</sub> (µM) (DP)	IS
<b>1</b> desidrodieugenol B (Produto Natural)*	38,6	86,5	>200	>2,3
<b>2</b> metildesidrodieugenol B (Produto Natural)*	NA	NA	>200	ND
<b>3</b>	NA	NA	>200	ND
<b>4</b>	NA	16,4 ± 0,4	>200	>12
<b>5</b>	NA	NA	>200	ND
<b>6</b>	NA	NA	>200	ND

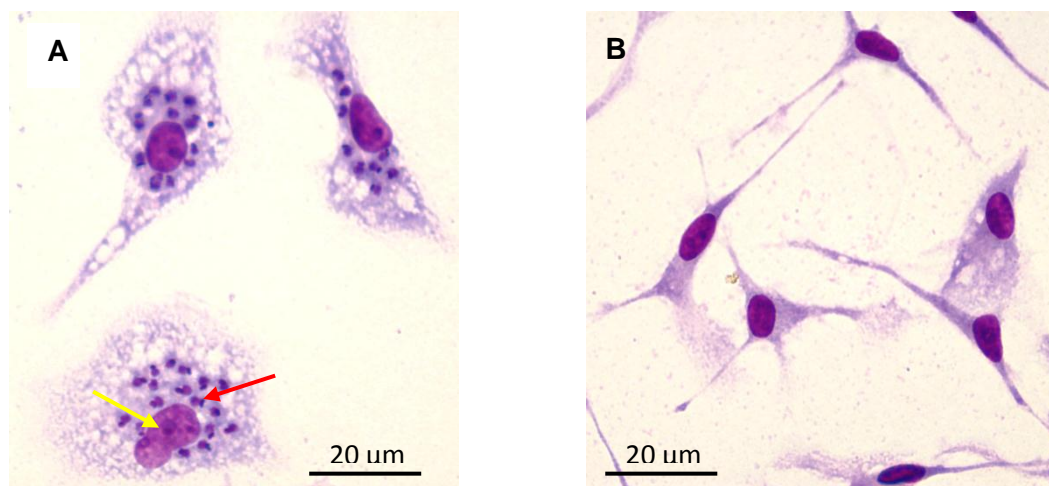
7	NA	9,5 ± 1,3	>200	>21
8	64,2 ± 8,2	8,0 ± 5,8	64,4 ± 4,2	8,0
9	30,5 ± 10,4	10,0 ± 0,8	75,0 ± 13,8	7,5
10	7,9 ± 0,7	NA	57,7 ± 1,1	ND
11	NA	13,3 ± 11,2	>200	>15
12	NA	NA	>200	ND
13	NA	NA	>200	ND
14	NA	NA	>200	ND
15	NA	9,4 ± 3,9	>200	>21
16	NA	7,5 ± 1,1	>200	>26
17	21,5 ± 2,9	NA	66,3 ± 6,0	ND
18	NA	NA	156,1 ± 15,0	ND
19	26,6 ± 5,3	NA	>200	ND
20	NA	12,2 ± 3,5	>200	>16
21	NA	NA	>200	ND
22	NA	NA	>200	ND
23	NA	NA	>200	ND
24	NA	NA	>200	ND
25	NA	NA	>200	ND
26	76,4 ± 18,1	NA	>200	ND
<b>Benznidazol</b>	17,7 ± 1,9	5,0 ± 1,5	>200	40

CE<sub>50</sub> – Concentração Efetiva 50%, CC<sub>50</sub> – Concentração Citotóxica 50%, ND – Não determinado, NA – Não Ativo, DP – Desvio Padrão, \*Grecco et al., 2017.

A atividade contra a forma amastigota intracelular de *T. cruzi* foi determinada a partir da incubação dos compostos com macrófagos peritoneais, previamente infectados com tripomastigotas. Dentre os 24 compostos, 8 apresentaram atividade contra os amastigotas intracelulares, com valores de  $CE_{50}$  entre 7 e 16  $\mu\text{M}$  (**Tabela 3**).

Considerando a relação entre atividade contra amastigotas intracelulares e a citotoxicidade em células NCTC, foi possível observar que o índice de seletividade dos compostos, variou de 7,5 a >26. Benznidazol foi utilizado como fármaco padrão e resultou em valores  $CE_{50}$  de 17,7  $\mu\text{M}$  ( $\pm 1,9$ ) contra tripomastigotas e 5  $\mu\text{M}$  ( $\pm 1,5$ ) contra amastigotas intracelulares (**Tabela 3**).

O composto **8** eliminou 100% dos amastigotas intracelulares, sem afetar a viabilidade das células hospedeiras na concentração mais elevada testada de 30  $\mu\text{M}$  (**Figura 12**) e por esse motivo, foi selecionado para os estudos de mecanismo de ação.



**Figura 12.** Aspectos morfológicos de macrófagos infectados e tratados com o composto **8**. (A) macrófagos infectados e não tratado (controle), (B) macrófagos infectados e tratados com o composto **8** (30  $\mu\text{M}$ ). Microscopia óptica (A - aumento 1000X, B - aumento 400X). Seta amarela: núcleo do macrófago. Seta vermelha: amastigota de *T. cruzi*.

## 4.2 Estudos *in silico* de Biodisponibilidade, PAINS e Análise da Relação Estrutura-Atividade (SAR) dos Derivados Semissintéticos de Neolignanas

Os estudos *in silico* farmacocinéticos, físico-químicos e toxicológicos, associados ao êxito clínico, foram realizados com a série semissintética de neolignanas utilizando o servidor web FAF-Drugs4. O servidor tem como base parâmetros da farmacêutica Lilly<sup>®</sup>, por meio do “Lilly MedChem Rules”, incluindo fosfolipidose, solubilidade aquosa e predições sobre administração oral. Os resultados demonstraram que esta série apresenta uma boa biodisponibilidade oral baseado em 15 descritores físico-químicos para fármacos orais. Foi predito para o composto **8**, uma boa biodisponibilidade oral com base nos filtros “Veber rule”, “Egan Rule”, e “Bayer Oral Property Space Rules”. Além disso, os compostos da série não demonstraram potencial para induzir fosfolipidose. Com base em três filtros disponíveis, nenhum dos derivados semissintéticos apresentaram potencial para atuar como compostos de interferência (PAINS).

Com base na atividade anti-*T. cruzi* do produto natural fenólico desidrodieugenol B **1**, a falta de atividade e ausência de citotoxicidade para o produto natural correspondente (éter metílico metildesidrodieugenol B) **2**, foi hipotetizado que o fenol era importante tanto para a atividade do *T. cruzi* quanto para a citotoxicidade em células de mamífero.

Dentre os 24 novos derivados semissintéticos da série, oito compostos sem o fenol livre demonstraram atividade contra os amastigotas intracelulares e maior potência em comparação ao produto natural **1**. A eterificação do fenol em C4 melhorou consistentemente a seletividade dos compostos. Todos os análogos de éter semissintéticos não demonstraram citotoxicidade até a concentração máxima testada. Dois análogos, éter propílico **4** e éter benzílico **7**, foram mais potentes contra formas amastigotas de *T. cruzi* do que o composto **1**. Os análogos

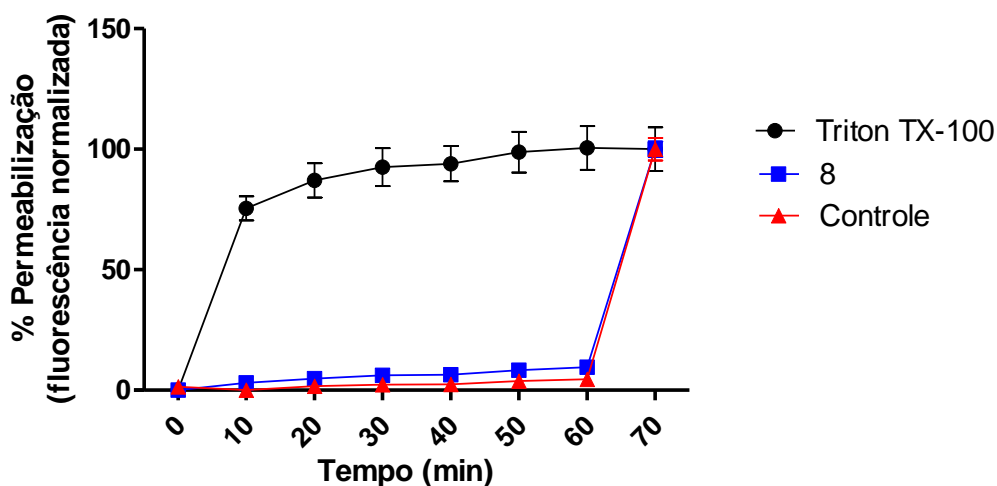
de ésteres **8** e **9** demonstraram um aumento da potência contra os amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e uma leve diminuição de seletividade quando comparados aos análogos de éter **4** e **7**. Apesar da diminuição da seletividade dos ésteres em comparação aos éteres, os ésteres **8** e **9** apresentaram valores de índice de seletividade melhores em comparação ao produto natural **1**. Desta forma, os dados sugeriram que a presença do fenol não era necessária para a atividade destes na forma amastigota intracelular de *T. cruzi*, sendo provável ainda que exerça um papel na citotoxicidade nas células de mamífero. Ainda, os ésteres **8** e **9** apresentaram atividade contra ambas as formas do parasita, ao contrário dos análogos éter **3** e **4**.

Os grupos alílicos parecem desempenhar um papel fundamental na atividade contra o *T. cruzi*. A redução do composto **1** ao análogo totalmente saturado **10** eliminou a atividade em amastigotas de *T. cruzi*, porém, demonstrou pouca influência em relação a atividade contra as formas tripomastigotas, assim como na citotoxicidade. Inversamente, a redução do composto **2** para produzir o composto **11** melhorou drasticamente a atividade em amastigotas e o índice de seletividade.

Os análogos de éter totalmente saturados **12**, **13** e **14** foram inativos. No entanto, éteres insaturados tais como o éter alílico **15** e o éter benzílico **16** exibiram uma atividade robusta contra as formas amastigotas de *T. cruzi*. Os análogos de éster saturados **17** e **18** não foram ativos contra os amastigotas. No entanto, o éter metílico saturado **11** demonstrou atividade, apesar do análogo **2** ser inativo. Análogos substituindo os grupos alílicos pelos grupos doadores de ligação de hidrogênio e aceptores, compostos **21-26**, não exibiram atividade contra as formas amastigotas de *T. cruzi*. Por fim, foi possível observar que o metil éter **20**, o qual apresenta dupla ligação de conformação *trans* interna, foi ativo contra amastigotas de *T. cruzi*. No entanto, o fenol correspondente **19**, não demonstrou atividade contra os amastigotas intracelulares.

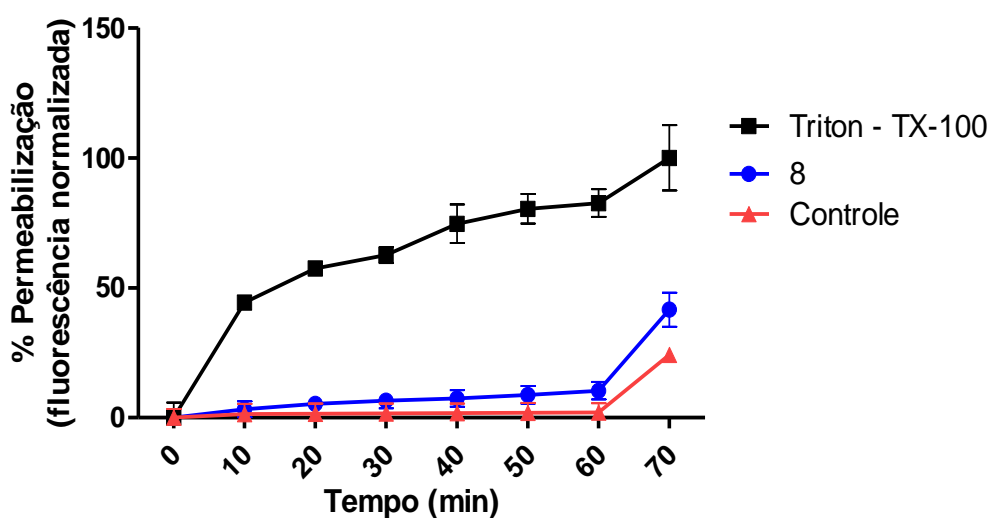
### 4.3 Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática

Utilizando formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o composto **8** foi incubado com a sonda fluorescente Sytox Green<sup>®</sup> para avaliar a permeabilidade da membrana plasmática. Após 60 minutos de incubação pode-se verificar que o composto **8** não induziu alterações significativas quando comparado aos parasitas não tratados. Triton-X100 foi utilizado como controle positivo e incluído no final do ensaio para todos os grupos (**Figura 13**).



**Figura 13.** Avaliação por espectrofluorimetria da permeabilidade da membrana plasmática de tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com o composto **8** na CE<sub>50</sub> (64 µM) utilizando o fluoróforo Sytox Green<sup>®</sup> (excitação 485 nm e emissão 520 nm). Ensaio representativo de duas repetições realizadas.

Para avaliar se o composto poderia induzir alterações na permeabilidade da membrana plasmática em células de mamíferos, macrófagos peritoneais também foram analisados e nenhuma alteração foi observada após 60 minutos (**Figura 14**).

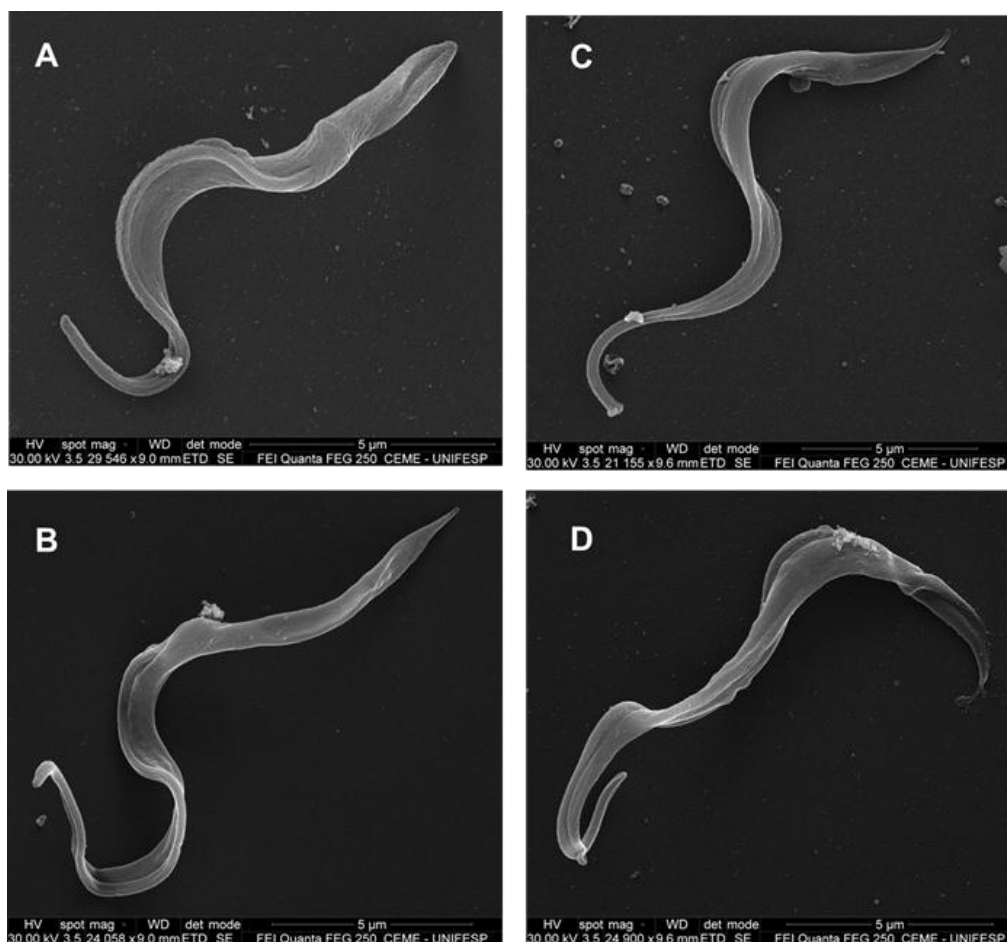


**Figura 14.** Avaliação por espectrofluorimetria da permeabilidade da membrana plasmática de macrófagos tratados com o composto **8** na  $CE_{50}$  (64  $\mu$ M) utilizando o fluoróforo Sytox Green<sup>®</sup> (excitação 485 nm e emissão 520 nm). Ensaio representativo de duas repetições realizadas.

As leituras foram realizadas a cada 20 minutos e a porcentagem de permeabilização da membrana plasmática foi representada com dados normalizados em relação ao último tempo do controle positivo.

#### 4.4 Alterações Morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Tripomastigotas de *T. cruzi* foram incubados com o composto **8** para estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após 60 minutos pode-se observar que a morfologia do parasita, incluindo a membrana plasmática não apresentaram alterações, quando comparados ao grupo não tratado, corroborando os dados observados no ensaio de Sytox Green<sup>®</sup> (**Figura 15**).



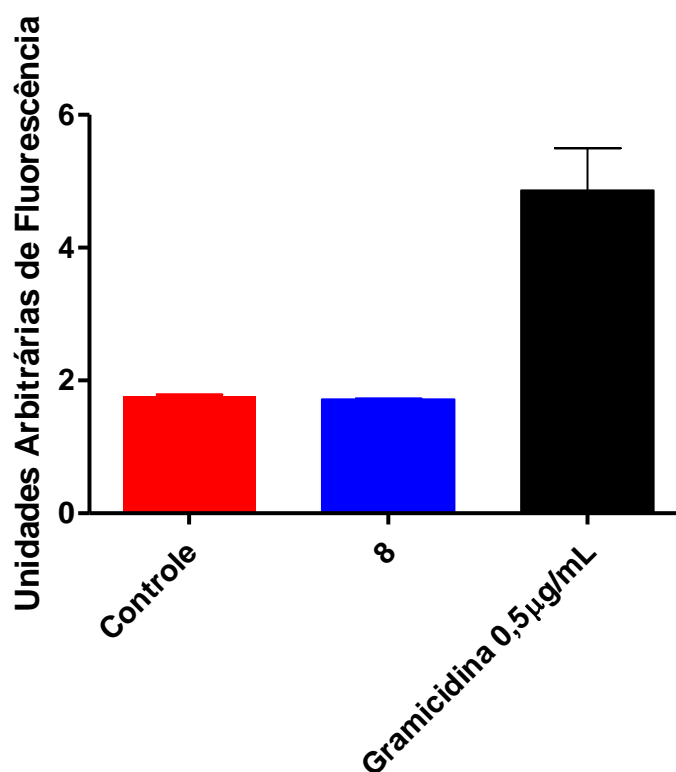
**Figura 15.** Microscopia eletrônica de varredura de formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com o composto **8** na CE<sub>50</sub> (64 μM). (A) e (B) controle não tratado, (C) e (D) parasita tratado com o composto **8** por 60 minutos.

#### 4.5 Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ( $\Delta\psi$ )

O potencial elétrico da membrana plasmática de tripomastigotas de *T. cruzi* foi investigado na presença do composto **8** por meio das análises de citometria de fluxo.

Após 60 minutos de incubação, nenhuma alteração significativa foi observada quando comparado ao controle não tratado (**Figura 16**). A gramicidina, um polipeptídeo antibacteriano comercial, foi utilizado como controle positivo para indução da despolarização do potencial de membrana plasmática.



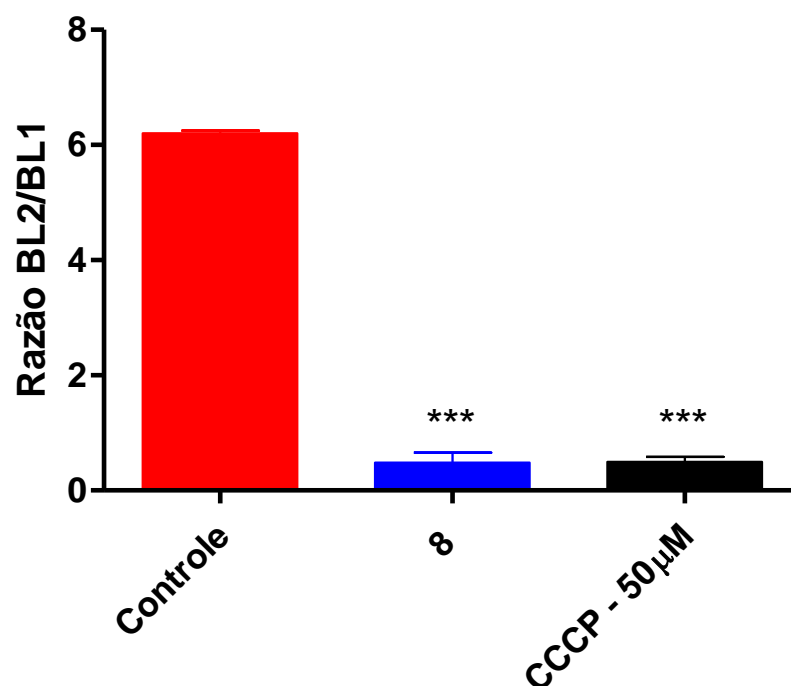


**Figura 16.** Avaliação do potencial de membrana plasmática de tripomastigotas de *T. cruzi*, avaliados por citometria de fluxo e tratados com o composto **8** na CE<sub>50</sub> (64 µM), utilizando a sonda bisoxonol. Ensaio representativo de duas repetições realizadas.

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

Utilizando análises de citometria de fluxo, a capacidade do composto **8** em alterar o potencial de membrana mitocondrial de tripomastigotas de *T. cruzi* foi investigado. O potencial de membrana mitocondrial foi estudado na presença da sonda fluorescente JC-1.

Após 120 minutos de incubação, o composto **8** induziu uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos níveis de fluorescência quando comparado aos parasitas não tratados, resultando na despolarização da membrana mitocondrial (**Figura 17**).

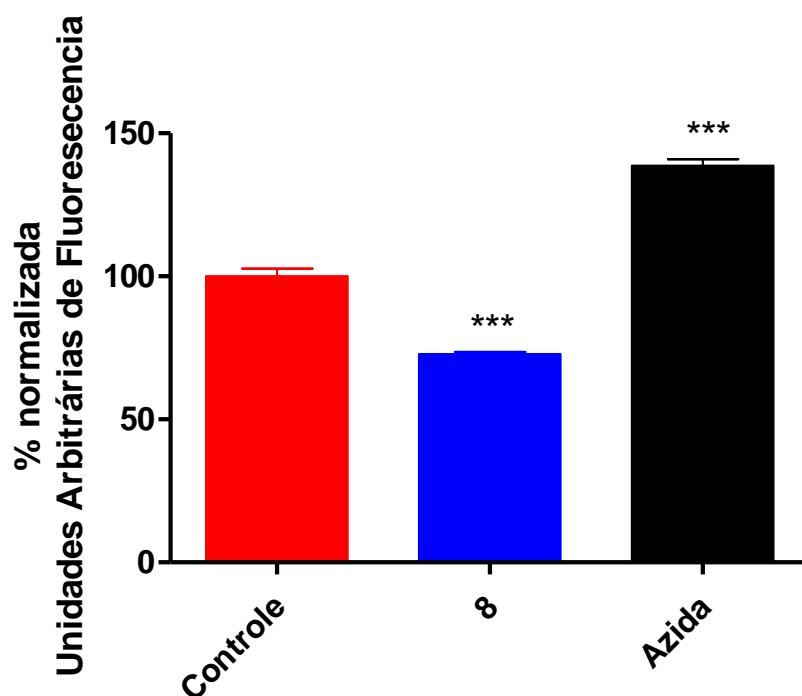


**Figura 17.** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com o composto **8** na CE<sub>50</sub> (64 µM), utilizando a sonda JC-1 (excitação 488 nm e emissão 563/574 nm). Ensaio representativo de duas repetições realizadas. \*\*\*p< 0,001.

O cianeto de carbonila m-clorofenil hidrazona (CCCP) foi utilizado como controle positivo na concentração (50 µM) e resultou em uma significativa despolarização do potencial de membrana mitocondrial.

#### 4.7 Alterações na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

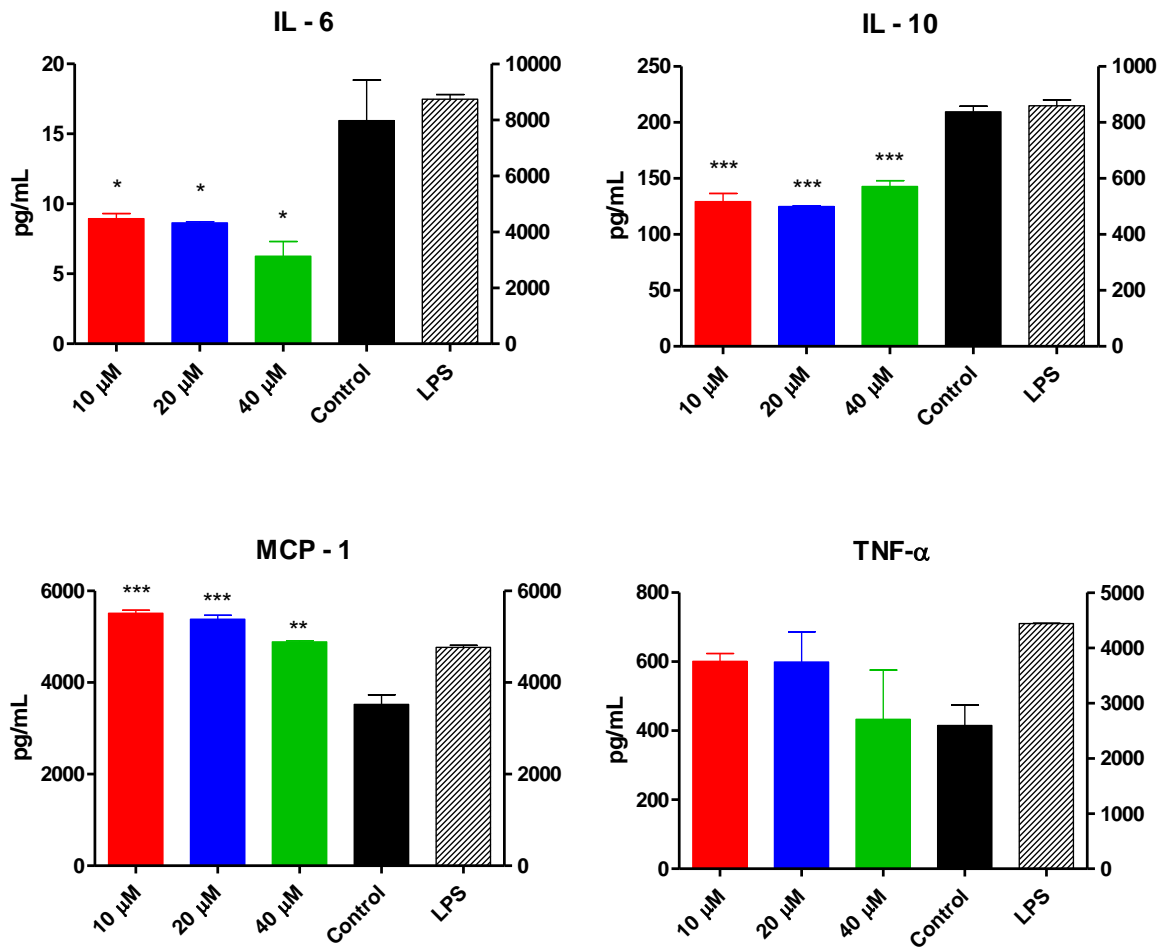
Os níveis de espécies reativas de oxigênio em tripomastigotas foram determinados utilizando a sonda fluorescente H2DCF-DA. O composto **8** reduziu significativamente (p<0,05) os níveis de ROS após o tratamento durante 120 minutos, quando comparado aos parasitas não tratados. Azida sódica foi utilizada como controle positivo do experimento (**Figura 18**).



**Figura 18.** Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com o composto **8** na  $CE_{50}$  (64  $\mu$ M). Ensaio representativo de duas repetições realizadas. \*\*\* $p < 0,001$ .

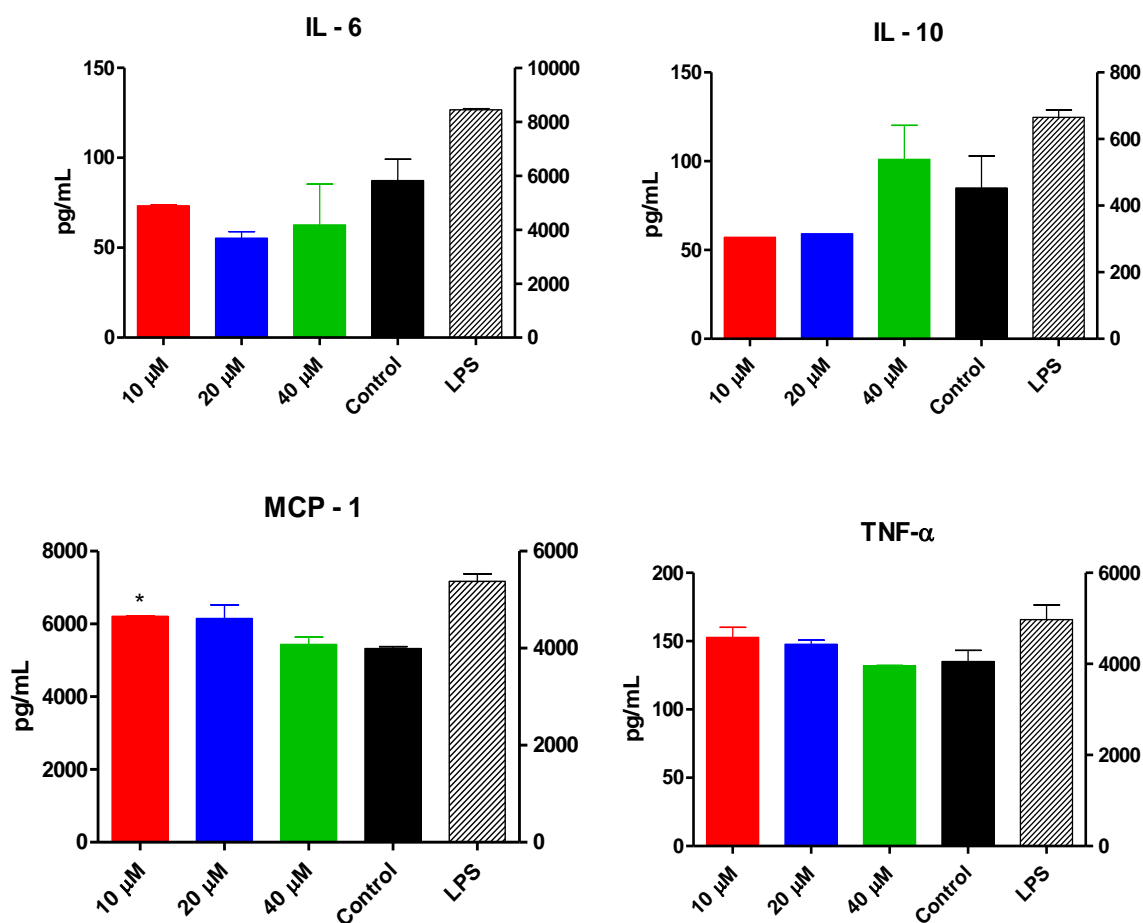
#### 4.8 Dosagem de Citocinas

A capacidade do composto **8** para modular a resposta imunológica dos macrófagos foi investigada utilizando citometria de fluxo. Em macrófagos não infectados, os níveis das citocinas IL-6 e IL-10 foram reduzidos significativamente ( $p < 0,05$ ) após o tratamento com o composto **8** (**Figura 19**). Pode-se observar também, que os níveis da quimiocina MCP-1 foram aumentados de forma significativa ( $p < 0,05$ ) após o tratamento. Já os níveis da citocina TNF- $\alpha$ , não foram alterados de forma significativa nos macrófagos não infectados e tratados com o composto **8** (**Figura 19**).



**Figura 19.** Dosagem de citocinas em macrófagos medulares não infectados, tratados com o composto **8** em três concentrações utilizando o kit CBA. Ensaio representativo de duas repetições realizadas. Limite de detecção: IL-6 (5 pg/mL a 5000 pg/mL); IL-10 (10 pg/mL a 5000 pg/mL); MCP-1 (10 pg/mL a 5000 pg/mL) e TNF-α (5 pg/mL a 5000 pg/mL). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

No entanto, nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis das citocinas IL-6, IL-10 e TNF-α, bem como nos níveis da quimiocina MCP-1 em macrófagos infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* e tratados com o composto **8** em três concentrações diferentes (**Figura 20**). LPS foi utilizado como controle interno dos experimentos.



**Figura 20.** Dosagem de citocinas em macrófagos medulares infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* e tratados com o composto **8** em três concentrações diferentes, utilizando o kit CBA. Ensaio representativo de duas repetições realizadas. Limite de detecção: IL-6 (5 pg/mL a 5000 pg/mL); IL-10 (10 pg/mL a 5000 pg/mL); MCP-1 (10 pg/mL a 5000 pg/mL) e TNF-α (5 pg/mL a 5000 pg/mL).

#### 4.9 Solubilidade cinética

A solubilidade do composto **8** foi avaliada por nefelometria a laser. Nossos resultados mostraram que o composto apresentou solubilidade mínima de 24 μM e máxima de 31 μM, com média de 27,5 μM. Considera-se que um composto com valor de solubilidade inferior a 1 μM é "altamente insolúvel", enquanto que compostos com valor entre 1 e 100 μM e > 100 μM são considerados "parcialmente solúveis" e "solúveis", respectivamente.

#### 4.10 Lipofilicidade LogD<sub>7.4</sub>

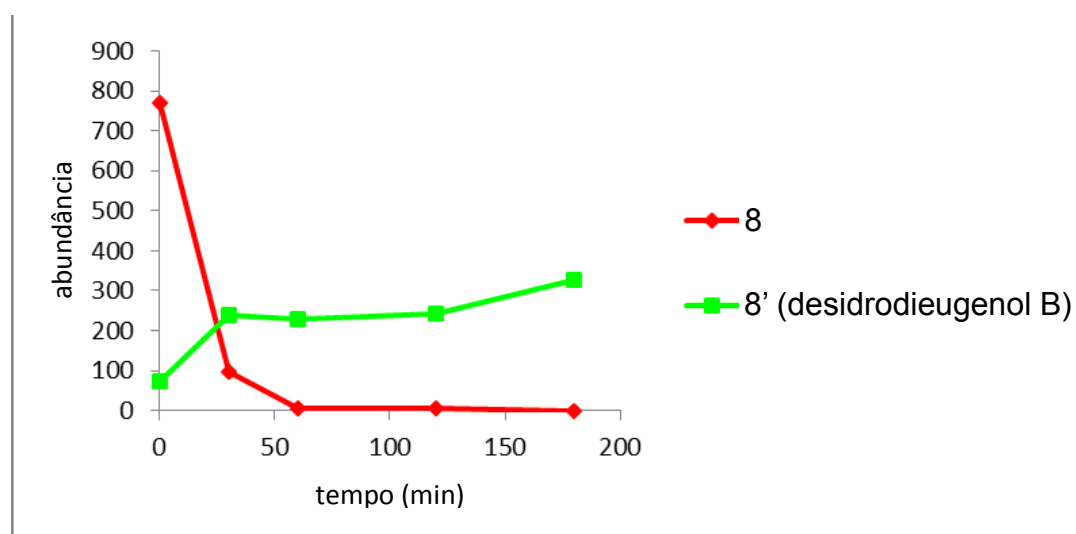
A lipofilicidade do composto **8** foi avaliada utilizando um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-HPLC) de fase reversa e gradiente rápido para determinar o índice de hidrofobicidade cromatográfica (CHI). Nossos dados demonstraram que o composto apresentou valor de CHI LogD<sub>7.4</sub> de 4,1, sendo considerado como moderadamente lipofílico, uma vez que, valores acima de 5 é considerado altamente lipofílico e valores entre 1 e 3 como pouco lipofílico.

#### 4.11 Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)

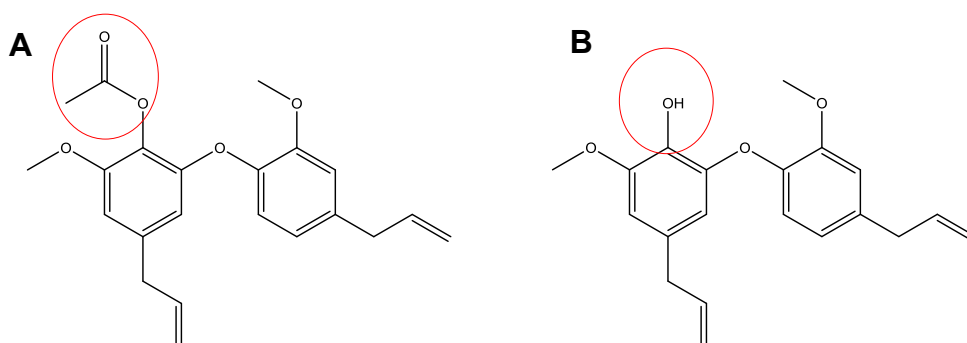
A permeabilidade do composto **8** foi testada no modelo *in vitro* de membrana artificial. O composto apresentou valor de permeabilidade de 0,58 nm/s. Geralmente, os compostos com permeabilidade <100 nm/s tendem a ser classificados como de baixa permeabilidade e os compostos com permeabilidade >100 nm/s são classificados como de alta permeabilidade.

#### 4.12 Estabilidade em Plasma

A estabilidade do composto **8** foi avaliada em plasma de camundongo e analisada por cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). Pode-se observar que o composto **8** teve seu grupamento éster rapidamente metabolizado á álcool por esterases presentes no plasma, retornando ao protótipo natural **1** (**Figura 21**).



Estruturas propostas

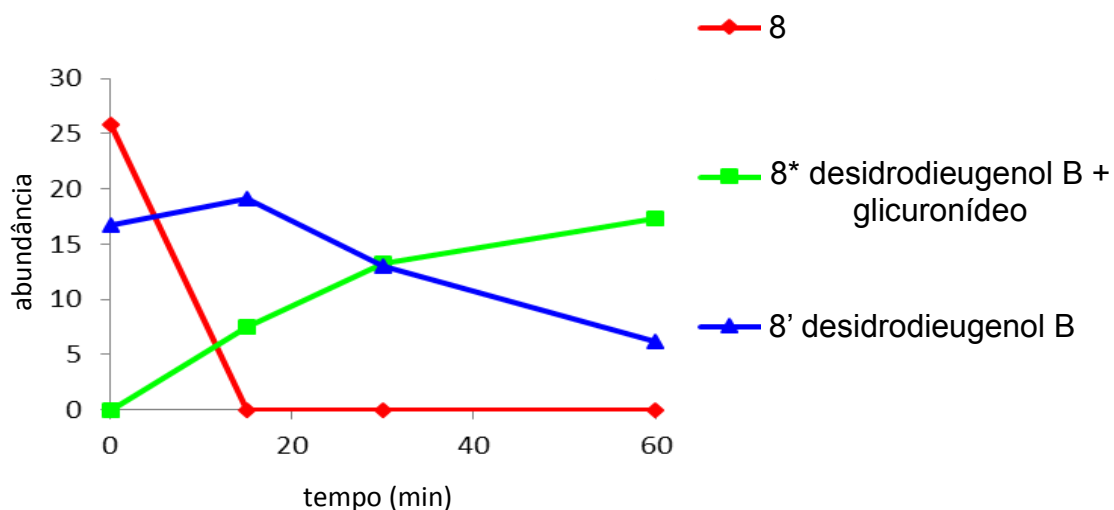


**Figura 21.** Estabilidade em plasma de camundongo do composto **8** (A), avaliada por cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). (B) estrutura do desidrodieugenol B (composto **1**).

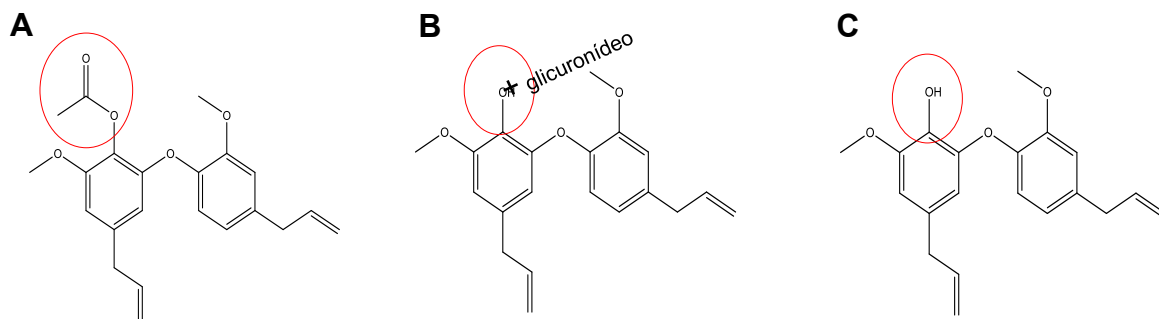
#### 4.13 Clearance em Hepatócitos de Camundongo

O composto **8** foi avaliado frente a sua estabilidade metabólica utilizando hepatócitos de camundongo para determinação do *clearance* intrínseco. Utilizando cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) pôde-se observar que o composto **8** foi rapidamente metabolizado ao desidrodieugenol B

1, obtendo-se um produto intermediário associado ao glicuronídeo (Figura 22).



Estruturas propostas



**Figura 22.** Clearance em hepatócitos de camundongo do composto **8** (A), avaliado por cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). (B) estrutura do metabólito glicurinado; (C) estrutura do deshidrodieugenol B 1.



## 5. DISCUSSÃO

A doença de Chagas é endêmica nas Américas e tem sido associada a áreas rurais pobres nas Américas do Sul e Central. No entanto, tem se espalhado ao redor do mundo devido a migrações (Pérez-Molina e Molina, 2018). No Brasil, apenas o fármaco nitroimidazólico, denominado benznidazol, está disponível para o tratamento clínico; sua efetividade ainda é bastante controversa, principalmente no tratamento de pacientes durante a fase crônica da doença (Ianni e Mady, 1998). Apesar de sua eficácia no tratamento da fase aguda, o medicamento apresenta vários efeitos adversos, como dermatite, intolerância digestiva, dor de cabeça, anorexia e insônia (Pinazo et al., 2010). Nesse contexto, a busca por uma terapia medicamentosa adequada ao tratamento da doença de Chagas continua a ser um desafio.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram a atividade anti-*T. cruzi* de neolignanas, isoladas da planta *N. leucantha* (Grecco et al., 2017). No trabalho, foi observado que apenas os compostos 1, 3 e 4, eram eficazes contra o parasita, com valores de  $CE_{50}$  de 38 a 59  $\mu\text{M}$  contra as formas tripomastigotas e 15 a 86  $\mu\text{M}$  contra os amastigotas intracelulares, com índice de seletividade variando entre 2 a 13. Nesse mesmo trabalho, a análise da permeabilidade da membrana plasmática em tripomastigotas de *T. cruzi*, demonstrou que o composto 4 apresentava intensa alteração quando comparado ao grupo controle (Grecco et al., 2017). Foi demonstrado também, por meio de análises *in silico*, que os compostos 1, 2, 3 e 4 não apresentavam características de compostos de interferência (PAINS), bem como, nenhum potencial carcinogênico, mutagênico ou genotóxico (Grecco et al., 2017).

Sendo assim, no presente trabalho, foram realizadas modificações semissintéticas de duas neolignanas como substrato para obtenção de uma nova série com possível capacidade de apresentar maior potência e seletividade contra o *T. cruzi*. Dentre os 24 novos derivados, o composto

**16** apresentou a maior potência, com um valor de  $CE_{50}$  semelhante ao do fármaco padrão benznidazol contra as formas amastigotas intracelulares. O composto também apresentou o maior índice de seletividade (>26). No entanto, apenas o composto **8** foi capaz de eliminar 100% das formas amastigotas intracelulares, sem alterar a viabilidade das células hospedeiras na concentração mais elevada testada, demonstrando uma potência semelhante a do composto **16**. Os amastigotas intracelulares são as formas clinicamente relevantes do *T. cruzi*, porém, formas tripomastigotas também são encontradas em mamíferos principalmente na fase aguda da doença, resultando em recrudescimento da parasitemia. Dessa forma, encontrar novos fármacos com atividade seletiva contra tripomastigotas também deve ser considerada como uma abordagem terapêutica relevante (Katsuno et al., 2015).

A utilização de uma análise SAR consiste em tentar compreender e revelar como as propriedades relevantes para a atividade biológica são codificadas e determinadas pela estrutura química de uma molécula. A premissa fundamental é que a estrutura de um composto químico determina implicitamente suas propriedades físico-químicas, as quais, ao interagir com um sistema biológico, determinam sua atividade biológica e toxicidade (McKinney et al., 2000).

Em nossa análise SAR da série composta por 24 derivados semissintéticos de neolignanas, pôde-se observar que, o grupamento fenólico não era necessário para desempenhar a atividade em formas amastigotas de *T. cruzi*, embora provavelmente tenha um papel na citotoxicidade em células de mamíferos. Dentre os compostos mais promissores em nossa série, o **8** apresentou uma potência aproximadamente dez vezes maior e três vezes maior seletividade do que seu protótipo natural (composto **1**).

Levando-se em conta que, o grupo funcional éster vem sendo utilizado para aumentar permeabilidade celular de compostos bioativos (Schiller et al., 2014), é possível sugerir que o composto **8** possa ter

atingido maiores concentrações citoplasmáticas que o **1**, e desta forma, ter favorecido sua atividade antiparasitária. No geral, nossos estudos em relação as modificações estruturais, demonstraram que é possível a obtenção de análogos com maior potência e seletividade contra o *T. cruzi*.

Considerando a atividade promissora do composto **8**, este derivado foi submetido à análise fenotípica, visando a busca de importantes alvos celulares envolvidos na ação letal do parasita. Estudos anteriores, demonstraram um forte efeito de permeabilização na membrana plasmática do *T. cruzi* utilizando uma outra neolignana também isolada da planta *N. leucantha* (Grecco et al., 2017). Este efeito poderia estar associado à toxicidade de células de mamíferos devido a uma possível afinidade de ligação. Porém, o novo derivado **8** não induziu alterações na membrana plasmática do *T. cruzi* ou de macrófagos, sugerindo que a introdução de um grupo éster no desidrodieugenol B, possa ter alterado sua afinidade com a membrana plasmática do parasita. Além disso, a análise da microscopia eletrônica de varredura não demonstrou danos à membrana plasmática, sendo possível observar uma morfologia preservada, corroborando os dados do estudo fluorimétrico.

Diferentemente da maioria das células eucarióticas, o *T. cruzi* apresenta uma única mitocôndria que exibe características incomuns, como um arranjo específico do DNA mitocondrial, denominado cinetoplasto. Devido a essa característica, a mitocôndria de tripanossomatídeos foi identificada como organela alvo na busca de novos fármacos (Menna-Barreto e Castro, 2014). A mitocôndria está envolvida no processo de redução celular, desempenhando um papel central no metabolismo energético através da fosforilação oxidativa, resultando na síntese de ATP, homeostase de cálcio e oxidação de nutrientes (Menna-Barreto e Castro, 2014).

Em nosso estudo, foram investigadas as alterações no potencial de membrana plasmática e mitocondrial de *T. cruzi*, após a incubação com o

composto **8**. Utilizando análises de citometria de fluxo, o potencial da membrana plasmática foi avaliado através da sonda bisoxonol, não sendo possível observar alterações significativas quando comparado ao controle não tratado após 60 minutos. No entanto, quando o potencial de membrana mitocondrial foi avaliado pela sonda JC-1, uma forte despolarização foi observada após 120 minutos de incubação com o composto **8**, quando comparado ao controle não tratado. O potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) é o resultado de um gradiente eletroquímico, fundamental para manutenção das funções fisiológicas na cadeia respiratória para geração de ATP. Sendo assim, uma perda significativa do potencial de membrana mitocondrial torna as células desprovidas de energia possibilitando uma morte subsequente (Tempone et al., 2017).

A mitocôndria é a principal fonte de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e é regulada pelo estado redox do sistema de transporte de elétrons (Figueira et al., 2013). Em níveis excedentes, a produção de ROS pode causar danos celulares, especialmente quando as células não conseguem lidar com essa condição. Todavia, durante a infecção pelo *T. cruzi*, baixos níveis de ROS são produzidos, nas células hospedeiras o que resulta na inibição da produção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos (Lopez et al., 2018).

Em nosso trabalho, parasitas de *T. cruzi* tratados com o composto **8** apresentaram níveis reduzidos de ROS, sugerindo que a despolarização do potencial de membrana mitocondrial pode ter contribuído para esse desequilíbrio. O efeito letal anti-*T. cruzi* deste novo derivado de neolignana poderia ser atribuído ao comprometimento mitocondrial, porém estudos futuros do possível mecanismo de ação são necessários para confirmação dos alvos moleculares.

A interação do *T. cruzi* com as células imunes inatas induz um aumento substancial na expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) (Koo et al., 2016). Além

disso, dentro dos macrófagos, a replicação do parasita pode ser inibida ou favorecida, levando à sua disseminação (Volpini et al., 2018).

Em nosso estudo, macrófagos não infectados e tratados com o composto **8**, apresentaram níveis reduzidos das citocinas IL-6 e IL-10, e aumento da quimiocina MCP-1, embora os níveis de TNF- $\alpha$  tenham permanecido inalterados. Diferentemente, quando os macrófagos foram infectados com o parasita e tratados com o composto **8**, não foi possível observar alterações nos níveis dessas mesmas citocinas e quimiocina.

No entanto, estudo prévio realizado por Costa Silva e colaboradores (2015), demonstrou que macrófagos infectados por *L. donovani* e tratados com desidrodieugenol B **1**, apresentavam níveis reduzidos das citocinas IL-6 e IL-10; essa redução é considerada um fator positivo, uma vez que, níveis elevados dessas citocinas estão correlacionados a uma exacerbação da doença. Nesse sentido, a imunomodulação de macrófagos induzida por fármacos pode ser uma estratégia positiva durante o tratamento de algumas doenças parasitárias.

Por outro lado, sabe-se que IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 são eficientes para desencadear uma resposta inflamatória e recrutar neutrófilos, macrófagos e outras células imunológicas, que podem ser infectadas pelo *T. cruzi* espalhando assim a doença, uma vez que estas células imunitárias são móveis no hospedeiro humano (Fielding et al., 2008; Griffin et al., 2012). Sendo assim, nossos dados sugerem que embora o composto **8**, não apresente um perfil imunomodulador como os fármacos BZ (Gatto et al., 2017) e aspirina (Malvezi et al., 2014), ele é capaz de atuar em outras vias para eliminação do parasita.

Nos últimos anos, o custo e o tempo necessários para levar novos medicamentos ao mercado continuaram a aumentar (Grabowski et al., 2002; DiMasi, 2002), enquanto o número de novos medicamentos aprovados diminuiu (Frantz e Smith, 2003). Um estudo publicado

anteriormente sobre as causas da falha no desenvolvimento de medicamentos, indicou que a farmacocinética inadequada era uma das principais razões (Prentis et al., 1988). Sendo assim, alguns parâmetros farmacocinéticos do derivado semissintético **8** foram avaliados.

O primeiro ensaio realizado mostrou que o composto **8** apresentava uma baixa solubilidade. Além disso, sabe-se que compostos com baixa solubilidade podem prejudicar a absorção oral (Lipinski, 2000). Nesse contexto, o Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB) permite a classificação de moléculas em função de sua solubilidade e propriedades de permeabilidade (Butler e Dressman, 2010; Chen et al., 2011). Assim, moléculas de classe I, são aquelas que apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade (tendo poucos problemas relacionados a absorção oral); moléculas de classe II, possuem baixa solubilidade e alta permeabilidade (sendo a solubilidade, a principal limitação para a absorção); as moléculas de classe III, têm alta solubilidade, porém baixa permeabilidade (onde a absorção é limitada pela permeabilidade em membrana e não pela solubilidade); e por fim, as moléculas de classe IV são aquelas em que tanto a baixa solubilidade quanto a baixa permeabilidade limitam sua absorção (Williams et al., 2013). Sendo assim, o composto **8** poderia se enquadrar na classe IV.

No entanto, apesar das tentativas de se contornar problemas de solubilidade em fármacos aprovados, aproximadamente 40% destes e 75% dos compostos atualmente em desenvolvimento, são considerados pouco solúveis em água (Di et al., 2009, Di et al., 2012). Além disso, medidas de solubilidade em vários pHs devem ser realizadas, uma vez que, o pH pode afetar dramaticamente a solubilidade em todo o intestino (Kerns e Di, 2003). Portanto, a baixa solubilidade em água, continua a ser um desafio para o desenvolvimento bem-sucedido de medicamentos (Williams et al., 2013).

Dentre todos os parâmetros físico-químicos, a lipofilicidade pode ser considerada um dos mais importantes, por estar diretamente

envolvida em processos farmacocinéticos de ADME e interações com o ligante alvo (Dreassi et al., 2009). Em geral, a baixa solubilidade está relacionada com uma elevada lipofilicidade (Pereira, 2007). Desta forma, o coeficiente de distribuição D (LogD) em tampão aquoso pH 7,4 foi o segundo parâmetro avaliado em nosso estudo por fornecer uma descrição mais significativa da lipofilicidade (Pereira, 2007). Embora nossos dados tenham demonstrado que o composto **8** apresenta uma moderada lipofilicidade; sabe-se que essa característica é fundamental para a atividade biológica, uma vez que a afinidade para um ambiente lipofílico facilita o transporte de produtos químicos através da membrana celular e do citoplasma (transporte transcelular) atingindo a corrente sanguínea e um possível alvo (Rutkowska et al., 2013). Sabe-se que a lipofilicidade está frequentemente correlacionada com o perfil de solubilidade de um composto e a sua permeabilidade (Cross et al., 2003).

A permeabilidade é um parâmetro conhecido por ser importante na absorção gastrointestinal de um fármaco, porém, apresenta também uma importante função em atividades baseadas em células e penetração de tecidos, como a barreira hematoencefálica (Kerns et al., 2004). Nesse sentido, utilizando o modelo de membrana artificial PAMPA, o composto **8** apresentou baixa permeabilidade. No entanto, os ensaios em PAMPA permitem a avaliação da permeabilidade de fármacos somente quando esta se dá por meio de transporte passivo transcelular (Kansy et al., 1998). Além disso, a estimativa da permeabilidade é complicada devido a vários mecanismos de transporte e muitos fatores devem ser levados em consideração (Rutkowska et al., 2013). Desta forma, a avaliação da permeabilidade por outros mecanismos como difusão paracelular, transporte ativo, influxo e efluxo também são recomendados com a utilização das células Caco-2 (Camenisch et al., 1998).

A estabilidade de candidatos a fármacos no plasma é essencial para manutenção da concentração plasmática e a meia-vida aceitáveis a fim de se alcançar os efeitos farmacológicos desejáveis (Di et al., 2005).

Sabe-se que o plasma contém enzimas como esterases e amidases capazes de metabolizar xenobióticos. Em nosso estudo, observamos uma rápida metabolização do composto **8** em seu protótipo natural, o desidrodieugenol B **1**. Os compostos que são instáveis em plasma tendem a ter um *clearance* rápido, tempo de meia-vida plasmática curto e desta forma, uma baixa eficácia *in vivo* (Di et al., 2005). Apesar disso, quando uma instabilidade significativa é encontrada, ela pode fornecer informações úteis para que modificações estruturais possam ser aplicadas, e a qualidade geral dos candidatos a fármaco possam ser melhoradas (Borthwick et al., 2002; Borthwick et al., 2003; Breitenlechner et al., 2004).

Na P&D de fármacos, muitos compostos acabam por apresentar baixa biodisponibilidade, devido às altas taxas de metabolização (Kerns e Di, 2003). O metabolismo de fármacos compreende um conjunto de reações enzimáticas que reduzem a concentração do fármaco e outros compostos estranhos (xenobióticos) em metabólitos de polaridade crescente, para que sejam eliminados do organismo (Low, 1998; Barreiro e Fraga, 2001). As reações metabólicas são divididas em fase 1 e 2. Na fase 1, ocorrem processos de oxidação, redução e hidrólise com o envolvimento principal das enzimas do citocromo P450, em particular, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19. Na fase II, a molécula do fármaco é posteriormente transformada nas chamadas reações de conjugação. Estas incluem, por exemplo, glicuronidação e sulfatação, bem como conjugação com glutathione (van de Waterbeemd e Gifford, 2003).

Os ensaios de estabilidade metabólica são realizados com microsomas hepáticos (Korfmacher et al., 1999), fração S9 (Rourick et al., 1996; Mandagere et al., 2002) e hepatócitos (Li et al., 1999). Os microsomas e a fração S9 não possuem algumas das enzimas metabólicas da fase II, sendo assim, requerem a utilização de co-fatores externos e, na ausência de membranas celulares intactas, carecem de



transportadores transmembrana. Em contrapartida, os hepatócitos primários oferecem a vantagem de conter todas as enzimas e cofatores metabólicos de Fase I e Fase II necessários para a biotransformação e também para sustentar a função de transporte das moléculas pela membrana (LeCluyse et al., 2005). Sendo assim, os hepatócitos primários geram melhores previsões de *clearance in vivo*, em comparação com microsossomos (Houston e Galetin, 2008; Laine, 2008).

Devido a isso, em nosso último experimento, o *clearance* do composto **8** foi avaliado utilizando hepatócitos de camundongos. Nossos dados demonstraram uma rápida metabolização do composto ao seu protótipo natural **1**, também ativo contra *T. cruzi* em estudos anteriores (Grecco et al., 2017). Dados da literatura demonstram que uma rápida metabolização no organismo pode não ser um indício de perda de atividade de fármacos. O fármaco fexinidazol, um composto nitro-derivado que atualmente se encontra em estudo clínico na doença de Chagas, apresenta uma rápida metabolização no organismo, porém, sendo convertido a uma forma mais ativa no *T. cruzi* do que seu precursor (Bahia et al., 2014). Apesar do metabolismo de xenobióticos apresentar diferenças quando avaliadas em modelos animais e em humanos, (van de Waterbeemd e Gifford, 2003), as informações obtidas no presente estudo, revelam a necessidade de modificações estruturais do composto **8**, afim de otimizar suas propriedades farmacocinéticas.

Por fim, o presente estudo demonstrou que o derivado de neolignana **8** apresenta uma atividade potente e seletiva contra parasitas de *T. cruzi in vitro*, sem apresentar toxicidade importante em células de mamíferos. A investigação da ação letal contra as formas tripomastigotas do parasita, parece estar relacionada ao comprometimento da mitocôndria, porém, futuros estudos serão necessários para investigar o mecanismo de ação molecular. Estudos de citometria de fluxo utilizando macrófagos infectados com *T. cruzi*, não demonstraram efeito

imunomodulador do composto **8**, uma vez que, os níveis das citocinas IL-6, IL-10 e da quimiocina MCP-1 não foram alterados após o tratamento.

Nesse contexto, este estudo vem demonstrar que o desidrodieugenol B **1**, uma neolignana natural isolada da biodiversidade brasileira, é um protótipo promissor para ser otimizado por meio da Química Orgânica Sintética e da Química Medicinal, proporcionando derivados mais potentes e seletivos contra o *T. cruzi*. Além disso, a busca por novos fármacos para a doença de Chagas é essencial e protótipos naturais podem contribuir significativamente para a descoberta de novos tratamentos.

## 6. CONCLUSÕES

1. Dentre as 24 neolignanas semissintéticas testadas, 6 compostos apresentaram atividade contra as formas tripomastigotas e 8 contra os amastigotas intracelulares de *T. cruzi*; 19 compostos não apresentaram atividade citotóxica contra células de mamíferos.
2. Os estudos *in silico* demonstraram que o composto **8** apresenta uma boa biodisponibilidade oral e não demonstra potencial para induzir fosfolipidose. Além disso, os filtros *in silico* sugeriram que os compostos da série não apresentavam potencial para atuar como compostos de interferência (PAINS).
3. O composto **8** apresentou atividade contra ambas as formas do parasita, eliminando 100% dos amastigotas intracelulares, sendo escolhido para estudos de mecanismo de ação e demais ensaios.
4. A análise da ação letal do composto **8** em tripomastigotas de *T. cruzi* sugere que o composto não causa permeabilização da membrana plasmática, bem como, em células de mamíferos. Além disso, o composto não altera o potencial de membrana plasmática dos parasitas.
5. O estudo de microscopia eletrônica de varredura, demonstrou que a membrana plasmática dos parasitas permaneceu preservada após o tratamento, corroborando os resultados obtidos nos ensaios espectrofluorimétricos.
6. O composto **8** causa significativa despolarização do potencial de membrana mitocondrial do *T. cruzi*, com diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).
7. Estudos em macrófagos medulares infectados mostraram que o composto **8** não apresenta uma resposta imunomodulatória *in vitro*.
8. Os ensaios farmacocinéticos (ADME) *in vitro* demonstraram uma rápida metabolização do composto **8**, com baixa solubilidade e permeabilidade em membrana artificial. Além disso, foi observada uma rápida metabolização em hepatócitos de camundongo,

demonstrando a necessidade de uma otimização da molécula para melhoria das suas propriedades farmacocinéticas.

9. Nossos dados demonstram de forma inédita, que o desidrodieugenol **B 1** é um composto promissor para ser utilizado em estudos de otimização molecular contra o *T. cruzi*, uma vez que foram obtidos derivados mais potentes e seletivos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A study of the use of oral posaconazole (POS) in the treatment of asymptomatic chronic Chagas disease (P05267) (STOP CHAGAS). [acesso em 18 de Julho de 2018]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01377480?term=chagas+merck&rank=1> ClinicalTrials.gov identifier NCT01377480.

Abad-Franch F, Pavan MG, Jaramillo-O N, Palomeque FS, Dale C, Chaverra D, Monteiro FA. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108 Suppl 1:92-9.

Abdel-Rahman SM, Kauffman RE. The integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics: understanding dose-response. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004;44:111-36.

Acevedo GR, Girard MC, Gómez KA. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. Front Immunol. 2018;9:1929.

Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. J Neurooncol. 2013 May;113(1):1-11.

Akhavan D. Análise de custo-efetividade do programa de controle da doença de Chagas no Brasil, relatório final. Organização Pan Americana da Saúde, Brasília, 2000. p. 271.

Alevi KCC, da Rosa JA, de Azeredo Oliveira MTV. Mini Review: Karyotypic Survey in Triatominae Subfamily (Hemiptera, Heteroptera). Entomol Ornithol Herpetol. 2013;2:106.

Almeida-Leite CM, Galvão LM, Afonso LC, Cunha FQ, Arantes RM. Interferon-gamma induced nitric oxide mediates *in vitro* neuronal damage by *Trypanosoma cruzi* infected macrophages. Neurobiol Dis. 2007;25(1):170-8.

Althaus JB, Malyszek C, Kaiser M, Brun R, Schmidt TJ. Alkamides from *Anacyclus pyrethrum* L. and Their *in Vitro* Antiprotozoal Activity. *Molecules*. 2017;12;22(5), pii: E796.

Alves CN, Barroso LP, Santos LS, Jardim IN. Structure-Activity Relationship of Compounds which are Anti-Schistosomiasis Active. *J Braz Chem Soc*. 1998;9(6): 577-582.

Amiodarone Against ICD Therapy in Chagas Cardiomyopathy for Primary Prevention of Death (CHAGASICS). [acesso em 16 de Julho de 2018]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01722942>, Identifier NCT01722942.

Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e3010.

Andrade SG, Figueira RM. Estudo experimental sobre a ação terapêutica da droga Ro 7-1051 na infecção por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop*. 1977;19: 335-341.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Bot J Lin Soc*. 2009;161:105-121.

Apt W, Arribada A, Zulantay I, Solari A, Sánchez G, Mundaca K, Coronado X, Rodríguez J, Gil LC, Osuna A. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005;99(8):733-41.

Apt W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Des Devel Ther*. 2010;4:243-53.

Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:9-16.

Arias IM, Popper H, Jakoby WB, Schacter D, Shafritz DA, editors. *The Liver: Biology and Pathology*. 2. New York: Raven Press; 1988. pp. 3–10.

Ariëns EJ, Simonis AM. Design of bioactive compounds. *Top Curr Chem*. 1974;52:1-61.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M. A 9,000 year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(7):2034-9.

Bahia MT, de Andrade IM, Martins TA, do Nascimento ÁF, Diniz Lde F, Caldas IS, Talvani A, Trunz BB, Torreele E, Ribeiro I. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11):e1870 (a).

Bahia MT, Nascimento AF, Mazzeti AL, Marques LF, Gonçalves KR, Mota LW, Diniz Lde F, Caldas IS, Talvani A, Shackleford DM, Koltun M, Saunders J, White KL, Scandale I, Charman SA, Chatelain E. Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8):4362-70 (b).

Baitello JB, Lorea-Hernández FG, Moraes PLR, Esteves R, Marcovino JR. Lauraceae. *In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Giulietti AM, Melhem TS (eds.). Flora fanerogâmica do estado de São Paulo*. Vol. 3. FAPESP/Rima, 2003. p.149-223.

Bajorath J. Large-scale SAR analysis. *Drug Discov Today Technol*. 2013;10(3):e419-26.

Baragaña B, Norcross NR, Wilson C, Porzelle A, Hallyburton I, Grimaldi R, Osuna-Cabello M, Norval S, Riley J, Stojanovski L, Simeons FR, Wyatt PG, Delves MJ, Meister S, Duffy S, Avery VM, Winzeler EA, Sinden RE, Wittlin S, Frearson JA, Gray DW, Fairlamb AH, Waterson D, Campbell SF, Willis P, Read KD, Gilbert IH. Discovery of a Quinoline-4-carboxamide Derivative with a Novel Mechanism of Action, Multistage Antimalarial Activity, and Potent *in Vivo* Efficacy. *J Med Chem*. 2016;59(21):9672-9685.

Barata LE, Santos LS, Ferri PH, Phillipson JD, Paine A, Croft SL. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry*. 2000;55(6):589-95.

Barclay CA, Cerisola JA, Lugones H, Ledesma O, Silva JL, Morizo G. Aspectos farmacológicos e resultados terapêuticos do benzonidazol novo agente quimioterápico para tratamento da infecção de Chagas, *Prensa Med Argent*. 1997;865: 239–244.

Barreiro EJ, Fraga CAM. *Química Medicinal*, Ed. Artmed: Porto Alegre, 2001, cap. 1.

Barreto MP, Ribeiro RD, Reservatórios silvestres do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas 1909. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1979;39:25-36.

Basso B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J Exp Med*. 2013;3(1):1-10.

Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, Freire MS, de Araújo EG, Prazeres J, Grassi MF. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(6):e711.



Beghyn T, Deprez-Poulain R, Willand N, Folleas B, Deprez B. Natural compounds: leads or ideas? Bioinspired molecules for drug discovery. *Chem Biol Drug Des.* 2008;72(1):3-15.

Benaim G, Sanders JM, Garcia-Marchán Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, Payares G, Sanoja C, Burgos JM, Leon-Rossell A, Concepcion JL, Schijman AG, Levin M, Oldfield E, Urbina JA. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem.* 2006;49(3):892-9.

Berhanu WM, Pillai GG, Oliferenko AA, Katritzky AR. Quantitative Structure–Activity/Property Relationships: The Ubiquitous Links between Cause and Effect. *ChemPlusChem.* 2012;77: 507-517.

Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA.* 2007;298(18):2171-81.

Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015;373(5):456-66.

Biopharmaceutical Research and Development, the Process Behind New Medicines. [acesso em 20 de Julho de 2018]. Disponível em: [http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/rd\\_brochure\\_022307.pdf](http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/rd_brochure_022307.pdf).

Borthwick AD, Davies DE, Ertl PF, Exall AM, Haley TM, Hart GJ, Jackson DL, Parry NR, Patikis A, Trivedi N, Weingarten GG, Woolven JM. Design and synthesis of pyrrolidine-5,5'-trans-lactams (5-oxo hexahydropyrrolo[3,2-b]pyrroles) as novel mechanism-based inhibitors of human cytomegalovirus protease. 4. Antiviral activity and plasma stability. *J Med Chem.* 2003;46(21):4428-49.

Borthwick AD, Exall AM, Haley TM, Jackson DL, Mason AM, Weingarten GG. Pyrrolidine-5,5-trans-lactams as novel mechanism-based inhibitors

of human cytomegalovirus protease. Part 3: potency and plasma stability. *Bioorg Med Chem Lett*. 2002;12(13):1719-22.

Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR, Silber AM. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med*. 2010;14(6B):1373-84.

Brahmachari G. Bioactive natural products: Opportunities and challenges in medicinal chemistry. *In: Natural products in drug discovery: Impacts and opportunities-an assessment*. 2012, p.1–199.

Breitenlechner CB, Wegge T, Berillon L, Graul K, Marzenell K, Friebe WG, Thomas U, Schumacher R, Huber R, Engh RA, Masjost B. Structure-based optimization of novel azepane derivatives as PKB inhibitors. *J Med Chem*. 2004;47(6):1375-90.

Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Brener Z. Atividade terapêutica do 5-nitrofuraleido-semicarbazona (nitrofurazona) em esquema de duração prolongada na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1961;3: 43–49.

Breyer MD. Improving productivity of modern-day drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2014;9(2):115-8.

Butler JM, Dressman JB. The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J Pharm Sci*. 2010;99(12):4940-54.

Camenisch G, Alsenz J, van de Waterbeemd H, Folkers G. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *Eur J Pharm Sci*. 1998;6(4):317-24.

Camurri G, Zaramella A. High-throughput liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of the chromatographic hydrophobicity index. *Anal Chem.* 2001;73(15):3716-22.

Cançado JR. Tratamento da doença de Chagas. *In: Cançado JR, Doença de Chagas, Belo Horizonte: Imprensa Oficial de Minas Gerais. 1968 p.517-540.*

Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* 2006;25(8):471-9.

Centers for Disease Control and Prevention. American Trypanosomiasis, Life Cycle. [acesso em 05 de Novembro de 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>.

Chagas E. Infection expérimental del'home par le *Trypanosoma cruzi*. Comptesrendus dès séances de la Société de biologie et de ses filiales.1933;115:1339-1341.

Chaikin P, Rhodes GR, Bruno R, Rohatagi S, Natarajan C. Pharmacokinetics/pharmacodynamics in drug development: an industrial perspective. *J Clin Pharmacol.* 2000;40(12 Pt 2):1428-38.

Chang KP, Nacy CA, Pearson RD. Intracellular parasitism of macrophages in leishmaniasis: *in vitro* systems and their applications. *Methods Enzymol.* 1986;132:603-26.

Chatelain E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen.* 2015;20(1):22-35.

Chen ML, Amidon GL, Benet LZ, Lennernas H, Yu LX. The BCS, BDDCS, and regulatory guidances. *Pharm Res.* 2011;28(7):1774-8.

Chicharro C, Granata C, Lozano R, Andreu D, Rivas L. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a

cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(9):2441-9.

Coll-Cárdenas R, Espinoza-Gómez F, Maldonado-Rodríguez A, Reyes-López PA, Huerta-Viera M, Rojas-Larios F. Active transmission of human chagas disease in Colima Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(4):363-8.

Copeland RA. Kinetics of single-substrate enzyme reactions. *In:* Copeland RA, (Ed). *Enzymes*, New York: John Wiley, 2002; 1:109-145.

Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197(1):40-5.

Costa VM, Torres KC, Mendonça RZ, Gresser I, Gollob KJ, Abrahamsohn IA. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2006;177(5):3193-200.

Costa-Silva TA, Grecco SS, de Sousa FS, Lago JH, Martins EG, Terrazas CA, Varikuti S, Owens KL, Beverley SM, Satoskar AR, Tempone AG. Immunomodulatory and Antileishmanial Activity of Phenylpropanoid Dimers Isolated from *Nectandra leucantha*. *J Nat Prod.* 2015;78(4):653-7.

Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(1):3-24.

Croft SL. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(2):215-20.

Cronquist A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants, The New York Botanical Garden Ed,; Columbia University Press: New York, 1992.

Cross SE, Magnusson BM, Winckle G, Anissimov Y, Roberts MS. Determination of the effect of lipophilicity on the *in vitro* permeability and tissue reservoir characteristics of topically applied solutes in human skin layers. *J Invest Dermatol.* 2003;120(5):759-64.

Cucunubá ZM, Nouvellet P, Conteh L, Vera MJ, Angulo VM, Dib JC, Parra-Henao GJ, Basáñez MG. Modelling historical changes in the force of-infection of Chagas disease to inform control and elimination programmes: application in Colombia. *BMJ Glob Health.* 2017;2(3):e000345.

Cucunubá ZM, Nouvellet P, Peterson JK, Bartsch SM, Lee BY, Dobson AP, Basáñez MG. Complementary Paths to Chagas Disease Elimination: The Impact of Combining Vector Control With Etiological Treatment. *Clin Infect Dis.* 2018;66(suppl\_4):S293-S300.

Cutrullis RA, Petray PB, Corral RS. MIF-driven activation of macrophages induces killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* dependent on endogenous production of tumor necrosis factor, nitric oxide and reactive oxygen species. *Immunobiology.* 2017 Feb;222(2):423-431.

da Costa TA, Silva MV, Mendes MT, Carvalho-Costa TM, Batista LR, Lages Silva E, Rodrigues V, Oliveira CJ, Ramirez LE. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: toward understanding the association of dendritic cells with infecting TcI and TcII populations. *J Immunol Res.* 2014;2014:962047.

Di L, Fish PV, Mano T. Bridging solubility between drug discovery and development. *Drug Discov Today.* 2012;17(9-10):486-95.

Di L, Kerns EH, Carter GT. Drug-like property concepts in pharmaceutical design. *Curr Pharm Des.* 2009;15(19):2184-94.

Di L, Kerns EH, Hong Y, Chen H. Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. *Int J Pharm.* 2005;297(1-2):110-9.

Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites.* 2012;2(2):303-36.

Dias JC, Schofield CJ. [The control of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31(4):373-83.

Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(5):603-12.

Dias JC. [Globalization, inequity and Chagas disease]. *Cad Saude Publica.* 2007;23 Suppl 1:S13-22.

Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova.* 2009;32(9):2444-2457.

Dias, JCP. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 2006;22(10):2020-2021.

DiMasi JA. The value of improving the productivity of the drug development process: faster times and better decisions. *Pharmacoeconomics.* 2002;20 Suppl 3:1-10.

DNDi, Drug for Neglected Diseases initiative, Chagas Disease: estratégia da DNDi para na America Latina. [acesso em 10 de Julho de 2018]. Disponível em: <http://www.dndi.org/diseasesprojects/portfolio.html>

Docampo R, Moreno SN. Free radical metabolism of antiparasitic agents. Fed Proc. 1986;45(10):2471-6.

Docampo R, Moreno SN. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. Rev Infect Dis. 1984;6(2):223-38.

Docampo R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem Biol Interact. 1990;73(1):1-27.

Dolasia K, Bisht MK, Pradhan G, Udgata A, Mukhopadhyay S. TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity. Int Rev Immunol. 2018;37(1):3-19.

Dreassi E, Zizzari AT, Falchi F, Schenone S, Santucci A, Maga G, Botta M. Determination of permeability and lipophilicity of pyrazolo-pyrimidine tyrosine kinase inhibitors and correlation with biological data. Eur J Med Chem. 2009;44(9):3712-7.

DrugBank. [acesso em 03 de Novembro de 2018]. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/>

Eder J, Sedrani R, Wiesmann C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. Nat Rev Drug Discov. 2014;13(8):577-87.

Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. N Engl J Med. 2000;343(19):1388-98.

Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, Souza SM, Ferreira LF, Vicente AC, Jansen AM. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(5):514-6.

Ferreira HO. Ensaio terapêutico-clínico com benzonidazol na doença de Chagas. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1976;18:357-364.

Ferreira HO. Tratamento da infecção chagásica com o RO 7-1051. Curitiba, Paraná: X Congresso Soc Bras Med Tropical. 1974.

Ferreira LF, Jansen AM, Araújo A. Chagas disease in prehistory. *An Acad Bras Cienc.* 2011;83(3):1041-4.

Ferreira LG, Oliva G, Andricopulo AD. From Medicinal Chemistry to Human Health: Current Approaches to Drug Discovery for Cancer and Neglected Tropical Diseases. *An Acad Bras Cienc.* 2018;90(1 Suppl 1):645-661.

Fielding CA, McLoughlin RM, McLeod L, Colmont CS, Najdovska M, Grail D, Ernst M, Jones SA, Topley N, Jenkins BJ. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J Immunol.* 2008;181(3):2189-95.

Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JC, Kowaltowski AJ, Sluse FE, Souza-Pinto NC, Vercesi AE. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(16):2029-74.

Flores-López CA, Machado CA. Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi* lineages and support a single hybridization prior to human contact. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8):e1272.

Fox S, Farr-Jones S, Sopchak L, Boggs A, Nicely HW, Khoury R, Biros M. High-throughput screening: update on practices and success. *J Biomol Screen.* 2006;11(7):864-9.

Frade AF, Pissetti CW, Ianni BM, Saba B, Lin-Wang HT, Nogueira LG, de Melo Borges A, Buck P, Dias F, Baron M, Ferreira LR, Schmidt A, Marin Neto JA, Hirata M, Sampaio M, Fragata A, Pereira AC, Donadi E, Kalil J, Rodrigues V, Cunha-Neto E, Chevillard C. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the



innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infect Dis.* 2013;13:587.

Frantz S, Smith A. New drug approvals for 2002. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(2):95-6.

Frearson JA, Wyatt PG, Gilbert IH, Fairlamb AH. Target assessment for antiparasitic drug discovery. *Trends Parasitol.* 2007;23(12):589-95.

Gali WL, Sarabanda AV, Baggio JM, Ferreira LG, Gomes GG, Marin-Neto JA, Junqueira LF. Implantable cardioverter-defibrillators for treatment of sustained ventricular arrhythmias in patients with Chagas' heart disease: comparison with a control group treated with amiodarone alone. *Europace.* 2014;16(5):674-80.

Garcez FR, Garcez WS, Hamerski L, Miguita CH. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. *Quim Nova.* 2009;32(2):407-411.

Gardim S, Almeida CE, Takiya DM, Oliveira J, Araújo RF, Cicarelli RM, da Rosa JA. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian Triatoma: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infect Genet Evol.* 2014;23:74-9.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010;115(1-2):22-7.

Gatto M, Oliveira LRC, De Nuzzi Dias F, Araújo Júnior JP, Lima CRG, Lordelo EP, Dos Santos RM, Kurokawa CS. Benznidazole affects expression of Th1, Th17 and Treg cytokines during acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2017;23:47.

Gehrke SS, Pinto EG, Steverding D, Pleban K, Tempone AG, Hider RC, Wagner GK. Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti

trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(3):805-13.

Glaser J, Holzgrabe U. Focus on PAINS: false friends in the quest for selective anti-protozoal lead structures from nature?. *Med Chem Commun.* 2016;7(2):214-23.

Goodman M. Market Watch: Pharma industry performance metrics: 2007–2012E. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;7:795.

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

Gottlieb OR. Lignóides de Plantas Amazônicas: Investigações Biológicas e Químicas. *Rev Acta Amazon.* 1988;18:333-344.

Grabowski H, Vernon J, DiMasi JA. Returns on research and development for 1990s new drug introductions. *Pharmacoeconomics.* 2002;20 Suppl 3:11-29.

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

Grecco SS, Lorenzi H, Tempone AG, Lago JHG. Update: biological and chemical aspects of *Nectandra* genus (Lauraceae). *Tetrahedron: Asymmetry.* 2016;27(17):793-810.

Griffin GK, Newton G, Tarrío ML, Bu DX, Maganto-Garcia E, Azcutia V, Alcaide P, Grabie N, Luscinskas FW, Croce KJ, Lichtman AH. IL-17 and TNF- $\alpha$  sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol.* 2012;188(12):6287-99.

Grunberg E, Beskid G, Cleeland R, DeLorenzo WF, Titsworth E, Scholer HJ, Richte R, Brener Z. Antiprotozoan and antibacterial activity of 2 nitroimidazole derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* (Bethesda). 1967;7:513-9.

Guhl F, Auderheide A, Ramírez JD. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. *Int J Parasitol*. 2014;44(9):605-12.

Guhl F, Vallejo GA. Interruption of Chagas disease transmission in the Andean countries: Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:413-5.

Hoelke B, Gieringer S, Arlt M, Saal C. Comparison of nephelometric, UV-spectroscopic, and HPLC methods for high-throughput determination of aqueous drug solubility in microtiter plates. *Anal Chem*. 2009;81(8):3165-72.

Houston JB, Galetin A. Methods for predicting *in vivo* pharmacokinetics using data from *in vitro* assays. *Curr Drug Metab*. 2008;9(9):940-51.

Ianni BA, Mady Ch. [Treatment of the chronic form of Chagas disease. Is the etiologic treatment efficient?]. *Arq Bras Cardiol*. 1998;71(4):645-6.

IUCN Red List of Threatened Species. [acesso em 8 de Julho de 2018]. Disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).

Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, Sztajzel J, Besse V, Loutan L, Gaspoz JM, Jannin J, Albajar Vinas P, Luquetti A, Chappuis F. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(2):e592.

Jackson Y, Pinto A, Pett S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Trop Med Int Health*. 2014;19(2):212-8.

Johnson I, Spence MTZ, editores. The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. 11° ed. Carlsbad: Life Technologies. 2010.

Jones AJ, Grkovic T, Sykes ML, Avery VM. Trypanocidal activity of marine natural products. *Mar Drugs*. 2013;11(10):4058-82.

Juliano RL. Pharmaceutical innovation and public policy: The case for a new strategy for drug discovery and development. *Sci Publ Policy*. 2013;40: 393-405.

Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas Junior VD, Galvão C, Rocha D. Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas). Rio de Janeiro; IOC; 2014. 52 p.

Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem*. 1998;41(7):1007-10.

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, Mowbray CE, Schmatz D, Warner P, Slingsby BT. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(11):751-8.

Kerns EH, Di L, Petusky S, Farris M, Ley R, Jupp P. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *J Pharm Sci*. 2004;93(6):1440-53.

Kerns EH, Di L. Pharmaceutical profiling in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2003;8(7):316-23.

Kesper N Jr, de Almeida KA, Stolf AM, Umezawa ES. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. *J Parasitol*. 2000;86(4):862-7.

- Kirchhoff LV. American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Gastroenterol Clin North Am*. 1996;25(3):517-33.
- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(3):206-20.
- Kong JM, Goh NK, Chia LS, Chia TF. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacol Sin*. 2003;24(1):7-21.
- Kónya K, Varga ZS, Antus S. Antioxidant properties of 8.0.4'-neolignans. *Phytomedicine*. 2001;8(6):454-9.
- Koo SJ, Chowdhury IH, Szczesny B, Wan X, Garg NJ. Macrophages Promote Oxidative Metabolism To Drive Nitric Oxide Generation in Response to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2016;84(12):3527-3541.
- Korfmacher WA, Palmer CA, Nardo C, Dunn-Meynell K, Grotz D, Cox K, Lin CC, Elicone C, Liu C, Duchoslav E. Development of an automated mass spectrometry system for the quantitative analysis of liver microsomal incubation samples: a tool for rapid screening of new compounds for metabolic stability. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999;13(10):901-7.
- Kostermans AJGH. A historical survey of Lauraceae. *Journal of Scientific Research* 1. 1952;83–95; 113–127;141–159.
- Kropf SP. Science, health and development: Chagas disease in Brazil, 1943-1962. *Parassitologia*. 2005;47(3-4):379-86.
- Kubitzki K, Kurz H. Synchronized dichogamy and dioecy in neotropical Lauraceae. *Plant systematics and evolution*. 1984;147(3-4):253-266.
- Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of leishmania results from calcium dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *J Biol Chem*. 2009;284(23):15496-504.

Lahlou M. The success of natural products in drug discovery. *Pharm Pharmacol.* 2013;4(3A):17–31.

Laine R. Metabolic stability: main enzymes involved and best tools to assess it. *Curr Drug Metab.* 2008;9(9):921-7.

LeCluyse EL, Alexandre E, Hamilton GA, Viollon-Abadie C, Coon DJ, Jolley S, Richert L. Isolation and culture of primary human hepatocytes. *Methods Mol Biol.* 2005;290:207-29.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. *Bull Am Mus Nat Hist.* 1979;163:123-520.

Leonti M, Verpoorte R. Traditional Mediterranean and European herbal medicines. *J Ethnopharmacol.* 2017;199:161-167.

Lescure FX, Canestri A, Melliez H, Jauréguiberry S, Develoux M, Dorent R, Guiard-Schmid JB, Bonnard P, Ajana F, Rolla V, Carlier Y, Gay F, Elghouzzi MH, Danis M, Pialoux G. Chagas disease, France. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(4):644-6.

Li AP, Lu C, Brent JA, Pham C, Fackett A, Ruegg CE, Silber PM. Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential. *Chem Biol Interact.* 1999;121(1):17-35.

Li FS, Weng JK. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nat Plants.* 2017;3:17109.

Lima VS, Iniguez AM, Otsuki K, Fernando Ferreira L, Araújo A, Vicente AC, Jansen AM. Chagas disease in ancient hunter-gatherer population, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(6):1001-2.

Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;44(1):235-49.

Lopez M, Tanowitz HB, Garg NJ. Pathogenesis of Chronic Chagas Disease: Macrophages, Mitochondria, and Oxidative Stress. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2018;5(1):45-54.

Low LK. Em Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry; Delgado JN, Remers WA (eds), Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 1998, cap. 3.

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

Luz PR, Miyazaki MI, Chiminacio Neto N, Padeski MC, Barros AC, Boldt AB, Messias-Reason IJ. Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):e0004257.

Macías-Villamizar VE, Cuca-Suárez LE, Coy-Barrera ED. Genus *Nectandra*: Phytochemistry and Biological Activity. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* . 2015;14(4):317-42.

Malvezi AD, da Silva RV, Panis C, Yamauchi LM, Lovo-Martins MI, Zanluqui NG, Tatakihara VL, Rizzo LV, Verri WA Jr, Martins-Pinge MC, Yamada-Ogatta SF, Pinge-Filho P. Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:580919.

Mandagere AK, Thompson TN, Hwang KK. Graphical model for estimating oral bioavailability of drugs in humans and other species from their Caco-2 permeability and *in vitro* liver enzyme metabolic stability rates. *J Med Chem*. 2002;45(2):304-11.

Marcondes MC, Borelli P, Yoshida N, Russo M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect*. 2000;2(4):347-52.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007;115(9):1109-23.

Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Avezum A Jr, Mattos AC, Rassi A, Morillo CA, Sosa-Estani S, Yusuf S; BENEFIT Investigators. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:319-24.

Marques CA. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*. 2001;8(1):195-206.

Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos AN Jr, Heukelbach J, Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007, *PLoS Negl Trop Dis*, 2012;6(2):e1508, (A).

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J, Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences, *J Infect Dev Ctries*, 2012 Nov 26;6(11):817-24, (B).

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Lange W, Heukelbach J, Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas, *Trop Med Int Health*, 2012 Sep;17(9):1066-75, (C).

Masimirembwa CM, Bredberg U, Andersson TB. Metabolic stability for drug discovery and development: pharmacokinetic and biochemical challenges. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(6):515-28.

Matthews H, Hanison J, Nirmalan N. "Omics"-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives. *Proteomes*. 2016;4(3). pii: E28.

Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the



mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;146(4):601-20.

Maya JD, Repetto Y, Agosín M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;86(1):101-6.

Maya JD, Rodríguez A, Pino L, Pabón A, Ferreira J, Pavani M, Repetto Y, Morello A. Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res.* 2004;37(1):61-9.

McKinney JD, Richard A, Waller C, Newman MC, Gerberick F. The practice of structure activity relationships (SAR) in toxicology. *Toxicol Sci.* 2000;56(1):8-17.

Mecca MM, Bartel LC, Castro CR, Castro JA. Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(6):549-53.

Menna-Barreto RF, de Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed Res Int.* 2014;2014:614014.

Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2014;370(20):1899-908.

Montalto de Mecca M, Diaz EG, Castro JA. Nifurtimox biotransformation to reactive metabolites or nitrite in liver subcellular fractions and model systems. *Toxicol Lett.* 2002;136(1):1-8.

Moraes-Souza H. Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:419-23.

Moreno SN, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AO. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys.* 1982;218(2):585-91.

Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, Lowe L, Chen R, Shivraj L, Agadir A, Campos R, Ernst D, Gaur A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol.* 2004; 110(3):252-66.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015;373(14):1295-306.

Moss GP. Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl Chem.* 2000;72(8):1493-1523.

Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem.* 2002;277(27):24717-27.

Muñoz J, Coll O, Juncosa T, Vergés M, del Pino M, Fumado V, Bosch J, Posada EJ, Hernandez S, Fisa R, Boguña JM, Gállego M, Sanz S, Portús M, Gascón J. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women

attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis*. 2009;48(12):1736-40.

Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M. [Diagnosis and treatment of Chagas disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31 Suppl 1:26-34.

Murta SM, Ropert C, Alves RO, Gazzinelli RT, Romanha AJ. *In-vivo* treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite immunol*. 1999;21(10):535-544.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016;79(3):629-61.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007;70(3):461-77.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):653-5.

Norris SMP, Pankevich D, Davis M, Altevogt BM. Improving and Accelerating Therapeutic Development for Neurosystem Disorders. National Academic Press, Washington, DC, USA, 2014.

Oliveira MF, Dias ATN, Pontes VMO, Souza Júnior AS, Coelho HLL, Coelho ICB. Tratamento etiológico da Doença de Chagas no Brasil. *Rev Patol Trop*. 2008;37(3):209-28.

Packchanian A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurans. *J Parasitol*. 1952;38: 30–40.

Patridge E, Gareiss P, Kinch MS, Hoyer D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov Today*. 2016;21(2):204-7.

Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, Pinazo MJ, Moriana S, Gold S, Pereiro A, Navarro M, Torrico F, Bottazzi ME, Hotez PJ. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):e0004343.

Pereira DG. The importance of metabolism in drug design. Quim Nova. 2007;30:171–177.

Pereira PC, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2013;19(1):34.

Pereira-Chioccola VL. Papel da resposta imune à *Tras-sialidase* na infecção por *Trypanosoma cruzi*. 1998;p139.

Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. Lancet. 2018;391(10115):82-94.

Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. Phytochemistry. 2001;56(3):237-43.

Pinazo MJ, Muñoz J, Posada E, López-Chejade P, Gállego M, Ayala E, del Cacho E, Soy D, Gascon J. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(11):4896-9.

Pinto BF, Medeiros NI, Teixeira-Carvalho A, Eloi-Santos SM, Fontes-Cal TCM, Rocha DA, Dutra WO, Correa-Oliveira R, Gomes JAS. CD86 Expression by Monocytes Influences an Immunomodulatory Profile in Asymptomatic Patients with Chronic Chagas Disease. Front Immunol. 2018;9:454.

Poinar Jr G. *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. Palaeodiversity. 2013;6:1-8.

Ponce C. Hacia la eliminacion de la transmision del *Trypanosoma cruzi* en Honduras y los países de America Central. Medicina (Buenos Aires).1999;59:117-9.

Poveda C, Fresno M, Gironès N, Martins-Filho OA, Ramírez JD, Santi-Rocca J, Marin-Neto JA, Morillo CA, Rosas F, Guhl F. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). PLoS One. 2014;9(3):e91154.

Prentis RA, Lis Y, Walker SR. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). Br J Clin Pharmacol. 1988;25(3):387-96.

Proof-of-concept study of E1224 to treat adult patients with Chagas disease. [acesso em 18 de Julho de 2018]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01489228?term=e1224+chagas&rank=1> ClinicalTrials.gov Identifier NCT01489228.

Pubmed Compound. [acesso em 03 de Novembro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>

Quinet A, Andreato RHP. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia. 2002;53(82):59-121.

Quinet A, Baitello JB, Moraes PLR. Lauraceae. *In*: Forzza RC et al. (eds.). Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [acesso em 6 de Julho de 2018]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000143>.

Raether W, Hänel H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. Parasitol Res. 2003;90 Supp 1:S19-39.

Ramos Jr AN, Martins-Melo FR, Barbosa JC, Heukelbach J. The role of operational research and the challenges for integration of care and

control of Chagas disease in the Brazilian Unified Health System. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):12–17.

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012;26(2):275-91.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010;375(9723):1388-402.

Rassi A, Luquetti AO, Rassi A Jr, Rassi GG, Rassi SG, DA Silva IG, Rassi AG. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(1):58-61.

Rassi A, Rassi Junior A, Rassi GG. Fase Aguda, *In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (Org). Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2ªed, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S,A. 2000:p231-245.

Rassi Junior A, Marin-Neto JÁ. Cardiopatia chagásica crônica: estado da arte. *Rev Soc Cardiol.* 2000;10:49.

Rassi Junior A, Rassi A. Cardiopatia Chagásica Crônica, *In: Porto CC (Org). Doenças do Coração, Prevenção e Tratamento.* 1ªed, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S,A. 1998;(1):798-807.

Reimão JQ, Migotto AE, Kossuga MH, Berlinck RG, Tempone AG. Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carijoa riisei*. *Parasitol Res.* 2008;103(6):1445-50.

Rizzini CT. *Arvores e madeiras úteis do Brasil.* São Paulo, Brasil: Editora Edgard Blucher Ltda. 1971.

Rohwer JG. Lauraceae, *In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V (Eds). The Families and Genera of Vascular Plants.* Berlin: Springer-Verlag. 1993;(2):366-391(A).

Rohwer JG. Lauraceae–Nectandra. Flora Neotropica. Monografia, 1993;(60):13 (B).

Rourick RA, Volk KJ, Klohr SE, Spears T, Kerns EH, Lee MS. Predictive strategy for the rapid structure elucidation of drug degradants. J Pharm Biomed Anal. 1996;14(12):1743-52.

Rutkowska E, Pajak K, Józwiak K. Lipophilicity--methods of determination and its role in medicinal chemistry. Acta Pol Pharm. 2013;70(1):3-18.

Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. Annu Rev Immunol. 2016;34:317-34.

Sanoja C, Carbajosa S, Fresno M, Gironès N. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS One. 2013;8(6):e65820.

Saraiva FSS, Metabólitos naturais dos galhos de *Nectandra leucantha* Nees & Mart, (Lauraceae) e derivados semissintéticos: caracterização molecular, avaliação do potencial e mecanismo antitumoral contra o melanoma murinho, [dissertação de doutorado], Diadema: Universidade Federal de São Paulo; 2018.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl 1:246-51.

Savioli L, Engels D, Daumerie D, Jannin J, Alvar J, Asiedu K, Gastellu Etchegorry M, Simarro P, Mariotti SP. Response from Savioli and colleagues from the Department of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization. PLoS Med. 2006;3(6):e283.

Schenone H, Concha L, Aranda R, Rojas A, Alfaro E, Knierin E, Rojo M. Atividade quimioterápica de um derivado nitroimidazolacetamida na infecção chagásica crônica. *Bol Chil Parasitol.* 1975;(30):91–93.

Schiller R, Scozzafava G, Tumber A, Wickens JR, Bush JT, Rai G, Lejeune C, Choi H, Yeh TL, Chan MC, Mott BT, McCullagh JS, Maloney DJ, Schofield CJ, Kawamura A. A cell-permeable ester derivative of the JmJc histone demethylase inhibitor IOX1. *ChemMedChem.* 2014;9(3):566–71.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010;115(1-2):14–21.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102 Suppl 1:75–85. Erratum in: *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(8):2 p following 1009.

Segel IH. Kinetics of unireactant enzymes in *Enzyme Kinetics.* New York: John Wiley. 1993;(1):18–99.

Silber BM. Driving drug discovery: the fundamental role of academic labs. *Sci Transl Med.* 2010;2(30):30cm16.

Silber BM. Omics in drug discovery: From small molecule leads to clinical candidates. *The OMICs: Applications in Neuroscience.* 2<sup>nd</sup>ed, Oxford University Press: Oxford, UK. 2014;16:291.

Silistino-Souza R, Alevi KC, Castro NF, Freitas MN, Papa MD, Scandar SA, Bestetti RR, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MT. Entoepidemiology of Chagas disease in northwest São Paulo and cytogenetic analysis of its main vector, *Triatoma sordida* (Hemiptera: Triatominae). *Genet Mol Res.* 2013;12(4):5810–9.



Silveira AC, Pimenta F Jr. [Institutional insertion of Chagas' disease control]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44 Suppl 2:19-24.

Singh N, Mishra BB, Bajpai S, Singh RK, Tiwari VK. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem*. 2014;22(1):18-45.

Smith DA. The long, hard road: drug metabolism in the lifetime of the DMDG. *Xenobiotica*. 2001;31(8-9):459-67.

Soares-Sobrinho JL, Medeiros FPM, de La Roca MF, Silva KER, Lima LNA, Rolim Neto JR. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas. *Rev Patol Trop*. 2007;36(2):103-18.

Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:167-80.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*. 1986;93(2):157-65.

Tanowitz HB, Weiss LM, Montgomery SP. Chagas disease has now gone global. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4):e1136.

Tapia FJ. *Bull Soc Chim Bull*. 1898;19:638–644.

Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MT, Ceron CR. Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Braz J Biol*. 2006;66(2B):703-8.

Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MTV, Ceron CR. Problemática vetorial da Doença de Chagas. *Arq Ciênc Saúde*. 2004;11(1):44-7.

Tebbey PW, Rink C. Target product profile: a renaissance for its definition and use. *J Med Market*. 2009;9(4):301–307.

Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabé C, Tibayrenc M, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol*. 2006;114(4):279-88.

Tempone AG, Sartorelli P, Mady C, Fernandes F. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American Trypanosomiasis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2007;5(3):222-35.

Tempone AG, Ferreira DD, Lima ML, Costa Silva TA, Borborema SET, Reimão JQ, Galuppo MK, Guerra JM, Russell AJ, Wynne GM, Lai RYL, Cadelis MM, Copp BR. Efficacy of a series of alpha-pyrone derivatives against *Leishmania (L.) infantum* and *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem*. 2017;139:947-960.

Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, Dzobo K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6). pii: E1578.

Torreele E, Bourdin Trunz B, Tweats D, Kaiser M, Brun R, Mazué G, Bray MA, Pécoul B. Fexinidazole: a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(12):e923.

Trouiller P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public health policy failure. *Lancet*. 2002;359(9324):2188-94.

Turrens JF, Watts BP Jr, Zhong L, Docampo R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benzimidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;82(1):125-9.

UFRGS. Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. *Nectandra leucantha*. [acesso em 15 de junho de 2018]. Disponível em: [http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=4384](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4384)

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003;19(11):495-501.

van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(3):192-204.

van der Werff H, Richter VDH. Toward an improved classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 1996;(83):409-418.

van der Werff H. A key to the genera of Lauraceae in the New World. *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 1991;(78):377-387.

Volpini X, Ambrosio LF, Fozzatti L, Insfran C, Stempin CC, Cervi L, Motran CC. *Trypanosoma cruzi* Exploits Wnt Signaling Pathway to Promote Its Intracellular Replication in Macrophages. *Front Immunol.* 2018;9:859.

Walker DK. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in the assessment of drug safety in early drug development. *Br J Clin Pharmacol.* 2004;58(6):601-8.

Wall ME, Wani MC, Brown DM, Fullas F, Olwald JB, Josephson FF, Thornton NM, Pezzuto JM, Beecher CW, Farnsworth NR, Cordell GA, Kinghorn AD. Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *Phytomedicine.* 1996;3(3):281-5.

Walton MI, Workman P. Nitroimidazole bioreductive metabolism. Quantitation and characterisation of mouse tissue benzimidazole nitroreductases *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Pharmacol.* 1987;36(6):887-96.

Wanderley DM, Rodrigues VL, Leite RM, Diaz SY, de Carvalho ME, Santos SO, Tatto E, Carli MS, Coelho KI, da Silva PR, Túlio SA, da Silva IR, Shikanai-Yasuda MA. On an acute case of Chagas disease in a region under vector control in the state of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010;52(3):151-6.

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*. 1971;93(9):2325-7.

Weischenfeldt J, Porse B. Bone marrow-derived macrophages (BMM): isolation and applications. *CSH Protoc*. 2008; pdb prot5080.

Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(13):5022-7.

Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, Porter CJ. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev*. 2013;65(1):315-499.

World Health Organization. [acesso em 04 de Junho de 2018]. Disponível em: [http://www.who.int/chagas/Global\\_distribution\\_Chagas\\_disease\\_2006\\_2010.pdf?ua=1](http://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf?ua=1).

Wyatt PG, Gilbert IH, Read KD, Fairlamb AH. Target validation: linking target and chemical properties to desired product profile. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(10):1275-83.

Yamaori S, Fujiyama N, Kushihara M, Funahashi T, Kimura T, Yamamoto I, Sone T, Isobe M, Ohshima T, Matsumura K, Oda M, Watanabe K. Involvement of human blood arylesterases and liver microsomal carboxylesterases in nafamostat hydrolysis. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;21(2):147-55.

Zacchino S, Rodríguez G, Pezzenati G, Orellana G, Enriz R, Gonzalez Sierra M. *In vitro* evaluation of antifungal properties of 8-O.4'-neolignans. J Nat Prod. 1997;60(7):659-62.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012;12(2):240-53.

Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas?. Rev Biol. 2011;(6):44-48.



São Paulo, 24 de fevereiro de 2011.

Parecer CEUA-IAL/Pasteur nº 03/2011

Prezado Senhor,

Vimos pelo presente informar que o projeto de pesquisa “**Estudo de Novas Combinações Terapêuticas na Doença de Chagas**”, sob sua coordenação, foi considerado **APROVADO**, podendo ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios à CEUA a cada **6 (seis) meses**, no intuito de acompanhar os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e encaminhar ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,

Adriano Abbud  
Coordenador da CEUA-IAL/Pasteur

Ilmo. Sr.  
Dr. André Gustavo Tempone Cardoso  
Pesquisador Científico  
Centro de Parasitologia e Micologia  
Instituto Adolfo Lutz

AA/aa

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 355  
10º Andar – Salas 1019/1020 – Cerqueira César  
São Paulo – SP – CEP: 01246-902  
Tel: (11) 3068-2881 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br