

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – ICF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGCF

CAMILLA AMANDA DE OLIVEIRA GOMES

**PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE
VISCERAL E POTENCIAL LEISHMANICIDA *IN VITRO* DOS COMPOSTOS
SINTÉTICOS DERIVADOS DA PURPUROGALINA**

MACEIÓ – AL

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILLA AMANDA DE OLIVEIRA GOMES

**PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE
VISCERAL E POTENCIAL LEISHMANICIDA *IN VITRO* DOS COMPOSTOS
SINTÉTICOS DERIVADOS DA PURPUROGALINA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas –
UFAL, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Cavalcanti Queiroz

Coorientador: Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes
Duarte

MACEIÓ – AL

2024

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

G633p Gomes, Camilla Amanda de Oliveira.
Prospecção tecnológica do tratamento de leishmaniose visceral e potencial
leishmanicida *in vitro* dos compostos sintéticos derivados da purpurogalina / Camilla
Amanda de Oliveira Gomes. – 2024.
141 f. : il. color.

Orientadora: Aline Cavalcanti Queiroz.
Co-orientadora: Alysson Wagner Fernandes.
Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de
Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 52-67.
Apêndices: f. 68-141.

1. Prospecção tecnológica. 2. Leishmaniose. 3. Produtos sintéticos 4. Purpurogalina -
Derivados. I. Título.

CDU: 615.3:616.993.161

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILLA AMANDA DE OLIVEIRA GOMES

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE VISCERAL E POTENCIAL LEISHMANICIDA *IN VITRO* DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DA PURPUROGALINA

Aprovado no dia: 11 de março de 2024.

Documento assinado digitalmente
 ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ
Data: 09/04/2024 09:22:20-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Orientadora: Profa. Dra. Aline Cavalcanti Queiroz – UFAL / Campus Arapiraca

Documento assinado digitalmente
 ALYSSON WAGNER FERNANDES DUARTE
Data: 09/04/2024 09:27:30-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Coorientador: Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte – UFAL / Campus
Arapiraca

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 LUISE LOPES CHAVES
Data: 06/04/2024 16:23:27-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Luise Lopes Chaves – UFAL / Campus A.C. Simões

(Examinador Interno)

Documento assinado digitalmente
 MORGANA VITAL DE ARAUJO
Data: 08/04/2024 21:12:15-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Morgana Vital de Araújo – UFAL / Campus A.C. Simões

(Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me sustentado e possibilitado a concretização desse sonho.

À minha família, especialmente à minha mãe Cláudia Gomes, uma mulher batalhadora, gentil e amorosa - minha maior inspiração na vida. Gratidão por tudo que a senhora fez e faz por mim.

Ao meu irmão, Felipe Gomes, por proporcionar momentos de descontração e serenidade.

Ao meu namorado, Ronald Benvindo, pelo apoio incondicional e compreensão em todos os momentos da minha jornada. Obrigada por sempre acreditar na minha capacidade.

À minha orientadora Profa. Dra. Aline Cavalcanti, pelo apoio, compreensão, paciência e ensinamentos, agradeço pela confiança disponibilizada.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alyson Wagner, pelo auxílio na minha pesquisa e por trazer palavras de tranquilidade e acolhimento.

À banca examinada Profa. Dra. Morgana Vital e Profa. Dra. Magna Suzana, por todas as contribuições relevantes à minha pesquisa, assim como pelo acolhimento, generosidade e compreensão no dia a dia.

A todos os membros do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) que me ajudaram de forma direta e indiretamente. Em especial, agradeço ao Márcio Thomaz, Hilda Caroline e Mayná Vitória, que tornaram a caminhada mais leve mesmo diante das adversidades.

Ao Prof. Dr. Celson Amorim Camara e a Mestre Yasmim Lucas da Silva do Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos (LSCB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Assim como ao Prof. Dr. Francis Soares Gomes e mestre Stella Freitas de Queiroz do Laboratório de Metabolismo e Proteômica (LaMP) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) pela parceria imprescindível.

À Universidade Federal de Alagoas e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença parasitária endêmica em cerca de 102 países e continua representando um sério desafio para a saúde pública. No momento, os medicamentos disponíveis enfrentam diversas limitações farmacoterapêuticas, tornando urgente a busca por novos compostos. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi conduzir uma revisão patentária das inovações farmacológicas para o tratamento da leishmaniose visceral nas Américas nos últimos seis anos (2017-2023), além de investigar a atividade citotóxica e leishmanicida *in vitro* dos derivados sintéticos da purpurogalina contra as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*. Na revisão patentária, foram utilizados os termos de busca em diversas plataformas, como The Lens, World Intellectual Property Organization (WIPO), European Patent Office (EPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO) e Brazilian Patent and Trademark Office (INPI), identificando patentes para posterior análise dos parâmetros de ano de publicação, IPC, país de origem, autores, ensaios farmacológicos e atividades biológicas. No estudo experimental, foi conduzido o ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) para determinar a citotoxicidade dos derivados em macrófagos, seguido pela avaliação anti-*Leishmania* em promastigotas das espécies mencionadas e a determinação do índice de seletividade. Os resultados revelaram onze patentes descrevendo inovações farmacológicas sintéticas e naturais contra *L. infantum chagasi* *in vitro* e *in vivo* nos últimos sete anos. Em relação aos ensaios experimentais, observou-se baixa citotoxicidade na linhagem J774.A1 (macrófagos) até a concentração mais alta testada (100 µM), com efeito máximo inferior a 50%, exceto para os compostos 19a e 18e, que apresentaram citotoxicidade superior a 80%. As substâncias 19a, 18b, 18d e 18e demonstraram citotoxicidade contra promastigotas de ambas as espécies, com efeito máximo superior a 80%. O derivado 18 destacou-se pela seletividade significativa contra cepas de *L. infantum chagasi*, apresentando um índice de seletividade superior a 10,06. Portanto, os estudos patentários indicam inovações farmacológicas com atividade leishmanicida contra o agente causador da leishmaniose visceral nas Américas, assim como o potencial anti-*Leishmania* dos derivados da purpurogalina em ambas as espécies testadas, juntamente com uma baixa citotoxicidade contra as células hospedeiras.

Palavras-chave: Prospecção tecnológica; Leishmaniose; Produtos sintéticos; Derivados da purpurogalina.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic parasitic disease in approximately 102 countries and continues to be a serious public health problem. Currently, the available drugs have several pharmacotherapeutic limitations, and the search for new prototypes is urgent. In this context, the study aims to conduct a patent review of pharmacological innovations for the treatment of visceral leishmaniasis in the Americas over the past six years (2017-2023), as well as to investigate the cytotoxic and leishmanicidal activity in vitro of synthetic derivatives of purpurogallin in *L. amazonensis* and *L. infantum chagasi* species. In the patent review, the descriptors were inserted into platforms such as The Lens, World Intellectual Property Organization (WIPO), European Patent Office (EPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO) and Brazilian Patent and Trademark Office (INPI), finding patents for subsequent analysis of publication year parameters, IPC, country of origin, authors, pharmacological assays, and bioactive assays. In the experimental study, the MTT colorimetric assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was performed to determine the cytotoxicity of the derivatives in macrophages, followed by anti-*Leishmania* evaluation in promastigotes of the mentioned species and determination of the selectivity index. The results obtained showed eleven patents describing synthetic and natural pharmacological innovations against *L. infantum chagasi* in vitro and in vivo over the last seven years. Regarding the experimental assays, low cytotoxicity was observed in the J774.A1 lineage (macrophages) up to the highest tested concentration (100 μ M), with a maximum effect of less than 50%, except for compounds 19a and 18e, which had cytotoxicity greater than 80%. Substances 19a, 18b, 18d, and 18e were cytotoxic against promastigotes of both species, with a maximum effect greater than 80%. It was found that derivative 18 demonstrated significant selectivity against strains of *L. infantum chagasi* with a selectivity index greater than 10,06. Therefore, patent studies indicate pharmacological innovations with leishmanicidal activity against the causative agent of visceral leishmaniasis in the Americas, as well as the potential anti-*Leishmania* of purpurogallin derivatives in both tested species of *Leishmania* and low cytotoxicity against host cells.

Keywords: Technological prospecting; Leishmaniasis; Synthetic products; Purpurogallin derivatives.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Número de casos de Leishmaniose Tegumentar nas Américas em 2001 – 2021.....	5
Figura 2 - Número de casos de Leishmaniose Visceral nas Américas em 2001 – 2021..	5
Figura 3 - Número de casos de leishmaniose tegumentar (A) e visceral (B) no Brasil em 2021.....	6
Figura 4 - Forma promastigota (A) e amastigota da Leishmania (B).....	8
Figura 5 - <i>Lutzomyia</i> spp. no hospedeiro (A) e realizando o processo de repasto sanguíneo (B).....	9
Figura 6 - Ciclo de transmissão da Leishmaniose.....	10
Figura 7 - Resposta imune pela infecção do parasito Leishmania.....	12
Figura 8 - Leishmaniose cutânea localizada (A) e leishmaniose cutânea difusa (B)....	14
Figura 9 - Leishmaniose cutânea-mucosa (A) e leishmaniose disseminada (B).....	14
Figura 10 - Hepatoesplenomegalia em criança com leishmaniose visceral.....	15
Figura 11 - Estrutura química dos antimoniais pentavalentes empregados no tratamento de leishmaniose.....	16
Figura 12 - Estrutura química da anfotericina B empregado no tratamento de leishmaniose.....	18
Figura 13 - Estrutura química da pentamidina empregado no tratamento de leishmaniose.....	19
Figura 14 - Estrutura química da paromomicina empregado no tratamento de leishmaniose.....	20
Figura 15 - Estrutura química da miltefocina empregado no tratamento de leishmaniose.....	21
Figura 16 - Plataformas de patentes e combinações de termos utilizados.....	24

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais espécies do gênero <i>Leishmania</i> recorrentes nas Américas.....	7
Quadro 2 - Estruturas moleculares dos derivados da purpurogalina.....	25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Quantidade de patentes selecionadas por plataformas.....	34
Gráfico 2 - Distribuição temporal das patentes selecionadas.....	35
Gráfico 3 - Distribuição geográfica das patentes designadas na pesquisa.....	36
Gráfico 4 - Classificação Internacional de patentes dos documentos selecionados.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados quantitativos de patentes por plataformas.....	28
Tabela 2 - Dados das patentes selecionadas de acordo com os critérios da pesquisa....	31
Tabela 3 - Efeito citotóxico do tratamento <i>in vitro</i> com derivados de purpurogalina sobre macrófagos da linhagem J774.A1 durante 48 h.....	44
Tabela 4 - Efeito leishmanicida dos derivados da purpurogalina contra as formas promastigotas da espécie <i>L. amazonensis</i>	45
Tabela 5 - Efeito leishmanicida de derivados da purpurogalina contra as formas promastigotas da espécie <i>L. infantum chagasi</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Câncer de pulmão
ABCD	Anfotericina B complexo lipídico
ABLC	Anfotericina B dispersão coloidal
AmB-L	Anfotecina B lipossomal
AmB-D	Anfotecina B desoxicolato
ANOVA	Análise de variância
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CDs	Células Dendríticas
CLDN4	Claudina-4
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
EPO	European Patent Office
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
Gp63	Glicoproteína 63
HCT116	Câncer de cólon
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
IC ₅₀	Concentração inibitória média

IFN- γ	Interferon Gama
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
INPI	Brazilian Patent and Trademark Office
IPC	International Patent Classification
IS	Índice de seletividade
J774.A1	Linhagem de macrófagos murinos
KDM4A	Demetilase 4A
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LCM	Leishmaniose Cutânea-Mucosa
LD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LM	Leishmaniose Mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MCF-7	Câncer de mama
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
M1	Macrófago Classicamente Ativo
M2	Macrófago Alternativamente Ativo

NB4	Leucemia promielocítica aguda
NO	Óxido Nítrico
NKs	Natural <i>Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCA	Ácido carboxílico da purpurogalina
PKDL	Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar
PLK1	Polo- <i>like</i> quinase 1
PPG	Purpurogalina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RRPs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
SFB	Soro Fetal Bovino
<i>Spp.</i>	Espécies
SVS/MS	Superintendência de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
Th	Linfócito T auxiliar (<i>T-helper</i>)
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i> -Like
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Treg	Linfócito T reguladores
U-937	Linfoma histiocítico
USPTO	United States Patent and Trademark Office
WIPO	World Intellectual Property Organization
μ M	Micromolar

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GERAL.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1. Aspectos Gerais da Leishmaniose.....	4
3.1.1. Distribuição epidemiológica da doença.....	4
3.1.2. Agente etiológico e ciclo de transmissão.....	7
3.1.3. Imunopatogênese.....	10
3.1.4. Formas clínicas da leishmaniose.....	13
3.1.5. Farmacoterapia atual para Leishmaniose.....	15
3.2. Purpurogalina.....	21
3.2.1. Histórico da Purpurogalina.....	21
3.2.2. Potenciais biotecnológicos da purpurogalina.....	22
4. METODOLOGIA.....	24
4.1. Revisão patentária.....	24
4.1.1. Busca de patentes nas plataformas de pesquisa.....	24
4.2. Pesquisa experimental.....	25
4.2.1. Produção dos derivados da purpurogalina.....	25
4.2.2. Manutenção dos macrófagos da linhagem J774.A1.....	26
4.2.3. Determinação da viabilidade celular na linhagem J774.A1.....	26
4.2.4. Manutenção das espécies de <i>L. infantum chagasi</i> e <i>L. amazonensis</i>	26

4.2.5.	Ensaio de citotoxicidade em promastigotas do gênero <i>Leishmania</i>	27
4.2.6.	Análise estatística.....	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1.	Patentes encontradas nas plataformas.....	28
5.2.	Seleção de documentos.....	30
5.3.	Distribuição temporal.....	34
5.4.	Distribuição geográfica.....	35
5.5.	Avaliação dos Códigos de Classificação Internacional de Patentes (IPC).....	36
5.6.	Inovações farmacológicas contra a leishmaniose visceral nas Américas.....	37
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
6.1.	Avaliação da citotóxica em macrófagos J774.A1 e ação leishmanicida dos derivados nas espécies de <i>Leishmania</i>	44
7.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	50
8.	PERSPECTIVAS	51
9.	REFERÊNCIAS	52
10.	APÊNDICES	68

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) compreendem cerca de 20 doenças transmissíveis que afetam aproximadamente 1,7 bilhões de pessoas em mais de 149 países tropicais e subtropicais. A leishmaniose é incluída entre essas enfermidades, em que condições ambientais e socioeconômicas como a pobreza, desigualdade social e falta de saneamento básico adequado, contribuem na proliferação dos vetores e aumento no número de casos dessa parasitose (Scariot, 2022; OMS, 2015).

A leishmaniose é uma infecção parasitológica causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, transmitido no momento do repasto sanguíneo pelo flebotomíneo fêmea. Existem mais de 20 espécies patogênicas que afetam as pessoas, onde os reservatórios são animais silvestres, domésticos e seres humanos (Abadías-Granado *et al.*, 2021).

Na América Latina, o vetor da leishmaniose pertence ao gênero *Lutzomyia* spp., popularmente conhecido como mosquito-palha. Esse parasito desencadeia duas formas clínicas da doença, a leishmaniose tegumentar (LT) e visceral (LV). As diferentes manifestações da infecção dependem da espécie que acomete o hospedeiro, e no Brasil, às espécies mais recorrentes são *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania infantum chagasi* (Marcondes; Day, 2019).

A LT é a forma mais comum da doença, que demonstra sinais cutâneos específicos que variam de acordo com fatores associados ao parasito, à imunidade do indivíduo e os locais que se encontram as lesões. As manifestações cutâneas são classificadas em diferentes categorias ao observar as delimitações e distribuições das úlceras desenvolvidas pela parasitose (Rodríguez-Vega *et al.*, 2021).

A LV é a forma mais grave, sendo que 90% dos casos não tratados adequadamente resultam em óbito. O principal problema é o diagnóstico errôneo e tardio, assim, aumenta a gravidade da doença e eleva o índice de mortalidade pelo protozoário, tornando-se difícil o tratamento em estágios avançados. Os sinais clínicos são inespecíficos e incluem febre elevada, anemia, palidez, falta de apetite, perda de peso, aumento abdominal e hepatoesplenomegalia (Prestes-Carneiro *et al.*, 2019).

A escolha do tratamento dessa doença, deve levar em consideração muitos fatores, como a forma clínica, o esquema terapêutico mais eficaz, os efeitos colaterais, via de administração e os custos desse medicamento, além de considerar outras condições de saúde que a pessoa infectada possa ter (Charlton *et al.*, 2018).

Atualmente, existem poucas opções de agentes quimioterápicos para o tratamento de ambas as formas de leishmaniose. A primeira escolha são os antimoniatos de meglumina, entretanto, na ausência ou contraindicação do uso desse fármaco, a segunda opção de farmacoterapia é a anfotericina B, que possui diferentes formulações disponíveis, sendo a forma lipossomal a mais utilizada. Outras opções de medicamentos com potencial leishmanicida são a pentamidina, paromomicina e miltefosina (OPAS, 2022).

Entretanto, os tratamentos farmacológicos para leishmaniose apresentam inúmeras limitações, como alta toxicidade hepática e cardíaca, sendo o principal efeito colateral grave desencadeado pela farmacoterapia. Outras problemáticas são o alto custo, tratamento prolongado, a indisponibilidade e a resistência do parasito aos medicamentos (Ghorbani; Farhoudi, 2017).

A falta de investimentos por partes governamentais e o desinteresse das indústrias farmacêuticas por não obterem retornos financeiros esperados, limitam as descobertas de novos protótipos para doenças negligenciadas, como a leishmaniose. No entanto, ela continua sendo um importante problema de saúde pública e deve receber maior atenção para o controle da sua disseminação (Fitzpatrick, 2017).

Atualmente, a busca por compostos sintéticos ou naturais com atividade leishmanicida tem se intensificado, visando encontrar alternativas com menores efeitos colaterais e uma maior capacidade de suprimir a parasitose. Dentre os elementos de origem natural, destaca-se a purpurogalina, um fenol que contém núcleo bezotropolina, entretanto tal substância pode ser adquirida através de procedimentos químicos. A referida substância exibe uma variedade de efeitos farmacológicos contra doenças humanas, tornando-se, assim, uma opção promissora a ser investigada quanto ao seu potencial parasitológico (Pakosz *et al.*, 2021).

Diante dos aspectos observados, apresenta-se a necessidade da compreensão as inovações farmacológicas atuais para a forma mais grave da doença, assim como a descoberta de um novo protótipo eficiente e acessível contra as diferentes espécies de *Leishmania*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão patentária sobre as inovações farmacêuticas para o tratamento de leishmaniose visceral nas Américas entre os anos de 2017 – 2023, assim como investigar a atividade citotóxica e leishmanicida *in vitro* dos derivados da purpurogalina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Efetuar um levantamento quali-quantitativo de patentes que descrevam novos protótipos à fármacos contra *L. infantum chagasi* nos últimos seis anos;
- Investigar os parâmetros das patentes como ano de depósito, inventores, IPC, país de origem, ensaios clínicos e bioativos testados;
- Avaliar o potencial citotóxico dos compostos nas células hospedeiras (macrófagos da linhagem J774.A1);
- Estimar a atividade *in vitro* dos derivados da purpurogalina sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*;
- Determinar o índice de seletividade das substâncias da purpurogalina *in vitro*;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aspectos Gerais da Leishmaniose

3.1.1. Distribuição epidemiológica da doença

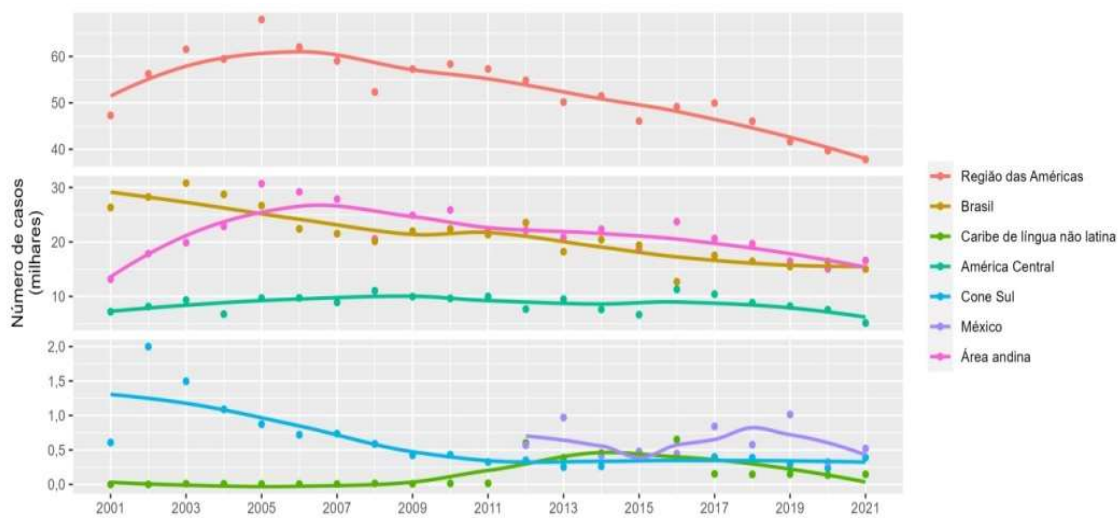
As doenças negligenciadas (DTNs) são classificadas como doenças transmissíveis, causadas por agentes infecciosos e parasitológicos com maiores incidências em países tropicais e subtropicais. Essas enfermidades são associadas à inadequação de cuidados básicos de saúde, carência de saneamento e a pobreza, afetando principalmente a população mais carentes, desnutridas e em condições de moradia precária (OPAS, 2019).

Conforme a organização mundial da saúde (OMS), as DTNs afetam cerca de 1 bilhão de pessoas em todo mundo. Apesar da alta incidência, acontece a falta de interesse na erradicação das doenças, principalmente pelas indústrias farmacêuticas por não obterem um retorno financeiro viável, assim como, por partes governamentais com pouco investimento em pesquisa e inovação para solucionar esse problema de saúde pública (DNDI, 2018).

Segundo os dados da OMS (2023), a leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave, que representa 95% dos casos, e estima-se que entre 50.000 – 90.000 pessoas são infectadas por ano em todo mundo, resultando um alto índice de mortalidade. A leishmaniose tegumentar (LT) é a forma mais comum, estimando-se 600.000 – 1 milhão de novos casos por ano mundialmente.

A leishmaniose é endêmica em aproximadamente 102 países com 1,3 milhões de casos registrados por ano nas Américas. Além disso, são relatados entre 20.000 – 30.000 óbitos anualmente (OPAS, 2019). Entre os anos de 2001 – 2021, foram registrados 1.105.545 casos de leishmaniose tegumentar (Figura 1) e 69.665 casos de leishmaniose visceral em regiões das Américas (Figura 2), sendo o Brasil o país da América Latina mais afetado pelas infecções parasitárias por *Leishmania* (OPAS, 2022).

Figura 1 - Número de casos de Leishmaniose Tegumentar nas Américas em 2001 – 2021



Fonte: OPAS, 2022.

Figura 2 - Número de casos de Leishmaniose Visceral nas Américas em 2001 – 2021



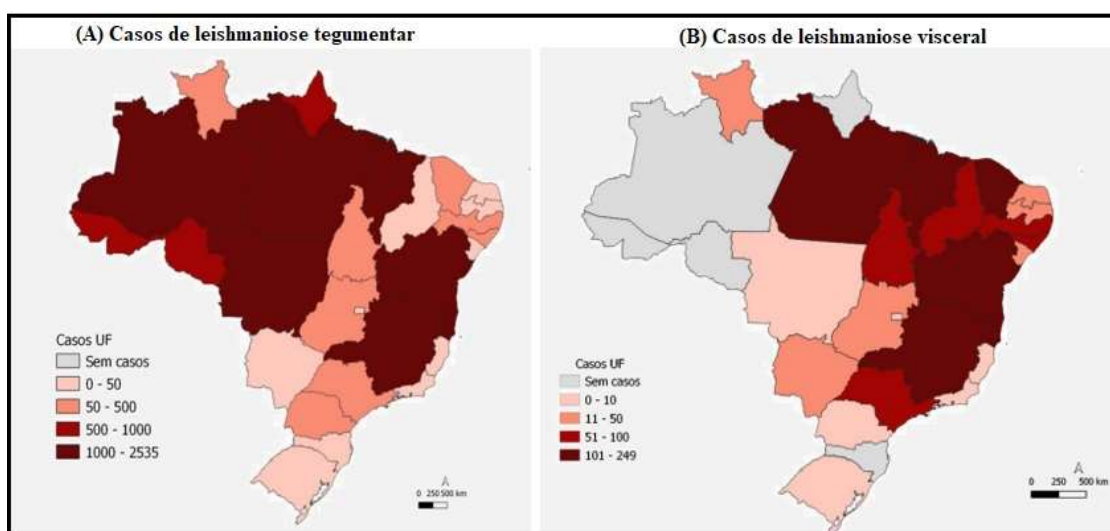
Fonte: OPAS, 2022.

Na América Latina, depois do Brasil, outros países enfrentaram um aumento significativo no número de casos em 2021, incluindo a Argentina, México, Panamá e El Salvador, nos quais as manifestações clínicas predominantes são as formas cutânea e mucocutânea, representando 92,6% e 4,5%, respectivamente. No mesmo ano, foi notificado 93,5% dos casos de LV no território brasileiro, sucedendo-se de outros países como a Venezuela, Paraguai e Argentina, onde crianças menores de 5 anos são mais afetadas (45,7%

dos casos). Todavia, a letalidade é baixa nessa faixa etária (6%), no entanto, a taxa de letalidade da LV é maior em pessoas com mais de 50 anos (18%) (OPAS, 2022).

A LT é registrada em todos os estados do território brasileiro, em maior número nas macrorregiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Figura 3a). Entretanto, A LV tem maior ocorrência na região Nordeste, Sudeste e Norte, como representado na figura 3b (SVS/MS, 2022). Conforme relatado pela secretária de saúde do estado de Alagoas, houve o registro de 504 incidências de leishmaniose visceral e 645 ocorrências de leishmaniose tegumentar ao longo da última década. É relevante ressaltar que a região do sertão alagoano concentrou o maior volume de casos de LV entre os anos de 2008 - 2017, o que pode ser atribuído a uma variedade de fatores, como condições socioeconômicas desfavorecidas, desmatamento e a ausência de adequadas infraestruturas de saneamento (SESAU, 2023; Ferreira *et al.*, 2022).

Figura 3 - Número de casos de leishmaniose tegumentar (A) e visceral (B) no Brasil em 2021



Fonte: Adaptado de SVS/MS, 2022.

Para obter controle das Doenças Tropicais Negligenciadas, são necessários investimentos em pesquisas para produção de fármacos e vacinas, bem como melhorias nas condições sanitárias e redução das desigualdades sociais para evitar a proliferar do agente etiológico e o vetor da leishmaniose (Oliveira, 2018).

3.1.2. Agente etiológico e ciclo de transmissão

O agente etiológico da leishmaniose pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* que inclui cerca de 30 espécies diferentes. É uma

doença primária de animais como representado no quadro 1, mas que pode ser transmitida aos seres humanos. A parasitose é causada por um protozoário intracelular que afeta, sobretudo, as células fagocíticas do sistema imunológico dos mamíferos (Aguilar; Rodrigues, 2017).

Quadro 1 – Principais espécies do gênero *Leishmania* recorrentes nas Américas

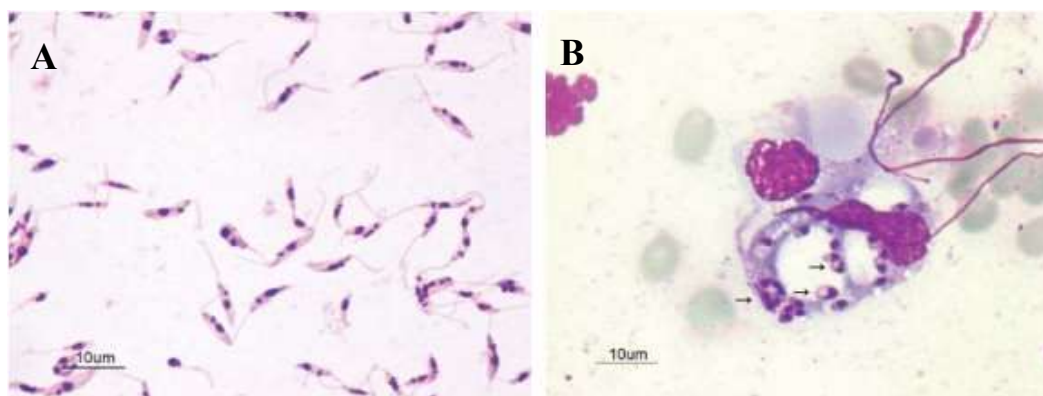
<i>Leishmania</i> spp.	Forma clínica	Vetor	Reservatório animal
<i>L. guyanensis</i>	LC	<i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. anduzei</i> <i>Lu. Whitmani</i>	<i>Choloepus spp.</i> <i>Tamandua spp.</i> <i>Didelphis spp.</i> , <i>Proechimys spp.</i> <i>Proechimys spp.</i>
<i>L. amazonensis</i>	LC	<i>Lu.</i> <i>flaviscutellata</i> <i>Lu. longipalpis</i>	<i>Oryzomys spp.</i> <i>Wiedomys spp</i>
<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. whitmani</i> <i>Lu. intermedia</i> <i>Lu. wellcomei</i> <i>Lu. complexa</i> <i>Lu. neivai</i> <i>Lu. edwardsi</i> <i>Lu. Migonei</i>	<i>Rattus rattus</i> <i>Akodon arviculoides</i> <i>Bolomys spp.</i> <i>Nectomys spp.</i> <i>Thrichomys spp</i>
<i>L. infantum</i> <i>chagasi</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. cruzi</i> <i>Lu. almerio</i> <i>Lu. Salesi</i>	<i>Lycalopex vetulus</i> <i>Cedocyon thous</i> <i>Didelphis albiventris</i>

Fonte: Adaptado de OPAS, 2019.

Os parasitos do gênero *Leishmania* são unicelulares e possuem um ciclo de vida heteróximo (envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados). A forma promastigota apresenta uma morfologia alongada e com mobilidade devido a presença de uma estrutura flagelar livre na região anterior, além de um cinetoplasto mitocondrial e um núcleo na parte posterior (Figura 4a), sua divisão é por fissão binária no trato digestivo do vetor (Blanco; Nascimento-Júnior, 2017).

Após a infecção no hospedeiro, as promastigotas são internalizadas pelas células fagocíticas. Ao se adaptarem as condições intracelulares favoráveis, as promastigotas passam por um processo evolutivo para amastigotas, perdendo a forma flagelada e adquirindo uma morfologia oval imóvel (Figura 4b). As amastigotas se multiplicam até acontecer a lise da membrana plasmática da célula hospedeira, liberando-se no meio extracelular e se tornam propícias para novas fagocitoses por outras células imunológicas (Sunter; Gull, 2017).

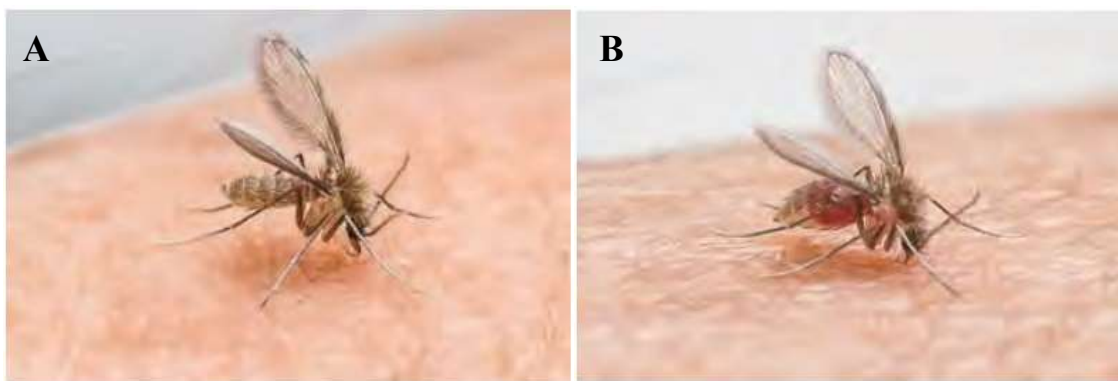
Figura 4 - Forma promastigota (A) e amastigota da *Leishmania* (B)



Fonte: OPAS, 2019.

No Brasil, a transmissão do parasito ocorre pelo vetor *Lutzomyia* spp. que integra à família Psychodidae, subfamília Phebotominae, gênero *Lutzomyia*. Popularmente conhecido como mosquito-palha ou mosquito de areia, os flebotomíneos machos se alimentam de néctar e seivas de organismos vegetais, enquanto as fêmeas se alimentam de sangue para o desenvolvimento dos seus ovos. A figura 5a demonstra o processo de inserção da probóscide do vetor no hospedeiro e a figura 5b ilustra o processo de repasto sanguíneo (Brazil; Rodrigues; Andrade Filho, 2015).

Figura 5 - *Lutzomyia* spp. no hospedeiro (A) e realizando o processo de repasto sanguíneo (B)



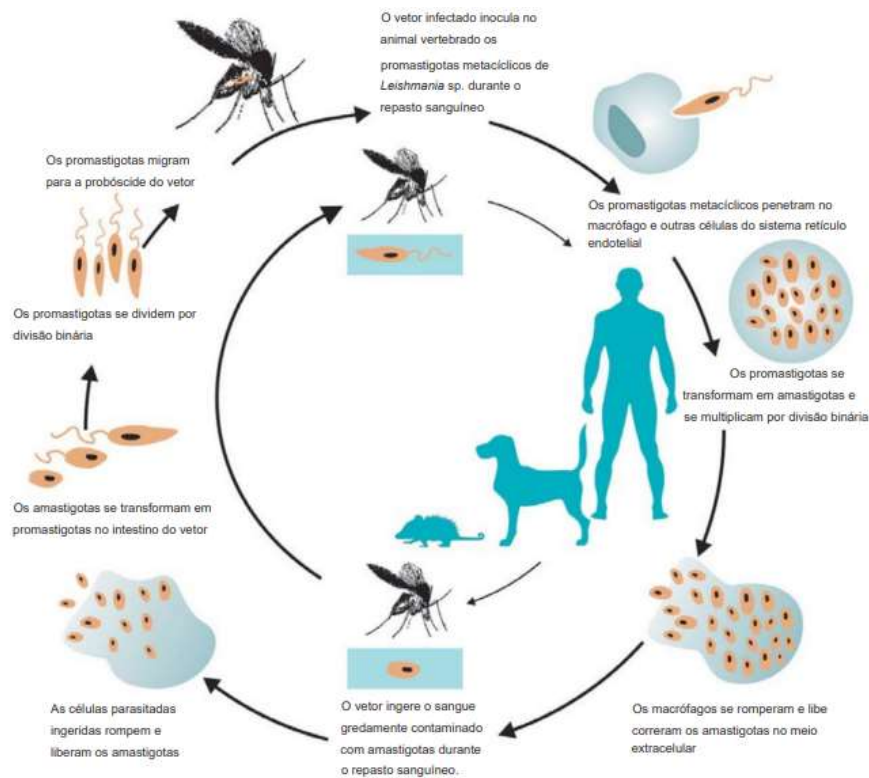
Fonte: OPAS, 2021.

Os principais reservatórios dos parasitos são os animais silvestres, como roedores, marsupiais, tamanduás, quatis, entre outros. Nas áreas urbanas, os animais domésticos também podem ser infectados, como os cães e gatos. A doença, além de ser uma zoonose, pode acometer o ser humano, assim considerada uma antropozoonose (Marcondes; Vasconcellos, 2019).

A figura 6 demonstra o ciclo de vida do protozoário *Leishmania*, que acontece de duas maneiras, o primeiro estágio de desenvolvimento ocorre no vetor, onde as formas promastigotas flageladas extracelulares se multiplicam a partir de divisões binárias no sistema digestivo do díptero e migram para a probóscide durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (Pimenta *et al.*, 2018).

Após a inoculação, o segundo estágio acontece no vertebrado, onde as promastigotas são fagocitadas por diferentes células do sistema imunológico, principalmente monócitos e macrófagos. As formas promastigotas metacíclicas se desenvolvem intracelularmente no vacúolo parasitário, diferenciando-se em amastigotas com o flagelo internalizado e morfologia oval (Bates, 2018).

Figura 6 - Ciclo de transmissão da Leishmaniose



Fonte: OPAS, 2019.

As estruturas parasitológicas se multiplicam por divisão binária até que a célula seja rompida, liberando amastigotas para a região extracelular, permitindo novas fagocitoses e lises celulares. Os flebotomos readquirem os protozoários, após o repasto sanguíneo e sucção de células parasitadas de um mamífero infectado (OPAS, 2021).

Desta maneira, a presença do parasito desencadeia a ativação do sistema imunológico com o recrutamento de células imunes, que buscam controlar a infecção inicial. Em seguida, a imunidade adaptativa é ativada e mediada pela ação dos linfócitos T que produzem citocinas e linfócitos B que liberam anticorpos (Atayde *et al.*, 2016).

3.1.3. Imunopatogênese

A princípio, a resposta imune desencadeada pelo hospedeiro na infecção por *Leishmania*, é da hipersensibilidade tardia, que ativa a imunidade inata por reconhecimento do patógeno através de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) com o auxílio dos receptores do tipo *toll*-like (TLRs), que reconhecem estruturas importantes na superfície

do protozoário como o lipofosfoglicano (LPG), glicoproteína-63 (gp63) e glicosilfosfatidilinositol (GPI). Ao confirmar a presença do parasito, acontece o recrutamento de células imunes primárias para o local da infecção, como os neutrófilos, natural killer (NKs), macrófagos, células dendríticas (CDs), que liberam citocinas pró-inflamatórias e co-estimuladoras (Dubie; Mohammed, 2020).

Os neutrófilos são considerados a primeira barreira de defesa contra infecções por *Leishmania*, eles são recrutados para o local da inflamação no momento do repasto sanguíneo, devido à presença de fatores quimiotáticos. Ao fagocitá-lo, os neutrófilos começam a produzir interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) para atrair outras células de defesa, como os macrófagos, ativando-os e induzindo a apoptose dos neutrófilos infectados (Toepp; Petersen, 2020).

Os macrófagos são as principais células fagocíticas do sistema imunológico e desempenham papéis importantes como de célula hospedeira, célula apresentadora de antígeno (APCs) e célula efetora. Existem duas vias de ativação dessas células imunes: a via clássica do macrófago (fenótipo M1), que leva à eliminação do parasito intracelularmente; e a via alternativa do macrófago (fenótipo M2), que proporciona um ambiente favorável para que a infecção se instale (Sandoval Pacheco *et al.*, 2021).

Quando ativados, os macrófagos secretam interleucina dois (IL-2), espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). A IL-2 é uma molécula citotóxica importante que ativa a via IFN- γ , potencializando a morte dos parasitos intracelulares (Loría-Cervera; Andrade-Narvaez, 2020). Os macrófagos e células dendríticas infectados começam a produzir interleucina doze (IL-12), ativando as NKs que liberam citocinas pró-inflamatórias como a interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que são essenciais para conduzir uma diferenciação de células T imaturas em células T-*helper* tipo 1 (Th1) para mediar esse fenótipo M1 (Ikeogu *et al.*, 2020).

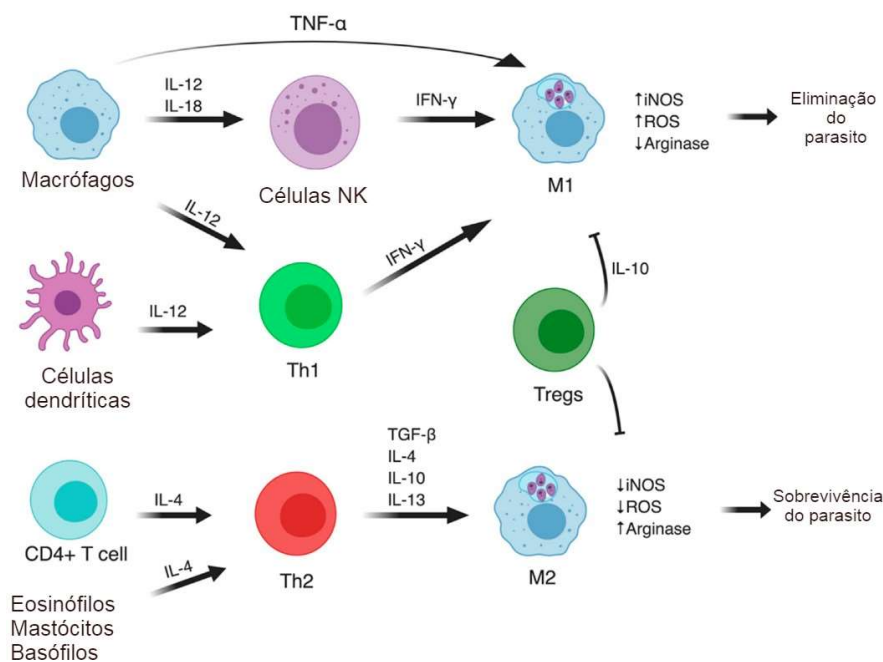
A células NK tem capacidade de lisar diretamente macrófagos e CDs infectadas, bem como induzir a apoptose das formas promastigotas, através do seu potencial citotóxico na produção de granzimas e perforinas (Meira; Gedamu, 2019). Quando os macrófagos fagocitam células parasitadas sem entrar em contato direto com a *Leishmania*, desenvolve-se o fenótipo M2, inibindo a produção de IL-12 e favorecendo a sobrevivência do protozoário intracelularmente. Dessa maneira, outras citocinas como interleucina 4 (IL-4) e interleucina

dez (IL-10) são produzidas pelo parasito para promover sua proliferação (Rodrigues *et al.*, 2017).

Entretanto, apesar da importância da imunidade inata para o controle imediato da infecção, a *Leishmania* desenvolve formas de escapar dos mecanismos de defesa. Deste modo, a imunidade adaptativa é ativada e mediada por linfócitos T (T CD4⁺ e T CD8⁺) e linfócitos B. As células TCD4⁺ diferencia-se em subpopulações Th1, Th2 e Th17, sendo a célula efetora Th1 responsável por desempenhar a eliminação de microrganismos intracelulares, através da produção de INF- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, essas citocinas estimulam a ativação dos macrófagos, proliferação das células T e regula negativamente as células Th2 (Teufel *et al.*, 2021).

As células TCD4⁺ ao se diferenciarem em subpopulação Th2, favorecem a ativação da via alternativa dos macrófagos (fenótipo M2) e, conseqüentemente, ocorre a liberação de citocinas como a interleucina quatro (IL-4), interleucina dez (IL-10), interleucina treze (IL-13) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β). Esse ambiente é favorável para sobrevivência do parasito, pois inativa os macrófagos, suprime a via de óxido nítrico (iNOS) e das espécies reativas de oxigênio (ROS), além de regulação negativa da resposta do Th1, como exposto na figura 7 (Cacheiro-Ilaguno *et al.*, 2021).

Figura 7 - Resposta imune pela infecção do parasito *Leishmania*



Notas: Durante o processo de repasto sanguíneo, as células dendríticas e macrófagos são recrutados para o local da inflamação. Essas células secretam citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IL18 que ativam a via TNF- α , as células NKs e células auxiliares Th1, que induzem a produção de citocina IFN- γ , que é importante na polarização de macrófago M1, responsável pelo combate de infecções, isso torna um ambiente desfavorável para a *Leishmania* com o aumento de NOS, ROS e diminuição da arginase. Por outro lado, os linfócitos T CD4⁺ ativados secretam IL-4, uma citocina anti-inflamatória que ativa células auxiliares Th2, como consequência, tem a liberação de várias citocinas anti-inflamatórias importantes na polarização de macrófagos M2, que criam um ambiente favorável para o parasito por conta da diminuição de NOS, ROS e aumento de arginase. Fonte: Autora, 2023.

As células TCD8⁺ desempenham atividades citotóxicas na eliminação das células infectadas por agentes invasores intracelulares, como a *Leishmania*. Todavia, os linfócitos B apresentam limitações na sua atividade antiparasitária, uma vez que o parasito esteja internalizado no macrófago, é impedida a ação do anticorpo. Esses linfócitos B desempenham a função reguladora, produção de anticorpos e atua como célula apresentadora de antígeno (Sanz *et al.*, 2022).

3.1.4. Formas clínicas da leishmaniose

A leishmaniose pode ser classificada de duas formas principais: Leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) que pode se subdividir em cutânea localizada (LCL), cutânea difusa (LD), cutânea-mucosa (LCM) e cutânea disseminada (LCD), as variadas manifestações clínicas dependem da espécie que está infectando o hospedeiro. No Brasil, as três principais espécies desencadeadoras das formas clínicas de leishmaniose tegumentar, são *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (De Moraes *et al.*, 2022).

A leishmaniose tegumentar pode ser evidenciada de diferentes maneiras, a forma clínica mais comum é a LCL (Figura 8a), se inicia com uma pápula no local da picada do vetor e, posteriormente, se tornam úlceras delimitadas, granulosas e indolores, que podem ser únicas ou múltiplas. A LD (Figura 8b) não começa com úlceras, mas sim com a formação de nódulos moles distribuídos pelo corpo, sendo mais comum em pessoas com deficiência na resposta imune, proporcionando um ambiente favorável para replicação do parasito (Rojas, 2019).

Figura 8 - Leishmaniose cutânea localizada (A) e leishmaniose cutânea difusa (B)



Fonte: OPAS, 2021.

A LCM (Figura 9a), é uma forma tegumentar que causa destruição das mucosas nasal, oral, faríngea e laringe com o surgimento de múltiplas úlceras nessas regiões. Isso leva a uma inflamação intensa e desconforto no indivíduo, com a presença de sangramento nasal, edema e prurido. A LCD (Figura 9b) provoca um elevado número de lesões cutâneas polimórficas entre dez ou mais distribuídas pelo corpo, sendo disseminadas pelas vias hemáticas ou vias linfáticas, favorecem a distribuição do parasito pelo hospedeiro (Kruschewsky *et al.*, 2021).

Figura 9 - Leishmaniose cutânea-mucosa (A) e leishmaniose disseminada (B)



Fonte: OPAS, 2021.

A leishmaniose visceral ou calazar, é a forma mais grave da doença, sendo potencialmente fatal. Os sintomas clínicos são promovidos pela espécie *L. infantum chagasi*, presente na América Latina. Os principais órgãos afetados pela parasitose são o fígado e baço

como representado na figura 10, apresentando maiores complicações em indivíduos com outras infecções, como HIV, torna-se difícil o controle da enfermidade (Mazire *et al.*, 2022).

Figura 10 - Hepatoesplenomegalia em criança com leishmaniose visceral



Fonte: OPAS, 2021.

Todavia, existe a *Leishmania donovani* que também desenvolve leishmaniose dérmica pós-calazar, porém não ocorre no Brasil, a espécie é recorrente em países do velho mundo (Mukherjee *et al.*, 2021). A *L. infantum chagasi* desencadeia sintomas como hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, icterícia, febre irregular e emagrecimento. Essas manifestações são comuns em outras patologias, o que pode levar a um diagnóstico tardio e um aumento da letalidade. Pacientes imunossuprimidos têm maior susceptibilidade a infecções secundárias (De Sousa *et al.*, 2018).

3.1.5. Farmacoterapia atual para Leishmaniose

A leishmaniose continua sendo uma doença de grande importância, principalmente por acometer pessoas de baixa renda e com menor acesso ao serviço de saúde pública de qualidade. Atualmente, não existe nenhuma vacina profilática disponível e os tratamentos quimioterápicos tem suas limitações, incluindo diversos efeitos colaterais, administração pouco favorável, alto custo do tratamento e resistência do parasito (Taslimi *et al.*, 2018).

A escolha do tratamento para a infecção parasitária por *Leishmania*, depende de vários fatores associados ao parasito-hospedeiro. Deve-se levar em consideração a forma clínica, eficiência e toxicidade da farmacoterapia, assim como as condições imunológica da pessoa

infectada, faixa etária e aceitabilidade do paciente a terapia farmacológica (Ponte-Sucre *et al.*, 2017).

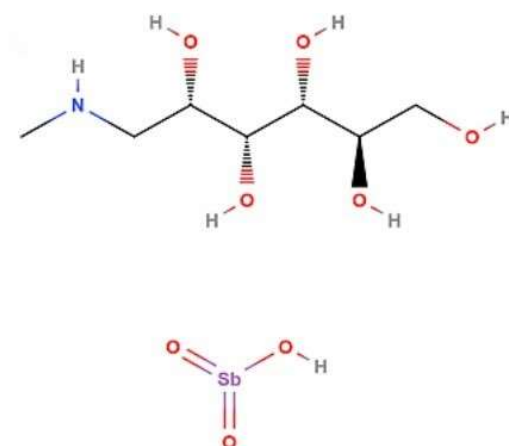
Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes (**Figura 11**), como o antimoníato de meglumina, são a farmacoterapia de primeira escolha para o tratamento das manifestações clínicas causadas pela leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. Eles oferecem menores efeitos colaterais e regressão rápida da doença (Roatt *et al.*, 2020).

Os complexos são adquiridos sinteticamente através da reação do ácido antimônio e da N-metil-glucamina, sendo necessário para ativação desse pró-fármaco, a redução biológica da forma pentavalente (Sb^{+5}) para trivalente (Sb^{+3}). Embora, a ação desses medicamentos não seja totalmente elucidada, acredita-se que eles atuam na inibição de várias enzimas, como a tripanotona redutase e topoisomerase, induzindo a apoptose do parasito (Santiago *et al.*, 2021).

No entanto, limitações significativas são associadas ao tratamento com antimoniais pentavalentes, como sua via de administração intramuscular e intravenosa, que pode causar dor intensa, flebite e edema. Além disso, esses fármacos têm alta taxa de falha em pacientes com coinfeção HIV/leishmaniose, sendo proibido a utilização por gestantes e pessoas com mais de 50 anos. Normalmente, o tratamento causa efeitos adversos moderados, entretanto, sua toxicidade pode causar alterações cardíacas, renais e outras alterações fisiológicas, especialmente com o uso prolongado (Caetano *et al.*, 2019).

Figura 11 - Estrutura química dos antimoniais pentavalentes empregados no tratamento de leishmaniose



Fonte: Holanda *et al.*, 2018.

Anfotericina B

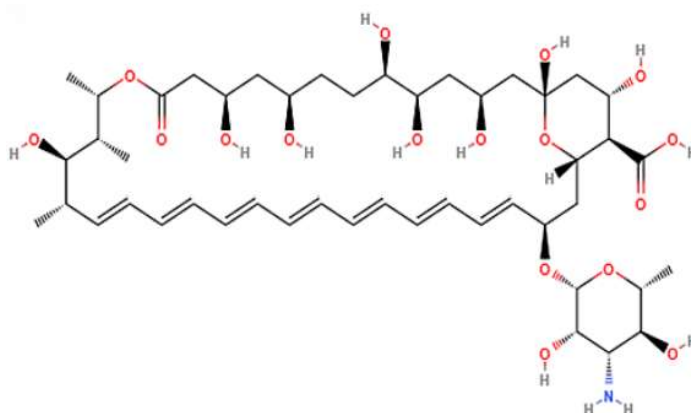
A anfotericina B (**Figura 12**) é um antifúngico poliênico com potencial leishmanicida e está disponível em duas principais formas de comercialização, a anfotericina B desoxicolato e lipossomal. Diferentemente do antimoniato de meglumina, a anfotericina B demonstra eficácia no tratamento da leishmaniose em gestantes, pacientes com coinfeção de HIV, indivíduos transplantados, maiores de 50 anos e em casos de resistência ao tratamento com antimoniais, tornando-se a primeira escolha para esses grupos (De Sousa *et al.*, 2019).

O parasito contém em sua membrana plasmática um importante esteróide chamado ergosterol, que da qual a anfotericina B interage e altera a permeabilidade da membrana, resultando na morte da *Leishmania*. A eficiência do fármaco pode ser atribuída à sua característica anfipática encontrada na composição (Patricio *et al.*, 2019).

A anfotericina B desoxicolato (AmB-D) apresenta algumas limitações, como alta nefrotoxicidade, baixa solubilidade e permeabilidade, além da via de administração intravenosa ser uma dificuldade na aceitação da terapia farmacológica. Em contrapartida, foram desenvolvidas outras formulações desse medicamento que demonstram uma semelhança na eficiência, porém os efeitos adversos foram variados, outra alternativa é o tratamento com anfotericina B associado com outros fármacos com ação leishmanicida (De Faria Ribeiro *et al.*, 2021).

As outras formulações criadas foram a anfotericina B complexo lipídico (ABLC), anfotericina B dispersão coloidal (ABCD) e anfotecina B lipossomal (AmB-L). No Brasil, as formas mais utilizadas são AmB-D e AmB-L, sendo que a anfotericina B lipossomal demonstra melhorias em relação à formulação tradicional, com maior eficácia, menor toxicidade e tolerância a via de administração intravenosa, embora apresente custo elevado, restringindo seu uso (Groll *et al.*, 2019).

Figura 12 - Estrutura química da anfotericina B empregado no tratamento de leishmaniose



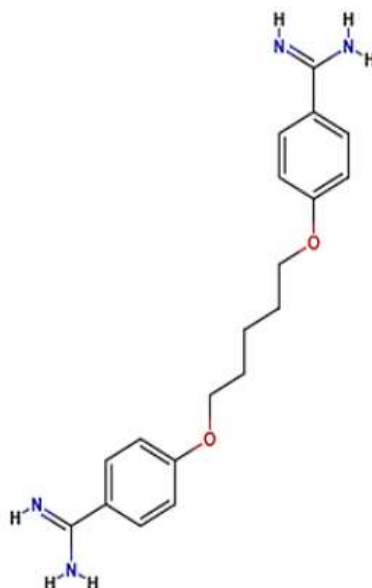
Fonte: Holanda *et al.*, 2018.

Pentamidina

A pentamidina (**Figura 13**) é um composto sintético da amidina com estrutura de diamidinas aromáticas em duas formas, o isotionato e mesilato. No Brasil, é comercializado a formulação de isotionato de pentamidina, apesar de seu principal uso ser antimicrobiano, o mesmo demonstra atividade leishmanicida. O mecanismo de ação ainda não é totalmente estabelecido, mas sugere-se que o princípio ativo inibe a topoisomerase mitocondrial II e diminui o potencial da membrana mitocondrial, ao penetrar no parasito através dos transportadores de arginina e poliamina (Maia *et al.*, 2019).

A pentamidina é usada como segunda escolha para tratamento de LV em casos de resistência aos antimoniais. Contudo, apresenta diversas limitações devido à sua alta toxicidade, sendo contraindicado para gestantes, crianças abaixo de 8 kg, indivíduos com insuficiência renal e hepática, entre outras patologias. Efeitos adversos comuns são evidenciados, como cefaleia, náuseas, dor abdominal, taquicardia, pancreatite que pode contribuir para o desenvolvimento de diabetes mellitus (Anversa *et al.*, 2018).

Figura 13 - Estrutura química da pentamidina empregado no tratamento de leishmaniose



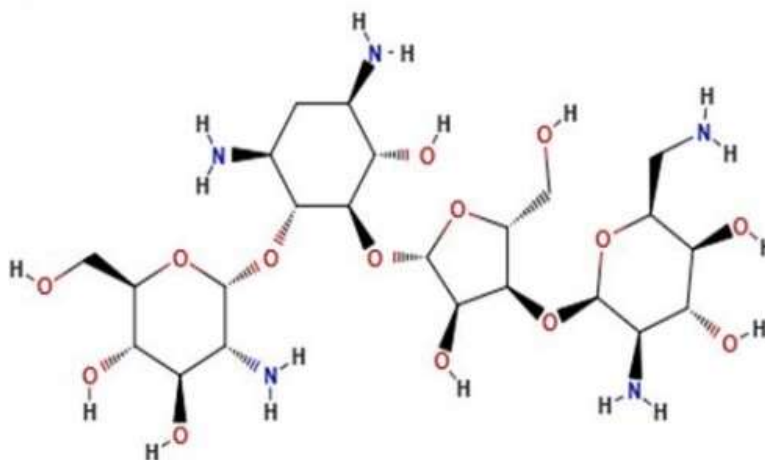
Fonte: Holanda *et al.*, 2018.

Paramomicina

A paromomicina (**Figura 14**) é um antibiótico aminoglicosídeo com atividade leishmanicida, sua via de administração é intramuscular para infecções por leishmaniose visceral ou como tratamento tópico em casos de leishmaniose cutânea. O medicamento é utilizado em associação com outros fármacos para potencializar a sua ação antiparasitária (Daga *et al.*, 2021).

O mecanismo de ação desse antibiótico no gênero *Leishmania*, envolve interferência na síntese proteica e na modificação da membrana mitocondrial. A paromomicina tem eficiência na erradicação do parasito, possui efeitos colaterais leves, sendo relativamente acessível em termos de custo. Entretanto, comprova-se limitações na efetividade e aumento da resistência do protozoário quando ao uso do medicamento de forma isolada (Hendrickx *et al.*, 2017).

Figura 14 - Estrutura química da paromomicina empregado no tratamento de leishmaniose



Fonte: Holanda *et al.*, 2018.

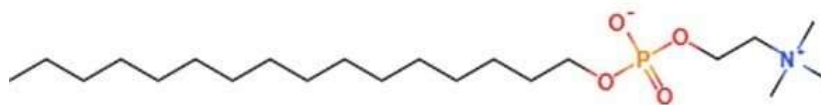
Miltefosina

A miltefosina (**Figura 15**) é um agente alquilfosfocolina que contém um éster de fosforilcolina de um álcool de cadeia longa. Inicialmente planejado para exercer uma ação anticancerígena, porém foi descoberto o seu potencial antiparasitário aplicando-se em casos de leishmaniose. O fármaco representou um avanço significativo no tratamento da *Leishmania* por ser o único administrado por via oral, tornando-se mais aceitável pelos pacientes (Palić *et al.*, 2022).

O mecanismo de ação da miltefosina ainda é pouco compreendido, mas acredita-se que desempenha uma ação direta no parasito, se ligando a fosfolipídios e esteroides presentes na membrana do protozoário. Essa interação influencia no metabolismo e na composição da bicamada lipídica, assim como na função mitocondrial, levando à apoptose (Palić *et al.*, 2019).

Apesar de seus benefícios, a miltefosina apresenta algumas limitações, incluindo a falta de acessibilidade e alto custo. Embora seja geralmente bem tolerada pelos pacientes, pode-se observar efeitos colaterais leves, como náuseas, vômitos, dor abdominal, prurido, entre outros sintomas comuns. Crianças menores de 12 anos e que tenham ictiose congênita são contraindicados a utilização do medicamento, também foram evidenciados casos de teratogenicidade e resistência do parasito quando aplicada a miltefosina como monoterapia, com isso, é necessária uma associação com outros leishmanicidas (Carnielli *et al.*, 2019).

Figura 15 - Estrutura química da miltefocina empregado no tratamento de leishmaniose



Fonte: Holanda *et al.*, 2018.

As terapias farmacológicas atuais para leishmaniose apresentam diversas deficiências, incluindo efeitos adversos graves, alto custo e duração prolongada do tratamento, além de contraindicações de acessibilidade para alguns grupos como crianças, gestantes, idosos acima de 50 anos e indivíduos com coinfeção de HIV/leishmaniose. A resistência do protozoário aos medicamentos também é um desafio significativo. Portanto, é imprescindível a busca por novos protótipos com potencial leishmanicida, eficientes e acessíveis para indivíduos carentes com pouco acesso aos serviços de saúde pública (Blanco; Nascimento-Junior, 2017).

Os protótipos são desenvolvidos com o propósito de direcionar ação a um componente particular presente no alvo específico. Um exemplo notável é a enzima topoisomerase, que desempenha um papel crucial na regulação e replicação do DNA. Esta enzima é encontrada em diversos parasitos, sendo de suma importância para a sobrevivência do protozoário *Leishmania* (Deguchi *et al.*, 2015).

3.2. Purpurogalina

3.2.1. Histórico da Purpurogalina

A purpurogalina (2,3,4,6-tetrahidroxy-5H-benzocyclohepten-5-one) é um fenol de origem natural extraído de nozes do carvalho da espécie *Quercus spp.* O composto é formado a partir de um processo de oxidação do pirogalol, sendo uma aglicona associada com outras glicosídeos (Sugiyama; Fung, 1993).

A descoberta da biomolécula laranja-avermelhada ocorreu em 1969, quando o francês Aimé Girard realizou a oxidação do pirogalol que resultou na formação do composto denominado purpurogalina. Posteriormente, em 1887, os pesquisadores Perkin, Nietzki e Steinmann, realizaram experimentos para sinterizar da substancia utilizando ácido nitroso, por

oxidação eletrolítica do pirogallol e purificação por cristalização em ácido acético (Perkin; Steven, 1903).

A formulação $C_{11}H_8O_5$ da purpurogalina foi estabelecida pelos pesquisadores Evans e Dehn em 1930, após avaliarem o efeito oxidante da substância em solução aquosa de iodato de sódio e pirogallol. Apesar das várias técnicas para obtenção desse elemento químico, o processo de oxidação com pirogallol é o mais utilizado nas pesquisas, devido a sua facilidade de conversão (Evans; Dehn, 1930).

A estrutura química da purpurogalina contém hidroxílicas fenólicas no anel benzênico e enólicas no anel tropolona, além da presença de derivados éteres e ésteres de metoxilados, como monometilpurpurogalina, dimetilpurpurogalina, trimetilpurpurogalina e tetrametilpurpurogalina (Da Silva; Camara, 2020).

3.2.2. Potenciais biotecnológicos da purpurogalina

A purpurogalina (PPG) e seus derivados tem demonstrado diversos potenciais biotecnológicos, podendo ser uma opção de molécula para investigação da atividade leishmanicida, por existir pesquisa que comprova a ação antiparasitária. A partir do trimetilpurpurogalina foram formulados ésteres alifáticos e aromáticos que desempenharam ação contra *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum in vitro*, demonstrando ação similar ao fármaco padrão benznidazol utilizado na doença de Chagas (Ren *et al.*, 2001).

A molécula do estudo é capaz de desencadear ação citoprotetora em queratinócitos, por meio da supressão de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas por radiação ultravioleta B e material particulado, que são responsáveis por causar alterações genéticas no DNA e desenvolvimento de câncer (Zhen *et al.*, 2018).

A estrutura química da PPG, exerce ações citoprotetoras contra danos ocasionados por radicais livres de oxigênio em hepatócitos, assim como a proteção de células renais que são afetadas por oxirradicais, a molécula inibe a xantina oxidase que é uma enzima que danifica diretamente as células desse órgão (Gossiau *et al.*, 2018).

Esse princípio ativo atua como um agente anticancerígeno, inibindo o crescimento do carcinoma de células escamosas de esôfago, interrompendo o ciclo celular nas fases S e G2, reduz a expressão de ciclina A2 e ciclina B1. O composto inibe a proteínas quinases (MEK1 e MEK2), induzindo a apoptose dessa linhagem de células tumorais (Xie X *et al.*, 2019).

A polo-*like* quinase 1 (Plk1) são reguladores diretos do ciclo celular que contribui na transcrição e proliferação de células cancerígenas, e a busca por inibidores do domínio quinase de Plk1 são essenciais. A purpurogalina natural revela eficiência na inibição da polo-*like* quinase 1 (Plk1), desse modo, intervém no bloqueio mitótico e induz a apoptose nas células tumorais (Archambault; Normandin *et al.*, 2017).

O ácido carboxílico da purpurogalina (PCA) foi sintetizado e avaliado na inibição da claudina-4 (CLDN4), uma proteína expressa em diferentes tipos de câncer, que contribui na angiogênese agressiva das células tumorais. O PCA tem atividade citotóxica em células de câncer de mama (MCF-7) e câncer de pulmão (A549), sendo um forte candidato como agente carcinogênico (Rambabu; Jayanthi, 2019).

Além disso, os derivados da purpurogalina tem sido estudado em diferentes linhagens de câncer para inibição da demetilase 4A (KDM4A), que é uma enzima que regula positivamente a sobrevivência do câncer. O ácido 3,4,6-trihidroxi-5-oxo-1-fenil-5H-benzo[7]anuleno-8-carboxílico identificada como 9bf, atua diretamente no bloqueio da KDM4A, portanto, inibe as células de câncer de cólon (HCT116), câncer de mama (MCF-7), linfoma histiocítico (U-937), leucemia promielocítica aguda (NB4) e células tumorais células, essa molécula não apresenta citotoxicidade em células normais (Souto *et al.*, 2020).

Ensaio experimentais foram realizados para analisar o potencial anti-inflamatório da purpurogalina em doenças neurológicas em situação de isquemia cerebral. Posteriormente, ao tratamento com essa molécula química foi observado resultados promissores, redução de edema cerebral, neuroinflamação e apoptose das células neuronais hipocâmpais (Cheng *et al.*, 2023).

4. METODOLOGIA

4.1. Revisão patentária

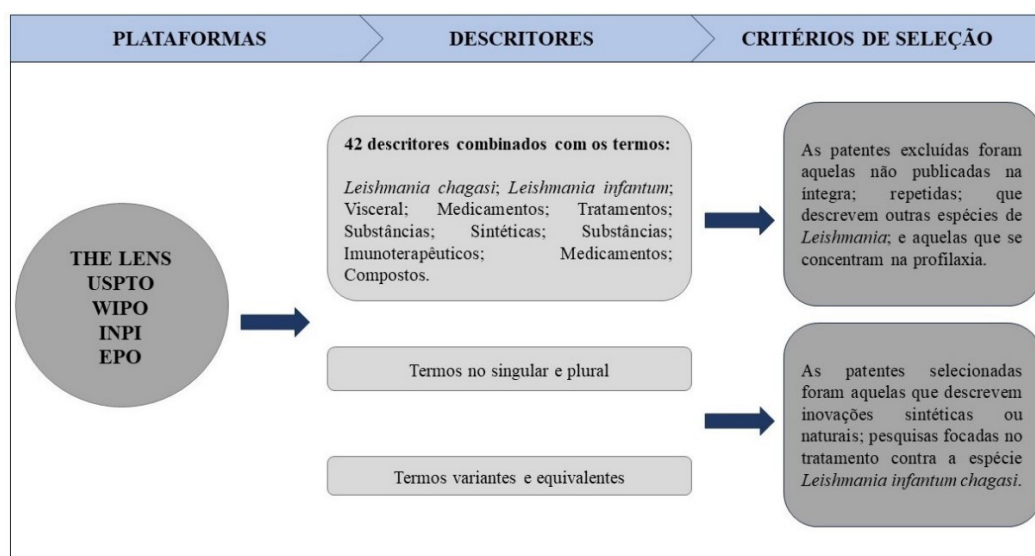
4.1.1. Busca de patentes nas plataformas de pesquisa

A pesquisa de patentes foi conduzida utilizando os descritores selecionados (Figura 16) nas plataformas THE LENS, Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO), Escritório Europeu de Patentes (EPO), Escritório de Patentes e Marcas Registradas dos Estados Unidos (USPTO) e Instituto Nacional da Patentes e Marcas (INPI).

Os filtros utilizados nas plataformas foram "Texto Completo", "Data de Publicação" e "Qualquer Campo". Contudo, no INPI, todos os termos foram modificados para o português e a busca foi realizada por meio da função "busca avançada", por se tratar de uma plataforma brasileira. Os parâmetros para investigação de patentes incluíram ano, inventores, país de origem, classificação internacional de patentes (IPC), ensaios clínicos e bioativos.

Ao obter a quantidade geral das patentes, os documentos foram submetidos a critérios de seleção, sendo excluídas as patentes que não estavam publicadas na íntegra, repetidas e que descreviam o potencial leishmanicida das inovações farmacológicas em outras espécies de *Leishmania* que não aquela escolhida no estudo. No entanto, as incluídas foram aquelas que apresentaram inovações sintéticas ou naturais, cuja pesquisa estava focada no tratamento e não profilaxia da *L. infantum chagasi*.

Figura 16 - Plataformas de patentes e combinações de termos utilizados



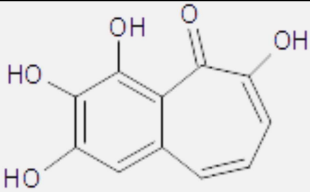
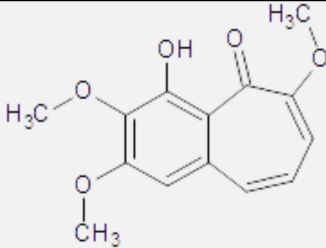
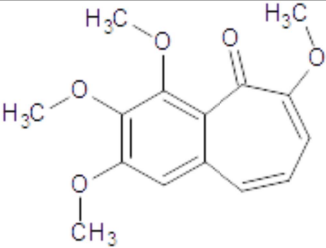
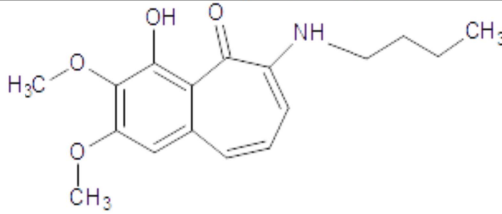
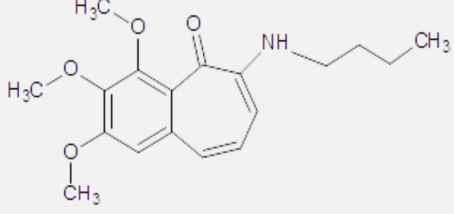
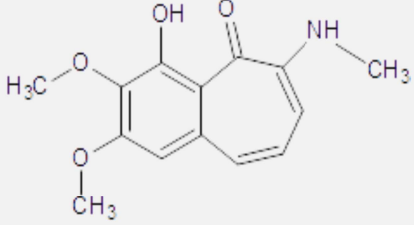
Fonte: Autora, 2024.

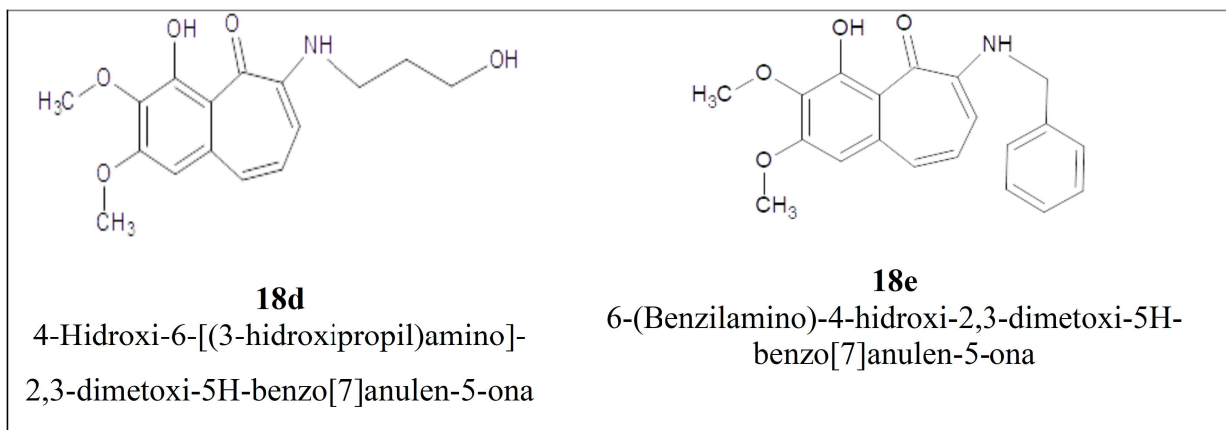
4.2. Pesquisa experimental

4.2.1. Produção dos derivados da purpurogalina

A purpurogalina e seus derivados representados no quadro 2, foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos (LSCB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo Prof. Dr. Celson Amorim Camara e a Mestre Yasmim Lucas da Silva.

Quadro 2 - Estruturas moleculares dos derivados da purpurogalina

 8 2,3,4,6-Tetrahidroxibenzociclohepten-5-ona	 18 4-Hidroxi-2,3,6-trimetoxi-5H-benzo[7]anulen-5-ona-trimetilpurpurogalina
 19 2,3,4,6-Tetrametoxi-5H-benzo[7]anulen-5-ona-tetrametilpurpurogalina	 18a 6-(Butilamino)-4-hidroxi-2,3-dimetoxi-5H-benzo[7]anulen-5-ona
 19a 6-(butilamino)-2,3,4-trimetoxi-5H-benzo[7]anulen-5-ona	 18b 4-Hidroxi-2,3-dimetoxi-6-(metilamino)-5H-benzo[7]anulen-5-ona



Fonte: Adaptado de Silva, 2022.

4.2.2. Manutenção dos macrófagos da linhagem J774.A1

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em garrafas de cultura em 10 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute-1640) suplementado com L-glutamina, piruvato, aminoácidos não essenciais, 10% de soro fetal bovino (Roche) e mantidos em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% CO₂.

4.2.3. Determinação da viabilidade celular na linhagem J774.A1

No momento do uso, os macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em placas de 96 poços em uma concentração de 5×10^4 células/poço e incubadas *overnight* em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi removido dos poços e as células foram submetidas ao tratamento em triplicata com 200 µL das substâncias diluídas em meio RPMI nas diferentes concentrações 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 µM, reincubados por 48h. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de MTT (Mosmann, 1983) e realizando a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular dos macrófagos tratados com os compostos foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle que receberam apenas o meio RPMI suplementado.

4.2.4. Manutenção das espécies de *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis*

As formas promastigotas de *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis* foram mantidas *in vitro* em meio Schneider's (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2mM de L-glutamina e 2% de urina humana estéril, em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) a 25°C. Ao alcançarem o seu crescimento ideal, as mesmas foram utilizadas para a realização dos experimentos.

4.2.5. Ensaio de citotoxicidade em promastigotas do gênero *Leishmania*

Os parasitos foram centrifugados em 3500 rpm, 10 minutos e a 25°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em meio Schneider. Foram utilizados 1×10^5 parasitos/mL, posteriormente foram distribuídos 100µL dessa suspensão em placa de 96 poços. O tratamento foi realizado em triplicatas com os compostos diluídos em 100, 30, 10, 1, 3, 0,3 µM e anfotericina B de 100 a 0,001 µM, como também o controle de veículo DMSO 0,2% preparadas em meio Schneider suplementado, para alcançar um volume final de 200µL por poço. A placa foi incubada em estufa BOD a 27°C por 48 horas. Após esse período, o número de parasitos foi determinado utilizando câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio óptico. A inibição causada por cada extrato foi expressa como uma porcentagem em relação às células cultivadas apenas na presença do veículo DMSO e meio Shneider.

4.2.6. Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos no ensaio *in vitro* foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) e testes post-hoc de Tukey, utilizando o GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA Statistical). Os dados foram considerados significativos quando *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001 e ****p<0,0001 em relação ao diluente dos extratos DMSO 0,2%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Patentes encontradas nas plataformas

Ao utilizar as combinações de descritores nas plataformas definidas, inúmeras patentes foram obtidas, conforme demonstrado na Tabela 1. Um total de 451.980 registros foram encontrados após a aplicação dos filtros de busca especificados. Alguns termos selecionados foram excluídos devido à impossibilidade de análise e identificados com o caractere de truncamento "*", resultando em um total de 5.110 patentes restantes para avaliação. Os bancos de dados The Lens, WIPO e EPO tiveram o maior número de patentes, seguidos por USPTO e INPI em ordem decrescente.

Tabela 1 - Dados quantitativos de patentes por plataformas

Termos de busca	INPI	THE LENS	WIPO	EPO	USPTO	TOTAL
<i>Leishmania chagasi</i> AND medicaments	32	184	172	54	48	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND medicament	210	205	0	80	48	0
<i>Leishmania infantum</i> AND medicaments*	32	453	510	107	141	0
<i>Leishmania infantum</i> AND medicament*	761	492	0	201	137	00
Visceral AND medicaments*	424	8.518	0	1.495	1.810	0
Visceral AND medicament*	766	8.522	0	4.448	543	00
<i>Leishmania chagasi</i> AND immunotherapeutics	86	50	38	7	14	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND immunotherapy	253	162	0	46	48	0
<i>Leishmania infantum</i> AND immunotherapeutics	86	128	90	15	31	0
<i>Leishmania infantum</i> AND immunotherapy	253	310	0	87	83	0

Visceral AND immunotherapeutics*	22	1.334	0	159	340	0
Visceral AND immunotherapy*	259	3.521	7	1.324	934	00
<i>Leishmania chagasi</i> AND treatments*	219	412	358	89	103	00
<i>Leishmania chagasi</i> AND treatment*	12.665	406	10	142	103	0
<i>Leishmania infantum</i> AND treatments*	32	971	908	283	283	0
<i>Leishmania infantum</i> AND treatment*	12.665	1.062	16	398	297	00
Visceral AND treatments*	225	22.798	6	6.141	5.461	00
Visceral AND treatment*	12.667	22.780	1	19.249	5.431	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND synthetic substances	74	278	227	92	64	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND synthetic substance*	961	300	0	71	59	0
<i>Leishmania infantum</i> AND synthetic substances*	74	697	656	281	210	0
<i>Leishmania infantum</i> AND synthetic substance*	961	758	0	230	179	0
Visceral AND synthetic substances*	511	11.929	0	3.959	2.680	00
Visceral AND synthetic substance*	968	11.929	0	3.872	2.116	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND drugs	93	418	39	116	94	0000
<i>Leishmania chagasi</i> AND drug	124	418	39	124	90	00
<i>Leishmania infantum</i> AND drugs*	93	886	6	278	224	0
<i>Leishmania infantum</i> AND drug*	124	886	17	332	212	0
Visceral AND drugs*	99	19.561	98	11.396	4.636	00
Visceral	130	19.562	175	12.697	4.350	00

AND drug*						
<i>Leishmania chagasi</i> AND compounds*	5.687	423	2	117	102	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND compound*	6.026	423	0	117	91	00
<i>Leishmania infantum</i> AND compounds*	5.687	1.025	5	353	285	0
<i>Leishmania infantum</i> AND compound*	6.026	1.025	0	334	258	0
Visceral AND compounds*	5.693	18.783	24	7.032	4.353	00
Visceral AND compound*	6.029	18.783	5	8.809	3.921	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND substances	393	337	2	101	85	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND substance*	799	337	0	92	68	0
<i>Leishmania infantum</i> AND substances*	393	829	0	265	236	0
<i>Leishmania infantum</i> AND substance*	799	829	0	264	192	0
Visceral AND substances*	399	16.141	5	8.705	3.766	00
Visceral AND substance*	805	16.141	3	8.038	2.824	00
Subtotal	0	0	0	0	0	00
Total	451.980					

*Termos excluídos devido à impossibilidade de análise.

Fonte: Autora, 2024.

5.2. Seleção de documentos

As patentes foram analisadas seguindo critérios de inclusão que consistiram em pesquisa experimental sobre protótipos sintéticos ou naturais, ensaios farmacológicos *in vitro* ou *in vivo*, publicados nos últimos seis anos, em qualquer idioma e com avaliação de compostos contra *Leishmania infantum chagasi*. Os critérios de exclusão incluíram publicações não encontradas na íntegra, duplicatas, estudos envolvendo outras espécies de *Leishmania*, bem como estudos com foco na profilaxia ao invés do tratamento da LV.

Após a análise, foram encontradas 11 patentes que atenderam aos critérios de pesquisa (Tabela 2). A plataforma The Lens obteve o maior resultado, com 46% (5 patentes), seguida pela WIPO com 27% (3 patentes) e EPO com 27% (3 patentes). No entanto, nenhuma patente foi selecionada das plataformas USPTO e INPI (Gráfico 1).

Tabela 2 - Dados das patentes selecionadas de acordo com os critérios da pesquisa

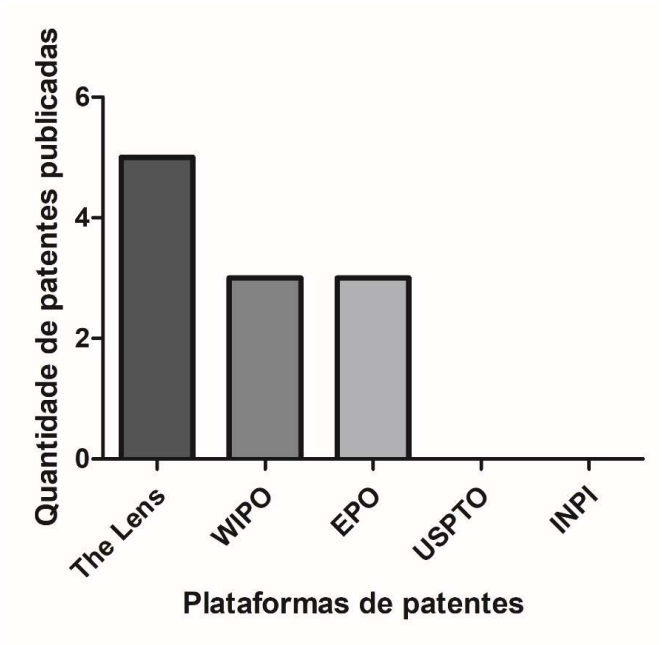
Códigos	Títulos	IPC	Autores	Origem	Ano de publicação	Ensaio clínico	Bioativos
EP2950795B1	Método de tratamento e cura da leishmaniose com fexinidazol	A61K31/4164; A61P33/02;	Pollmeier e Blair	Estados Unidos	2018	<i>in vivo</i>	fexinidazol
WO2018015595A2	Compostos para o tratamento de doenças causadas por parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	Sem classificação	Gómez <i>et al</i>	Espanha	2018	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Illa (hidroxamato de O-benzila)
JP2018043998A	Composições farmacêuticas compreendendo lipossomas convencionais e lipossomas de circulação prolongada para tratamento de leishmaniose visceral	A61K31/12; A61K31/137; A61K31/138; A61K31/155; A61K31/192; A61K31/198; A61K31/352; A61K31/4196; A61K31/422; A61K31/454; A61K31/47; A61K31/4706; A61K31/474; A61K31/496; A61K31/519; A61K31/56; A61K31/685; A61K31/7036; A61K31/704; A61K31/7052; A61K31/739; A61K33/24; A61K38/20; A61K45/00; A61K47/24; A61K47/28; A61K9/127; A61P33/02;	Frederico <i>et al</i>	Brasil	2018	<i>in vivo</i>	Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais e lipossomas de circulação prolongada

EP3502109A1	Heterociclos triazol-fenil-tiazol como inibidores inovadores da tripanotiona redutase e seu uso como leishmanicidas	CO7D417/04; A61K31/426; A61P33/02; CO7D417/14;	Camarasa <i>et al</i>	Espanha	2019	<i>in vitro</i>	5-6-5 heterociclos triazol-fenil-tiazol
WO2020139291	Derivados da naftalimida como agentes antiparasitários no tratamento da leishmaniose, bem como de doenças virais, bacterianas e neoplásicas	C07D221/14; C07D401/12; C07D417/12; C07D413/12; A61K31/437; A61P33/00;	Guzel <i>et al</i>	Turquia	2020	<i>in vitro</i>	Bisnaftalimidopropil
WO2021205303	Formulação compreendendo óleo ozonizado para uso na prevenção e/ou tratamento de leishmaniose	A61K33/00; A61K36/28; A61K9/00; A61P33/02;	Carocci	Inglaterra	2021	<i>in vivo</i>	Óleo de amendoim ozonizado
EP40922030A1	Derivados da pirrolopirimidina e seu uso no tratamento da leishmaniose	C07D487/04; A61P33/14; A61K31/519;	Breese <i>et al</i>	Europa	2022	<i>in vivo</i>	Derivados de pirrolopirimidina
WO2022101588A1	Complexos de ouro (I) com ligantes de carbeno N-heterocíclicos fluorados e uso dos mesmos como agentes terapêuticos	A61P35/00; C07F1/00; C07H23/00;	Gornitzka <i>et al</i>	França	2022	<i>in vitro</i>	Complexos de ouro com ligantes do tipo carbeno N-heterocíclicos
WO2022/008708A1	Composições veterinárias para prevenção e/ou tratamento de leishmaniose	A61P33/02 A61K31/357	Varloud <i>et al</i>	França	2022	<i>in vivo</i>	Artesunato

EP3995502A1	Sais de 4-hidroxifenilfosfônio com propriedades antiparasitárias	C07F9/54; A61K31/66;	Dardonville <i>et al</i>	Espanha	2022	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	4- hidroxifenil fosfônio
WO2022/008784A1	Utilização de poliaminas acíclicas simples no tratamento de doenças causadas por parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	A61P33/02 A61K33/02 C07D221/00 C07D215/02	García-Espanã <i>et al</i>	Espanha	2022	<i>in vitro</i>	Poliaminas acíclicas simples

Fonte: Autora, 2024.

Gráfico 1 – Quantidade de patentes selecionadas por plataformas



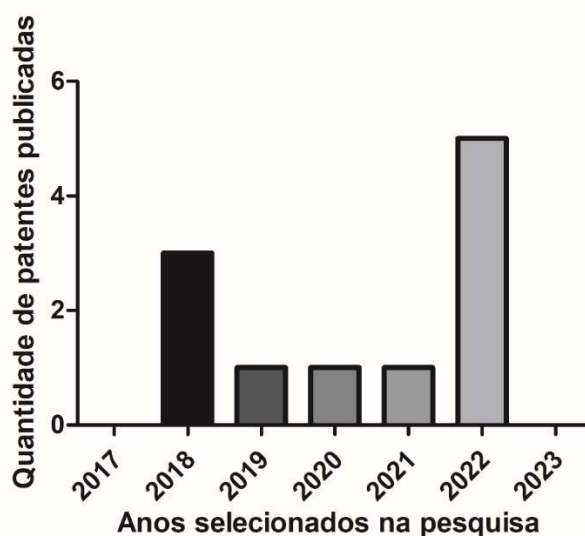
Fonte: Autora, 2024.

5.3. Distribuição temporal

A distribuição de patentes sobre inovações farmacológicas para o tratamento da leishmaniose visceral nas Américas de 2017 a 2023, variaram consideravelmente. Entre as pesquisas selecionadas, não houve patentes publicadas sobre esse tema em 2017. No entanto, em 2018, houve um número considerável de publicações (3 patentes) sobre essas inovações farmacológicas para o tratamento da LV em comparação com outros anos na investigação.

Nos anos seguintes, houve uma diminuição nas publicações em 2019, 2020 e 2021 com apenas uma patente em cada ano. Em 2022, o número de publicações relacionadas a esse tema aumentou, com o maior número de patentes publicadas (5 patentes). Até o momento, não foram encontradas publicações que atendam aos critérios selecionados para o ano de 2023 (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Distribuição temporal das patentes selecionadas



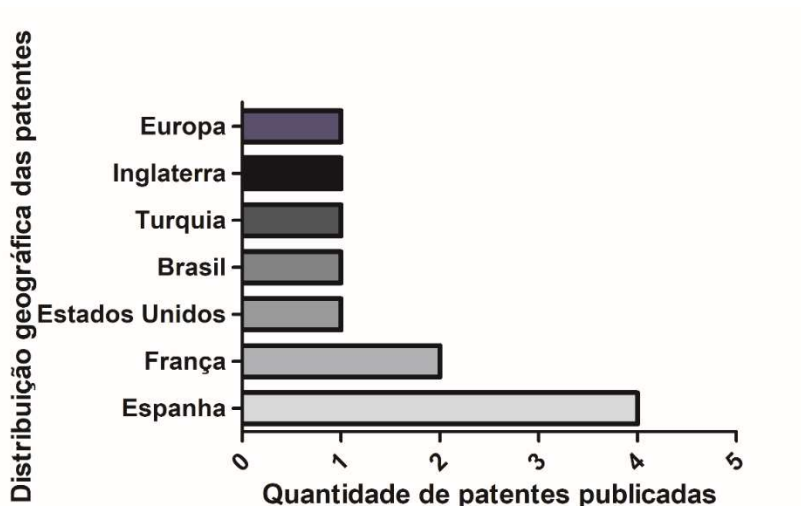
Fonte: Autora, 2024.

5.4. Distribuição geográfica

Ao analisar a distribuição geográfica das patentes selecionadas (Gráfico 3), observou-se que a Espanha teve o maior número de patentes relacionadas à investigação de novos medicamentos para a doença (4 patentes), se sucedendo pela França com 2 patentes. Em seguida, estão os Estados Unidos, Brasil, Turquia, Inglaterra e o continente europeu, cada um com apenas uma patente.

O Brasil é um dos principais países com casos de leishmaniose visceral. No entanto, a falta de investimento em ciência dificulta o avanço da pesquisa no Brasil em direção a fases clínicas mais avançadas, impedindo o desenvolvimento de um medicamento eficaz com alto potencial terapêutico contra *Leishmania infantum chagasi* (Franco *et al.*, 2021).

Gráfico 3 - Distribuição geográfica das patentes designadas na pesquisa



Fonte: Autora, 2024.

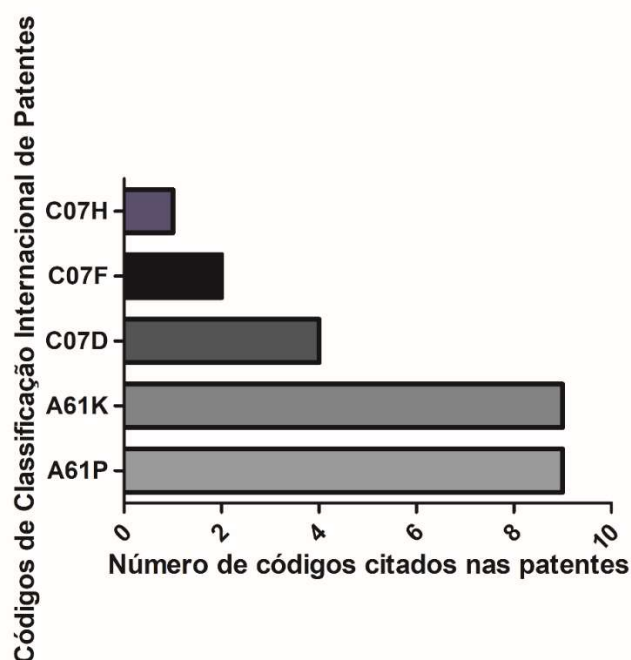
5.5. Avaliação dos Códigos de Classificação Internacional de Patentes (IPC)

As patentes são categorizadas com diferentes códigos da Classificação Internacional de Patentes (Gráfico 4). O código A61P foi mencionado em nove das onze patentes selecionadas, sendo documentos que relatam a atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais. No entanto, o código A61K foi o mais citado em nove patentes designadas, representando pesquisas focadas no campo das necessidades humanas com preparações para fins médicos, dentários ou de higiene pessoal. O código C07D foi citado em quatro patentes, classificando-as na área de química/metalurgia referente a compostos heterocíclicos.

Outros códigos menos citados incluíram o C07F (2 patentes), que envolve pesquisa sobre compostos acíclicos, carbocíclicos ou heterocíclicos contendo elementos diferentes de carbono, hidrogênio, halogênios, nitrogênio, enxofre, selênio ou telúrio. No entanto, o código C07H (1 patente) abrange trabalhos com açúcares; seus derivados; nucleosídeos; nucleotídeos; e ácidos nucleicos.

Praticamente todos os documentos de patente apresentam um código da Classificação Internacional de Patentes (IPC), que serve para facilitar a identificação uniforme de documentos de propriedade intelectual. As patentes são organizadas em seções, subseções, classes, subclasses e grupos, seguindo um princípio hierárquico baseado na origem das inovações e seus objetivos. O IPC permite que pesquisadores busquem por novidades, validade, patenteabilidade, violação e informações, tornando-se uma ferramenta de relevância significativa (WIPO, 2020).

Gráfico 4 - Classificação Internacional de patentes dos documentos selecionados



Fonte: Autora, 2024.

5.6. Inovações farmacológicas contra a leishmaniose visceral nas Américas

A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença com aproximadamente 3.000 novos casos por ano. Quando não tratada, leva à morte de 90% dos indivíduos infectados. Entre os países da América Latina, o Brasil é o principal país com o maior número de casos relatados. Apenas em 2020, foram registrados 1.933 casos com uma ampla distribuição nos estados brasileiros (OPAS, 2021).

A farmacoterapia atual para *Leishmania infantum chagasi* apresenta inúmeras limitações, destacando a necessidade de novos protótipos maior eficiência, menor citotoxicidade e com efeitos colaterais mínimos para os indivíduos acometidos pelo protozoário. Embora as doenças tropicais negligenciadas não sejam a primeira opção de investimento por grandes indústrias farmacêuticas devido ao retorno financeiro limitado, a importância de buscar novos tratamentos para a LV, presente em vários países e com altas taxas de mortalidade em todo o mundo, não pode ser subestimada (Vasconcelos; Rezende, 2021).

A Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) expõe protótipos de medicamentos para leishmaniose visceral. Em ensaios clínicos de fase I, acoziborol,

nitroimidazol, GSK245 e DNDI-6899 são mencionados. No entanto, em ensaios clínicos de fase II, apenas o LXE408 da Novartis está sendo testado. Na fase III, testes são descritos com combinações de tratamentos existentes usados para leishmaniose, como anfotericina B lipossomal + miltefosina para casos de leishmaniose visceral na Ásia e miltefosina + paromomicina ou anfotericina B lipossomal para casos de leishmaniose visceral no Sudão. Da mesma forma, o uso de miltefosina + paromomicina em casos de leishmaniose visceral na África, mostrou-se uma alternativa promissora de tratamento (DNDi, 2023).

Na América Latina, um estudo colaborativo buscou uma melhor alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral. Esta pesquisa foi realizada no Brasil com o apoio da DNDi, do Ministério da Saúde, da Universidade de Brasília e da Fundação Oswaldo Cruz, demonstrando que a anfotericina B lipossomal é o tratamento de primeira escolha, sendo mais curto e seguro. No entanto, este medicamento desencadeia efeitos colaterais significativos, destacando a necessidade da busca por novas alternativas farmacológicas (DNDi, 2022).

A pesquisa referenciada EP2950795B1 descreve a investigação do fexinidazol para o tratamento de *L. infantum chagasi in vivo*. No experimento, cães naturalmente infectados em um ambiente endêmico foram utilizados, resultando em descobertas promissoras: Houve eliminação completa do parasito e ausência de sintomas (Pollmeier; Blair, 2018). O fexinidazol pertence ao grupo dos nitroimidazóis e age como um pró-fármaco ativado pelas enzimas nitro-redutase da *Leishmania*, exercendo uma ação antiprotozoária (Fersing *et al.*, 2018).

Pesquisas recentes confirmam o potencial leishmanicida do fexinidazol *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com promastigotas. Este fármaco, originalmente comercializado como agente tripanocida, também demonstrou a capacidade de reduzir a carga parasitária de *L. infantum chagasi* no fígado e no baço (Teixeira *et al.*, 2019). O registro NCT01980199 descreve o fexinidazol como um tratamento oral em ensaios clínicos de fase II em pacientes com leishmaniose visceral no Sudão, fornecendo ausência do parasito no dia 28 ou no dia 56 do tratamento, dispensando a necessidade de medicação adicional até o dia 210. No entanto, os estudos foram interrompidos devido à falta de eficiência observada ao longo da pesquisa (Clinical Trials, 2015).

A pesquisa mencionada no documento EP4092030A1 discute a síntese de derivados de piridopirimidina e seu potencial leishmanicida no modelo *in vivo* do hamster *L. infantum*

chagasi. Após a administração de três derivados, C1 (metoxibenzonitrila), C3 (amina) e C4 (carbonitrila), além do controle (miltefosina), observou-se uma redução no número de parasitos no fígado, baço e medula óssea (Breese *et al.*, 2022). As pirimidinas sintéticas representam estruturas químicas capazes de gerar derivados como pirrolipirimidina, que exibem potencial antiparasitário contra *Trypanosoma brucei*, tornando-os uma alternativa promissora para inovações medicamentosas derivada do composto, e que possam desempenhar uma atividade anti-*Leishmania* (Gibson *et al.*, 2009).

Novos derivados de triazolopiridopirimidinas foram avaliados quanto ao seu potencial leishmanicida *in vivo* em modelos murinos com infecção aguda por *L. infantum chagasi*. O derivado 1^a (3-fenil-6,8-di(2-piridil)-[1,2,3]triazolo[5',1':6,1]pirido[2,3-d]pirimidina) demonstrou notável atividade anti-*Leishmania* contra as formas amastigotas presentes no baço desses animais por sua capacidade de afetar a integridade do DNA parasitário e induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Adam *et al.*, 2015).

O arquivo EP3502109A1 explora a capacidade de heterociclos 5-6-5 triazol-fenil-tiazol e seus derivados estruturalmente substituídos (IA) e sais catiônicos de triazol (IB) como inibidores da atividade e dimerização da enzima tripanotiona redutase presente na *Leishmania*. Entre as formas promastigotas, o composto 10d (IB) demonstrou uma eficácia superior de 47,02%. Em amastigotas axênicas, o derivado 8j (IA) exibiu um efeito máximo de 25,08% e em amastigotas intracelulares, o derivado 8e (IA) alcançou uma eficácia de 33,6% (Camarasa *et al.*, 2019).

Atualmente, novas formulações de derivados triazólicos estão sendo desenvolvidas para validar o potencial leishmanicida. O pesquisador Gontijo (2021) investiga a ação dos alquiltriazóis e alquilfosfocolinas em hamsters fêmeas infectadas com amastigotas de *L. infantum chagasi*. Quando comparado ao grupo de controle, que apresentou valores de 4,67 e 5,92x10⁵/g de parasitos no baço e fígado, respectivamente. O tratamento com alquiltriazóis mostrou resultados mais promissores, registrando valores de 1,30⁴/g e 1,36x10³/g no baço e fígado de modo respectivo.

O documento patentário WO2020139291 expõe o potencial dos derivados de bisnaftalimidopropil como protótipos para medicamentos contra doenças parasitárias, incluindo a leishmaniose. Entre os vários compostos desenvolvidos, o composto 9 exibiu atividade contra a forma promastigota de *L. infantum chagasi in vitro*, em que resulta em uma

taxa de mortalidade de 45% após 3 dias de tratamento (Guzel *et al.*, 2020). Derivados sintéticos de bisnaftalimidopropil revelam um mecanismo de ação ao inibir a atividade de desacetilase dependente de NAD⁺ de sirtuina, levando à apoptose as promastigotas de *L. infantum chagasi* (Keskin *et al.*, 2019; Islek *et al.*, 2022).

Variações de derivados de bisnaftalimidopropil foram criadas e investigadas quanto ao seu potencial anti-*Leishmania in vivo*. Em testes experimentais, camundongos BALB/c cronicamente infectados com *L. infantum chagasi* receberam os compostos e ocasionaram uma redução significativa na carga parasitária no fígado e no baço dos animais, mesmo em um curto período de tratamento (Tavares *et al.*, 2012).

A descrição patentária WO2021205303 explora a eficácia do óleo de amendoim ozonizado contra *L. infantum chagasi in vivo*. O experimento foi realizado com quatro cães (2 machos e 2 fêmeas) infectados naturalmente com *L. infantum chagasi*, cada animal demonstrou sintomas variados da doença. Os resultados revelaram regressão dos sintomas ou recuperação completa da condição clínica em cães que receberam o tratamento (Caroci, 2021). A ionização é um processo que adiciona íons superóxido (-) à molécula de O₂. A ozonioterapia tem sido implementada usando óleos vegetais, que foram extensivamente estudados contra infecções parasitárias (Akash e Rajasekar, 2021).

Pesquisas indicam que o ozônio induz a peroxidação e destruição das paredes celulares e membranas citoplasmáticas de *Leishmania*, degradando componentes essenciais como glicoproteínas, glicolipídios e aminoácidos cruciais para a estrutura do parasito (Rajabi, 2015). O autor Moda *et al.* (2014) avaliou os efeitos da ozonioterapia intra-abdominal e intra-renal em cães infectados com *L. infantum chagasi* por quatro semanas, observando melhorias significativas nas condições renais dos animais com diminuição nos níveis séricos de ureia e creatinina, que são frequentemente alterados em cães parasitados pela espécie de *Leishmania*.

A patente WO2018015595A2 menciona a investigação do composto benzil O-hidroamato ligado a nanopartículas de ouro e seu potencial leishmanicida em promastigotas e amastigotas *in vitro*, assim como *in vivo* em camundongos BALB/c contra *L. infantum chagasi*. Os resultados obtidos foram promissores e mostraram uma redução no número dos agentes parasitários em mais de 90% (Gómez *et al.*, 2018). Os ácidos hidroxâmicos podem operar por diferentes mecanismos de ação, incluindo a inibição de histona deacetilases

encontradas no gênero *Trypanosoma* spp. e atuando na inibição de IspC, uma enzima presente no *Plasmodium berghei* (Behrendt *et al.*, 2011; Kelly *et al.*, 2012).

Os ácidos hidroxâmicos são encontrados em produtos naturais e suas propriedades de quelatação de metal demonstram ação anti-tripanosomal contra *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*, exibindo eficácia contra espécies de *Leishmania* spp. (Alam, 2019; Foscolos *et al.*, 2022). Outro estudo envolvendo derivados de O-álquil hidroxamatos implementados em nanopartículas de ouro demonstrou aumento da atividade contra amastigotas de *L. infantum chagasi* introduzidas em camundongos BALB/c, resultou em uma menor carga parasitária no fígado e baço (Corpas-López *et al.*, 2020).

A pesquisa descrita na patente EP3995502A1 discute o potencial de derivados de 4-hidroxifenilfosfônio contra as formas de promastigotas e amastigotas de *L. infantum chagasi*, o agente causal da leishmaniose visceral. O composto 1 com a formulação química de Brometo de (15-(2,4-di-hidroxifenil)-15-oxopentacil) trifenilfosfônio não apresentou uma redução significativa na carga parasitária *in vitro*. No entanto, os estudos *in vivo* em camundongos BALB/c tratados, demonstrou uma redução de mais de 98% no número de parasitos ao analisar o fígado e o baço (Dardonville *et al.*, 2022).

Os sais de trifenilfosfônio são moléculas que atuam nas mitocôndrias de *Leishmania*, interferindo no metabolismo energético e afetando a síntese de ATP. Camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. infantum* e submetidos ao tratamento com derivados de 4-hidroxifenilfosfônio. Após esse período, o baço e o fígado foram removidos para análise da carga parasitária, confirmando a redução de parasitos com o tratamento estabelecido (Manzano *et al.*, 2019).

O documento patentário JP2018043998A relata o aprimoramento de lipossomas convencionais com antimoniato de meglumina associada a lipossomas de longa circulação no tratamento de *L. infantum chagasi*. Ensaio *in vivo* realizados em camundongos BALB/c mostraram uma diminuição significativa dos protozoários em principais órgãos afetados pela doença (Frederic *et al.*, 2018). Embora o mecanismo de ação do antimoniato de meglumina não esteja completamente elucidado, acredita-se que o fármaco atue inibindo várias enzimas, como a tripanotona redutase e a topoisomerase para induzir a apoptose (Santiago *et al.*, 2021).

Dos Santos *et al.* (2020) definem o potencial terapêutico de lipossomas convencionais e lipossomas PEGilados para a entrega de antimoníato de meglumina + alopurinol para o tratamento da leishmaniose. Experimentos *in vivo* em cães mostram resultados promissores em comparação com o alopurinol e o grupo não tratado. Houve supressão da carga parasitária de *L. infantum chagasi* no fígado, baço e medula óssea, potencializada por esses complexos lipossomais. O uso de nanopartículas de lipossomas está sendo cada vez mais emergente para o tratamento de diversas enfermidades, justamente por suas características físico-químicas que proporciona uma biocompatibilidade e a entrega eficiente de medicamento na região alvo (Eygeris *et al.*, 2022).

Na descrição patentária WO2022101588A1 investiga a ação leishmanicida de complexos de ouro com ligantes de carbeno heterocíclico fluorado. Testes experimentais *in vitro* com *L. infantum chagasi* na forma amastigota axênica mostram que a maioria dos complexos de ouro formulados foi igual ou mais eficaz do que medicamentos de controle (anfotericina B, pentamidina, miltefosina e fexinidazol) (Gornitzka *et al.*, 2022).

Zhang *et al.* (2018) analisam uma série de cinco novos complexos de ouro contendo carbênios heterocíclicos em promastigotas e amastigotas axênicos de *L. infantum chagasi* *in vitro*. Os complexos de ouro têm um mecanismo de ação que modifica e bloqueia os resíduos de cisteína nos sítios ativos de enzimas do protozoário. Os complexos na pesquisa foram ativos e seletivos contra *L. infantum* quando comparados a medicamentos padrão (anfotericina B, pentamidina e miltefosina).

A patente WO2022/008708A1 avalia o artesunato em cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*. O artesunato é um peróxido orgânico semissintético do grupo da artemisinina usado para o tratamento de malária grave, administrado por via oral com dose diária por 6 dias. O medicamento demonstrou segurança e eficácia, com redução significativa nos sintomas clínicos e na carga parasitária em comparação com antimoníato de meglumina + alopurinol.

O estudo experimental de Medkour *et al.* (2020) destaca a ação do artesunato contra *L. infantum chagasi* em cães naturalmente infectados. A pesquisa incluiu 42 cães acompanhados por um período de 6 meses, onde o grupo controle recebeu os medicamentos padrão antimoníato de meglumina e alopurinol por 28 dias, enquanto o grupo tratado recebeu artesunato por 6 dias. Observou-se uma diminuição nos anticorpos, tornando os animais que

receberam artesunato soronegativos (58%), juntamente com melhorias nos sinais clínicos e eliminação de parasitos, sem efeitos colaterais durante o tratamento com artesunato, tornando-o uma alternativa promissora ao compor com os resultados do meglumina antimoniato e alopurinol.

O documento WO2022008784A1 investiga as atividades de poliaminas acíclicas simples ligadas a heterocíclicos para o tratamento de leishmaniose e tripanossomíase *in vitro*. Os resultados obtidos nas formas de promastigotas e amastigotas da espécie *L. infantum* demonstram que os compostos da pesquisa têm a capacidade de inibir a superóxido dismutase, uma enzima exclusiva de parasitos cinetoplastídeos pertencentes ao gênero *Leishmania*.

Várias substâncias de poliaminas estão sendo investigadas para compreender a ação leishmanicida na inibição enzimas cruciais para a sobrevivência do parasito, como o superóxido dismutase de ferro. Os derivados de poliaminas mostraram eficácia contra *L. infantum chagasi*, apresentando uma notável alteração metabólica com aumento de succinato, levando a altos níveis de estresse redox, assim como L-alanina e acetato (Urbanová *et al.*, 2019).

Ao analisar as inovações de medicamentos descritas no DNDi, nenhum dos protótipos mencionados nas patentes foram incluídos. Isso destaca a escassez de opções para tratar a leishmaniose visceral, uma doença recorrente e letal na América Latina. Isso enfatiza a falta de reconhecimento para os casos de doença negligenciada, destacando a urgência de avanços na pesquisa contra a leishmaniose visceral e a expansão de ensaios farmacológicos.

É importante ressaltar que os protótipos mencionados nas patentes apresentam resultados promissores e são fortes candidatos a medicamentos, exibindo um potencial considerável contra *Leishmania infantum chagasi* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essas diferentes inovações são eficazes contra as formas promastigotas e/ou amastigotas do protozoário, capazes de atuar em diferentes alvos moleculares presentes na *Leishmania*, resultando na indução de atividade leishmanicida.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Avaliação da citotóxica em macrófagos J774.A1 e ação leishmanicida dos derivados nas espécies de *Leishmania*.

Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade da purpurogalina e derivados sobre macrófagos da linhagem J774.A1, cujos resultados podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 - Efeito citotóxico do tratamento *in vitro* da purpurogalina e derivados sobre macrófagos da linhagem J774.A1 durante 48 h

Tratamentos	CI ₅₀ ^a (μM) ± EP	Citotoxicidade Máxima ± EP (%) ^b
Anfotericina B	52,56 ± 4,08	63,82 ± 1,07****
8	>100	34,28 ± 1,82****
18	>100	30,68 ± 2,52*
19	>100	13,29 ± 2,99
18 ^a	>100	6,23 ± 3,61
19 ^a	27,89 ± 4,52	89,43 ± 0,37****
18b	>100	30,70 ± 1,66****
18d	> 100	32,24 ± 2,66****
18e	37,89 ± 0,96	90,61 ± 0,30****

^aConcentração inibitória de 50% ± erro padrão da concentração inibitória em J774.A1, calculada usando curvas de concentração-resposta. ^bMédia ± erro padrão da média do efeito máximo na viabilidade de J774.A1, em triplicado de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram significativos quando ****p<0,0001 em comparação com o grupo DMSO 0,2%.

Observa-se, que dos sete derivados da purpurogalina, apenas o 19a e 18e foram citotóxicos com efeito máximo >80%. Entretanto, os outros derivantes apresentaram um IC₅₀ (média da concentração inibitória do composto) >100 μM e um efeito máximo <50%, demonstrando pouca citotoxicidade as células hospedeiras, ao se contrapor com a anfotericina B que apresentou um IC₅₀ de 52,56 μM e um efeito máximo 63,83%. As substâncias 19a e 18e que tiveram citotoxicidade, demonstraram uma similaridade nas suas estruturas químicas pela presença de radicais de metoxila (CH₃O) nos carbonos 2 e 3 das moléculas, assim como uma estrutura cíclica fechada com uma cetona (C = O).

Compreende-se que, a purpurogalina (PPG) desempenha um papel citoprotetor de antioxidantes contra a xantina oxidase, que é uma flavoproteína que produz ânions superóxidos tóxicos. A PPG consegue executar uma citoproteção natural pela presença das troponas que contribuem para a bioatividade contra radicais tóxicos de superóxido e hidroxila, como é o caso do peróxido de hidrogênio que causa danos ao DNA e apoptose de células T (Popov *et al.*, 2019).

Igualmente, foi avaliada a citotoxicidade da purpurogalina e derivados, assim como o índice de seletividade frente às células hospedeiras e as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*, como demonstrados na tabela 4 e 5.

Tabela 4 - Efeito leishmanicida da purpurogalina e derivados contra as formas promastigotas da espécie *L. amazonensis*

Tratamentos	CI ₅₀ ^a (μM) ± EP	Citotoxicidade Máxima ±EP (%) ^b	IS ^c
Anfotericina B	0,90 ± 0,04	92,81 ± 1,90****	58,4
8	>100	NC	-
18	>100	26,61 ± 1,24****	-
19	>100	48,92 ± 1,90****	-
18 ^a	>100	18,70 ± 0,71***	-
19 ^a	22,99 ± 1,35	91,47 ± 1,55****	1,21
18b	33,44 ± 2,64	90,70 ± 2,68****	>2,99
18d	22,43 ± 2,01	91,47 ± 0,77****	>4,45
18e	24,06 ± 0,68	88,37 ± 1,34****	1,57

^aConcentração inibitória de 50% ± erro padrão da concentração inibitória em promastigota de *L. amazonensis*, calculada usando curvas de concentração-resposta. ^bMédia ± erro padrão da média do efeito máximo na viabilidade de promastigota de *Leishmania*, em triplicado de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram significativos quando ****p<0,0001 em comparação com o grupo DMSO 0,2%. NC: Não citotóxico até a concentração máxima testada, quando comparado ao grupo DMSO 0,2%. ^cIS: Índice de seletividade = CC₅₀(macrófagos) / IC₅₀ (*Leishmania* spp.).

Promastigotas da espécie *L. amazonensis* foi submetida ao tratamento com os provenientes da purpurogalina, verificando-se que, o 19a (22,99 μM) 18b (33,44 μM), 18d (22,43 μM) e 18e (24,06 μM), demonstraram eficiência na inibição do parasito com efeito

máximo >80%, semelhantes ao fármaco padrão que apresentou efeito máximo de 92,81% e um IC₅₀ de 0,90 µM. Entretanto, as substâncias 8, 18, 19 e 18a não tiveram citotoxicidade maior que 50%.

As substâncias 19a, 18b, 18d e 18e são ativos contra a cepa do *Leishmania*, possuindo grupos funcionais em suas estruturas químicas com a presença de agrupamentos aminas secundárias (N-butilamina, butilamina, metilamina ou benzilamina) e radicais de metila (CH₃). O que diferem são suas quantidades e distribuições dessas estruturas pela molécula da purpurogalina, todavia, a 18e é o único derivado com a adição de uma benzilamina.

A finalidade do índice de seletividade, é obter um parâmetro de seleção da substância às células humanas ou cepas das espécies de *Leishmania*, sendo considerada seletiva aquela com valor igual ou superior a 10. As substâncias 18b e 18d, demonstraram valores >2,99 e >4,45, respectivamente. Desta maneira, por não terem alcançado valores definitivos, conclui-se que os dois derivantes podem ou não serem seletivos ao protozoário.

Tabela 5 - Efeito leishmanicida da purpurogalina e derivados contra as formas promastigotas da espécie *L. infantum chagasi*

Tratamentos	CI ₅₀ ^a (µM) ± EP	Citotoxicidade	IS ^c
		Máxima ±EP (%) ^b	
Anfotericina B	26,46 ± 3,62	78,86 ± 0,90****	2,41
8	>100	NC	-
18	9,94 ± 4,15	60,22 ± 3,87****	>10,06
19	79,01 ± 8,28	59,14 ± 2,15****	>1,26
18 ^a	25,30 ± 0,55	75,27 ± 1,07****	>3,95
19 ^a	28,66 ± 5,98	89,81 ± 0,92****	0,97
18b	22,36 ± 1,45	86,13 ± 2,92****	>4,47
18d	38,01 ± 2,26	81,48 ± 2,45****	>2,63
18e	22,67 ± 2,21	90,48 ± 4,15****	1,67

^aConcentração inibitória de 50% ± erro padrão da concentração inibitória em promastigota de *L. infantum chagasi*, calculada usando curvas de concentração-resposta. ^bMédia ± erro padrão da média do efeito máximo na viabilidade de promastigota de *Leishmania*, em triplicado de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram significativos quando ****p<0,0001 em comparação com o grupo DMSO 0,2%. NC: Não

citotóxico até a concentração máxima testada, quando comparado ao grupo DMSO 0,2%. $^{\circ}\text{IS}$: Índice de seletividade = $\text{CC}_{50}(\text{macrófagos}) / \text{IC}_{50}(\text{Leishmania spp.})$.

Os derivados 18 (9,94 μM), 19 (79,01 μM), 18a (25,30 μM), 19a (28,66 μM), 18b (22,36 μM), 18d (38,01 μM) e 18e (22,61 μM) são eficientes na inibição de *L. infantum chagasi* com efeito máximo >59%. Entretanto, destaca-se as substâncias 19a, 18b, 18d e 18e, que foram as mais promissoras frente ao protozoário, demonstrando um efeito máximo superior a 80%. Esses produtos revelam uma maior citotoxicidade do que a anfotericina B, que expõe uma ação citotóxica de 78,86% e um IC_{50} de 26,46 μM .

Observa-se que, os derivados que manifestaram maiores eficiências (19a, 18b, 18d e 18e), foram os mesmos que obtiveram resultados promissores na inibição de *L. amazonensis*. Ao analisar o índice de seletividade, apenas a substância 18 foi seletiva contra as promastigotas de *L. infantum chagasi* com um valor >10,06 e demonstrando um menor IC_{50} de 9,94 μM ao contrapor com os outros originados. Entretanto, os provenientes 19 (>1,26), 18a (>0,97), 18b (>4,47) e 18d (>2,63) não apresentam um valor determinado, podendo alcançar um índice de seletividade ao parasito.

A substância 8 não demonstrou citotoxicidade a nenhuma das duas espécies de *Leishmania*, ela foi originada a partir de uma reação oxidativa com pirogalol e contém a estrutura química da purpurogalina sem modificações. Por meio dessa purpurogalina sintética, gerou-se os outros derivados.

No processo de identificação das moléculas conduzido pela autora Silva na síntese dos derivantes da pesquisa. A substância 8, que é a purpurogalina, possui hidroxilas na sua estrutura química, conferindo-lhe uma característica mais polar. Contudo, ao substituir as hidroxilas por metoxilas e/ou grupos aminas, resultou em uma maior apolaridade em comparação à substância original. Assim, as mudanças estruturais por meio de outras configurações químicas, tanto em quantidade quanto em extensão, podem influenciar na interação das substâncias com as regiões apolares na membrana plasmática da *Leishmania*.

Estudos científicos comprovam que derivados com a presença de agrupamentos aminas ou metoxilas desempenham atividade leishmanicida. Rodrigues *et al.* (2018) sintetizaram compostos de 4-fenil-1,3-tiazol-2-aminas. Ao avaliar os resultados, constatou-se que a substância 4-C(CH₃)₃ induziu a redução das promastigotas de *L. amazonensis in vitro*,

apresentando um IC₅₀ de 20,78 µM. Os valores de IC₅₀ foram semelhantes na mesma espécie tratada com os derivados da purpurogalina: 19a (22,99 µM), 18d (22,43 µM) e 18e (24,06 µM).

Os derivantes da fenetilamina exibiram potencial contra promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em um tratamento de 48 horas. Nota-se que a N-fenetilbenzamida apresenta um IC₅₀ (9,6 µM) semelhante ao da substância 18 da purpurogalina (9,94 µM). No entanto, o composto N-(4-metilfenetil)benzamida demonstra um IC₅₀ de 27,9 µM comparável aos IC₅₀ dos derivantes 18a (25,30 µM), 19a (28,66 µM) e 18e (22,67 µM) da purpurogalina (Brasil *et al.*, 2017).

A síntese e a avaliação biológica de ácidos graxos de *Sommeria sabiceoides* resultaram na atividade anti-*Leishmania* contra promastigotas de *L. donovani*. O (±) -2-metoxi-6-heptadecínico contém metoxila em sua estrutura química e demonstrou um CE₅₀ de 74,0 µM, esse composto foi promissor na inibição da enzima topoisomerase IB da *Leishmania*. Destaca-se que o índice de citotoxicidade do novo ácido graxo foi aproximado ao derivante 19 da purpurogalina em *L. infantum chagasi*, que apresentou um IC₅₀ de 79,01 µM (Carballeira *et al.*, 2012).

Atualmente, poucas pesquisas descrevem o potencial antiparasitário da purpurogalina, como demonstra os autores Lamba e Roy (2023), que relata a ação da PPG na espécie *Plasmodium falciparum* ao inibir a DNA girase, que é uma topoisomerase do tipo II presente em seres unicelulares, a substância induziu uma redução significativa do crescimento do parasito >90% com um tratamento de 96 horas.

A DNA girase, é uma topoisomerase tipo II presente no genoma nuclear de bactérias e parasitos como o *P. falciparum*, desempenhando um papel essencial na replicação do DNA. No entanto, é importante destacar que a girase do apicoplasto, encontrada em protozoários, não está presente em seres humanos. Nesse contexto, a purpurogalina tem demonstrado resultados promissores na inibição do crescimento do protozoário, uma vez que interfere diretamente nessa enzima, oferecendo uma ação antiparasitária (Pakosz *et al.*, 2021).

O autor Ren *et al.* (2001), produziram derivados que contêm ésteres aromáticos e alifáticos com grupo hidroxila a partir de uma benzotropolona purpurogalina. Durante a investigação da atividade antiparasitária *in vitro*, o composto 3l demonstrou um IC₅₀ de 8,9

mM contra *P. falciparum*, enquanto o derivante 3f exibiu um IC₅₀ de 9,2 mM, valores comparáveis ao derivado 18 da purpurogalina sintética, que apresentou um IC₅₀ de 9,94 µM.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os avanços na busca por novos compostos com ação leishmanicida vêm aumentando ao longo dos anos, as inovações são essenciais para suprir as limitações presentes nas farmacoterapias dessa parasitose. Diante disso, o estudo da literatura por meio da prospecção de patentes que abordam inovações farmacológicas para o tratamento da leishmaniose visceral nas Américas durante os últimos seis anos, aqui apresentado, evidenciou potencialidade de novos protótipos sintéticos, como o composto illa (O-benzil hidroxamato) que demonstra ação anti-*Leishmania* superior a 90% nas formas promastigotas e amastigotas. Além disso, produto natural também é descrito nas patentes, como o óleo de amendoim ozonizado avaliado *in vivo*, que exibiu potencial na regressão dos sintomas ocasionados pela espécie *L. infantum chagasi*.

Com relação à avaliação da purpurogalina e derivados, realizado no presente estudo, foi observado baixa citotoxicidade em células hospedeiras J774.A1 (macrófagos). As substâncias 19a, 18b, 18d e 18e ocasionaram uma inibição significativa superior a 80% frente às espécies *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*, respectivamente. No que se refere a seletividade dos derivantes, a substância 18 se destacou por possuir um índice >10,06 a espécie *L. infantum chagasi* e um reduzido IC₅₀ de 9,94 µM. Levando em consideração todos os resultados apresentados, pode-se inferir que a purpurogalina pode ser considerado um produto promissor para se avançar nos ensaios visando o desenvolvimento de um fármaco leishmanicida.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios *in vitro* com a forma amastigota das espécies *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*;
- Determinar os níveis de óxido nítrico (NO);
- Investigar a atividade inibitória dos derivados ativos em topoisomerase II de *Leishmania* spp.

9. REFERÊNCIAS

ABADÍAS-GRANADO, I. et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601-618, 2021. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.adengl.2021.05.011>.

AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Revista Unimontes Científica**, v. 19, n. 1, p. 192-204, 2017.

AKASH N.; RAJASEKAR A. Effect of Chlorhexidine, Ozonated Olive Oil and Olive Oil Mouthwash on Oral Health Status of Patients with Gingivitis: A Randomised Controlled Trial. **Journal of Pharmaceutical Research International**. v. 33(62B), p. 401-410, 2021. <https://doi.org/10.9734/jpri%2F2021%2Fv33i62B35627>.

AKBARI, M. et al. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology Letters**. v. 233, p. 80-86, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.03.011>.

ALAM M. A. Methods for Hydroxamic Acid Synthesis. **Current Organic Chemistry**. v. 23, n. 9, p. 978-993, 2019. Doi: [10.2174/1385272823666190424142821](https://doi.org/10.2174/1385272823666190424142821).

ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, p. 281-289, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>.

ARCHAMBAULT, V.; NORMANDIN, K. Several inhibitors of the Plk1 Polo-Box Domain turn out to be non-specific protein alkylators. **Ciclo Celular**, v. 16, n. 12, pág. 1220-1224, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1325043>.

ATAYDE, V. D. et al. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**, v. 309 p. 7-18, 2016. DOI: [10.1016/j.cellimm.2016.07.013](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.07.013).

BASTOS M. M. et al. Antileishmanial Chemotherapy: A literature Review. **Revista Virtual de Química**. v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 2016. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160139>.

BATES, P. A. Revising *Leishmania*'s life cycle. **Nature microbiology**, v. 3, n. 5, p. 529-530, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>.

BI, K. et al. Current visceral leishmaniasis research: a research review to inspire future study. **Biomed Research International**. p. 2018:9872095, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9872095>.

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017. Disponível em: <https://s3.saeast1.amazonaws.com/static/sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v9n3a04.pdf>.

BRASIL, P. F. et al. Antiproliferative and ultrastructural effects of phenethylamine derivatives on promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. *Parasitology international*. v. 66, n. 2, p. 47 – 55, 2017. doi: [10.1016/j.parint.2016.11.010](https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.11.010).

BRAZIL, R. P. et al. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas - A mini review. **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 4, n. 2, p. 1, 2015. DOI:[10.4172/2161-0983.1000144](https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000144).

BREESE, K. et al. Pyrrolopyrimidine derivatives and their use in the treatment of leishmaniasis. Assignee: Medicines for Neglected Diseases Initiative. EP4092030A1. 2022.

CACHEIRO-ILAGUNO, C. et al. Role of Circulating Immune Complexes in the Pathogenesis of Canine Leishmaniasis: New Players in Vaccine Development. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 712, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040712>.

CAETANO, D. C. et al. Parâmetros clínicos, diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral. **Enciclopedia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 2987, 2019. DOI: [10.18677/EnciBio_2019A161](https://doi.org/10.18677/EnciBio_2019A161).

CAMARASA, R. M. J. et al. Triazole-phenyl-thiazole heterocycles as innovative trypanothione reductase inhibitors and their use as leishmanicides. Assignee: Univ Alcalá Henares. EP3502109A1. 2019.

CARBALLEIRA, N. M. et al. First total synthesis of the ($\pm$)-2-methoxy-6-heptadecynoic acid and related 2-methoxylated analogs as effective inhibitors of the *Leishmania* topoisomerase IB enzyme. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1867-1975, 2012. doi: [10.1351/PAC-CON-11-10-21](https://doi.org/10.1351/PAC-CON-11-10-21).

CARNIELLI, J. B. T. et al. Natural resistance of *Leishmania infantum* to miltefosine contributes to the low efficacy in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 789-794, 2019. DOI:[10.4269/ajtmh.18-0949](https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0949).

CAROCCI G. Formulation Comprising Ozonized Oil for Use in the Prevention and/or Treatment of Leishmaniasis. Assignee: Project and Communications LTD. WO2021205303. 2021.

CARVALHO, S. H. et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, pág. 380-391, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1111/tmi.13210>.

CASTRO S. V. Use of miltefosin in the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Jornal Internacional de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 38-42, 2020. Published in: <https://www.ojs.ufpi.br/index.php/jibi>. Accessed 12 September 2023.

CHARLTON, R. L. et al. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. **Parasitology**, v. 145, n. 2, p. 219-236, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1017/S00311820170000993>.

CHENG, Z., et al. Purpurogallin Reverses Neuronal Apoptosis and Enhances "M2" Polarization of Microglia Under Ischemia via Mediating the miR-124-3p/TRAF6/NF- κ B Axis. **Neurochemical Research**, v. 48, n. 2, p. 375-392, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03752-4>.

CLINICAL TRIALS GOV (2015) – Trial to Determine Efficacy of Fexinidazole in Visceral Leishmaniasis Patients in Sudan. NCT01980199.

CORPAS-LÓPEZ, V. et al. *O*-Alkyl Hydroxamates Display Potent and Selective Antileishmanial Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 63, n. 11, p. 5734-5751, 2020. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b02016.

CRAVENS, A. et al. Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. **Nature Communications.**, v. 10, n. 1, p. 2142, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09848-w>.

DAGA, M. K. et al. Leishmaniasis. **Indian J Crit Care Med.**, v. 25, n. 2, p. S166-S170, 2021. DOI: [10.5005/jp-journals-10071-23844](https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23844).

DARDONVILLE, C. et al. 4-hydroxyphenylphosphonium salts with antiparasitic properties. Assignee: Consejo Superior Investigacion, Univ Madrid Complutense. EP3995502A1. 2022.

DA SILVA, I. L.; CAMARA, C. A. Atividade Biológica da Purpurogalina e seus Derivados. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, 2020. Disponível em: <https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/RVq161220-a2.pdf>.

DE FARIA RIBEIRO, L. P. et al. Empirical treatment with amphotericin B deoxycholate for a suspected case of Visceral Leishmaniasis: A case report. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 13602-13609, 2021. DOI: [10.34117/bjdv7n2-125](https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-125).

DEGUCHI, T. et al. Sitafloxacin: antimicrobial activity against ciprofloxacin-selected laboratory mutants of *Mycoplasma genitalium* and inhibitory activity against its DNA gyrase and topoisomerase IV. **Journal of Infection Chemotherapy**. v. 21, n. 1, p. 74-5, 2015. DOI: [10.1016/j.jiac.2014.08.021](https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.021).

DE MORAIS, R. C. S. et al. Clinical-therapeutic follow-up of patients with American cutaneous leishmaniasis caused by different *Leishmania* spp. in Brazil, **Experimental Parasitology.**, v. 240, p. 108338, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108338>.

DE SOUSA, N. A. et al. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose visceral em Sobral-CE de 2011 a 2015. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, v. 17, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.36925/sanare.v17i1.1222>.

DE SOUSA, A. C. et al. Pharmaceutical care plan for patients with american and visceral tegumentary leishmaniosis with a focus on patient safety. **Brazilian journal of health review**, v. 2, n. 5, p. 4502-4518, 2019. DOI: <https://doi.org/1034119/bjhr2n5-054>.

DNDI. Inovação e acesso para populações negligenciadas. **Drugs for Neglected Diseases Initiative**, 2018. Disponível em: https://www.dndial.org/wp-content/uploads/2018/09/DNDi_inovacao-e-acesso-para-populacoes-negligenciadas.pdf

DUBIE, T.; MOHAMMED, Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. **Journal of Immunology**. v. 18, n. 2020, p. 2496713, 2020. DOI: [10.1155/2020/2496713](https://doi.org/10.1155/2020/2496713).

DONATO, L. E. et al. Visceral leishmaniasis lethality in Brazil: an exploratory analysis of associated demographic and socioeconomic factors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 53, p. e20200007. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0007-2020>.

DOS SANTOS, C. C. P. et al. Therapeutic Efficacy of a Mixed Formulation of Conventional and PEGylated Liposomes Containing Meglumine Antimoniate, Combined with Allopurinol, in Dogs Naturally Infected with *Leishmania Infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 64, n. 7, p. e00234-20, 2020. <https://doi.org/10.1128/aac.00234-20>.

EVANS, T. W.; DEHN, W. M. (1930). Organic oxidations by iodic acid. **Journal of The American Chemical Society**. v. 52, n. 9, p. 3647 – 3649. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja01372a031>.

EYGERIS Y. et al. Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery. **Accounts of Chemical research**. v. 55. N. 1, p. 2-12, 2022. doi: [10.1021/acs.accounts.1c00544](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00544).

FAMPA, P. et al. anti-*Leishmania* effects of Volatile Oils and Their Isolates. **Rev. Bras. de Farmacogn.**, v. 31, n. 5, p. 561-578, 2021. <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00146-5>.

FERREIRA, J. R. S. et al. Spatio-temporal analysis of the visceral leishmaniasis in the state of Alagoas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 18, n. 84, p. e253098, 2022. doi: [10.1590/1519-6984.253098](https://doi.org/10.1590/1519-6984.253098). PMID: 35195169.

FERSING, C. et al. 8-Aryl-6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-a]pyridines as potent antitrypanosomatid molecules bioactivated by type 1 nitroreductases. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 157, p. 115-126, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.064>

FITZPATRICK, C. et al. An Investment Case for Ending Neglected Tropical Diseases. **Major Infectious Diseases**. 3rd ed, 2017. DOI: [10.1596/978-1-4648-0524-0_ch17](https://doi.org/10.1596/978-1-4648-0524-0_ch17).

FOSCOLOS, A. S. et al. Probing adamantane arylhydroxamic acids against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Molbank**, 2022. <https://doi.org/10.3390/M1363>.

FRANCO, A. M. R. et al. Bioactive candidate substances for alternative treatment of cutaneous Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Development**. v. 7, p. 77011-77026, 2022. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n8-088>.

FREDERIC, J. G. F. et al. Pharmaceutical compositions composed of conventional liposomes and prolonged circulation liposomes for treatment of visceral leishmaniasis. Assignee: Federal University of Minas Gerais. JP2018043998A. 2018.

GARGÍA-ESPANÑA, M. E. et al. Use of simple acyclic polyamines for the treatment of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania*. Assignee: University Granada. WO2022/008784A1.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug Design, Development and Therapy**. v. 22, n. 12, p. 25 – 40, 2017. [doi: 10.2147/DDDT.S146521](https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521).

GIBSON, C. L. et al. Diversity oriented syntheses of fused pyrimidines designed as potential antifolates. **Organic Biomolecular Chemistry**. v. 7, n. 9, p. 1829-1842, 2009. [Doi 10.1039/b818339b](https://doi.org/10.1039/b818339b).

GÓMEZ, A. J. V. et al. Compounds for the treatment of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania*. Assignee: University of Granada. WO2018015595A2. 2018.

GORNITZKA, H. et al. Gold(I) complexes with fluorinated N-heterocyclic carbene ligands and their use as therapeutic agents. Assignee: Center Nat Rech Scient. WO2022101588A1. 2022.

GOSSLAU, A. et al. Therapeutic connection between black tea theaflavins and their benzotropolone core structure. **Current Pharmacology Reports**, v. 4, 447 – 452, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40495-018-0157-y>

GROLL, A. H. et al. Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety and Efficacy of Liposomal Amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**. v. 68, n. 4, p. S260-S274, 2019. DOI: [10.1093/cid/ciz076](https://doi.org/10.1093/cid/ciz076).

GUZEL, M. et al. Naphthalimide derivatives as antiparasitic agents for the treatment of leishmaniasis, as well as viral, bacterial and neoplastic diseases. Assignee: Istanbul Medipol Universities. WO2020139291. 2020.

HAN, S. et al. Conjugados lipofílicos de medicamentos: uma ferramenta para melhorar os perfis farmacocinéticos e terapêuticos de medicamentos. **Pharmaceutical Research**. v. 38, p. 1497–1518, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11095-021-03093-x>.

HEFNAWY, A. et al. Exploiting knowledge about *Leishmania* drug resistance to support the search for new medicines. **Trends in Parasitology**. v. 33, n. 3, p. 162-174, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.003>.

HENDRICKX, S. et al. Combined treatment of miltefosine and paromomycin delays the onset of experimental drug resistance in *Leishmania infantum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n. 5, p. e0005620, 2017. [doi: 10.1371/journal.pntd.0005620](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005620).

HOLANDA, V. N. et al. Desafios e perspectivas no tratamento da leishmaniose tegumentar: revisão de literatura. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 6, n. 17, p. 140-157, 2018. DOI: <https://doi.org/10.16891/619>

IKEOGU, N. M. et al. *Leishmania* Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1–21. 2020, DOI: <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8081201>.

ISLEK, Z. et al. Antileishmanial activity of BNIPdaoct-and BNIPdanon-loaded emulsions on *Leishmania infantum* parasites. **Frontiers in Nanotechnology**. v. 3 p. 101, 2022. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.773741>.

KELLY, J. M. et al. Inhibitors of human histone deacetylase with potent activity against the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. 2012;22(5):1886-90. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.01.072.

KESKIN, E. et al. Novel Synthetic Approaches for Bisnaphthalimidopropyl (BNIP) Derivatives as Potential Anti-Parasitic Agents for the Treatment of Leishmaniasis. **Molecules**. v. 24, n. 24, p. 4607, 2019. doi: 10.3390/molecules24244607.

KIM, K. et al. Inhibitory Effect of Purpurogallin on Osteoclast Differentiation in Vitro through the Downregulation of c-FOS and NFATc1. **International Journal of Molecular Sciences.**, v. 19, n. 2, p. 601, 2018. doi: 10.3390/ijms19020601.

KOPARDE, A. A. et al. Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacognosy-medicinal plants**. IntechOpen, 2019. Doi: 10.5772/intechopen.82860.

KRUSCHEWSKY, W. L. L. et al. Leishmaniose tegumentar Americana disseminada em paciente imunocompetente. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. S1, p. 101466, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.101466>.

KUMARI, S. et al. Amphotericin B: A drug of choice for visceral leishmaniasis. **Acta Tropical**. v. 235, p. 106661, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106661>.

LAMBA, S.; ROY, A. Demystifying the potential of inhibitors targeting DNA topoisomerases in unicellular protozoan parasites. **Drug Discovery Today**, p. 103574, 2023. doi: 10.1016/j.drudis.2023.103574.

LI, J. et al. Cell-free synthetic biology for *in vitro* biosynthesis of pharmaceutical natural products. **Synth. Syst. Biotechnol.**, v. 3, n. 2, p. 83-89, 2018. doi: 10.1016/j.synbio.2018.02.002.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVAEZ, F. The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. **Acta Tropica**. v. 207, p. 105456, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105456>.

MAIA, A. C. R. G. et al. *Leishmania infantum* amastigote nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1): Its inhibition as a new insight into mode of action of

pentamidine. **Experimental Parasitology**. v. 200, p. 1 – 6, 2019. DOI: [10.1016/j.exppara.2019.03.003](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.03.003).

MANN, S. et al. A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. **Current Tropical Medicine Reports**. v. 8, p. 121-132, 2021. doi: [10.1007/s40475-021-00232-7](https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7).

MANZANO, J. I. et al. Discovery and pharmacological studies of 4-hydroxyphenyl-derived phosphonium salts active in a mouse model of visceral leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 62, n. 23, p. 10664-10675, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00998>.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 261-272, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>.

MARCONDES, M.; VASCONCELLOS, S. A. Leishmaniose Visceral. **Leishamnirose-Serie Zoonoses**, 2019. Disponível em: https://crmvsp.gov.br/wp-content/uploads/2021/02/LEISHMANIOSE_SERIE_ZOONOSES.pdf.

MAZIRE, P. H. et al. Immunotherapy for visceral leishmaniasis: A trapeze of balancing counteractive forces. **International Immunopharmacology**. v. 110, n. 10, p. 108969, 2022. DOI: [10.1016/j.intimp.2022.108969](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108969).

MEDKOUR, H. et al. Potential of Artesunate in the treatment of visceral leishmaniasis in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: Efficacy evidence from a randomized field trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 14, n. 12, p. e0008947, 2020. doi: [10.1371/journal.pntd.0008947](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008947).

MEIRA, C. S.; GEDAMU, L. Protective or Detrimental? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 695, 2019. DOI: [10.3390/microorganisms7120695](https://doi.org/10.3390/microorganisms7120695).

MODA, T. F. et al. Effects of intra-abdominal and intra-retal ozonization on the renal evaluation of dogs affected by visceral leishmaniasis. **XXIV Brazilian Congress of**

Biomedical Engineering – CBEB, 2014. Available in: https://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014_submission_561.pdf. access at: November 26, 2023.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983, DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MUKHERJEE, B. et al. Probing the molecular mechanism of aggressive infection by antimony resistant *Leishmania donovani*. **Cytokine**, v. 145, p. 155245, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155245>.

OLIVEIRA, R. G. Sentidos das Doenças Negligenciadas na agenda da Saúde Global: o lugar de populações e territórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 2291-2302, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232018237.09042018>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases, 2015, Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/investing-overcome-global-impact-neglected-tropical-diseases-third-who-report-neglected>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Leishmaniasis. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas. Washington, D.C., 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS. Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais, 2021. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. DOI: <https://doi.org/10.37774/9789275721902>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE – OPAS. Leishmaniasis epidemiological bulletin of the Americas, 2021. Published in: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Accessed 30 August 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE – OPAS. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas. Washington, D.C., 2022. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56831>.

ORTIZ, R. C.; ANVERSA, L. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo, Brazil, 2004-2012: a descriptive study. **Epidemiology and Health Services**. 2015;24(1):97-104. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742015000100011>.

OTT, I. Chapter Four – Metal *N*-heterocyclic carbene complexes in medicinal chemistry. Adv. **Inorganic Chemistry**, 2020;75:121-148. <https://doi.org/10.1016/bs.adioch.2019.10.008>.

PAKOSZ, Z. et al. Inhibitory compounds targeting *Plasmodium falciparum* gyrase B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 65, n. 10, p. 10.1128/aac.00267-21, 2021.

PALIĆ, S. et al. Systematic review of host – Mediated activity of miltefosine in leishmaniasis through immunomodulation. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 63, n. 7, pág. e02507-18, 2019. DOI: [10.1128/AAC.02507-18](https://doi.org/10.1128/AAC.02507-18).

PALIĆ, S. et al. An update on the clinical pharmacology of miltefosine in the treatment of leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 1, pág. 106459, 2022. DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2021.106459](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106459).

PATRICIO, B. F. C. et al. The challenge of new administration routes for Amphotericin B. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 62-69, 2019. DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.1.1-7>.

PERKIN, A. G.; STEVEN, A.B. XX. Purpurogallin. I. **Journal of the Chemical Society, Transactions**. v. 83, p.192, 1903. DOI: <https://doi.org/10.1039/CT9038300192>.

PIMENTA, P. F. P. et al. Biology of the 72 *Leishmania* – Sand Fly Interaction. **Brazilian Sand Flies**, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_6.

POLLMEIER, M.; BLAIR, J. J. Method to treat and cure leishmaniasis using fexinindazole. Assignee: Boehringer Ingelheim Animal Health Usa Inc. EP2950795B1. 2018.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases.**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017. DOI: [10.1371/journal.pntd.0006052](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052). PMID: 29240765.

POPOV, A. M. et al. The antioxidant and membrane activities of the Benzotropalone pigment purpurogallin. **Biophysics**, v. 64, p. 543-550, 2019. <https://doi.org/10.1134/S0006350919040171>.

Pradhan, S. et al. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**. v. 47, n. 3, p. 516–521, 2022. <https://doi.org/10.1111/ced.14919>.

PRESTES-CARNEIRO, L. E. et al. Unusual manifestations of visceral leishmaniasis in children: a case series and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, Brazil. **BMC Infectious Diseases**. v. 19, n. 1, p. 70, 2019. DOI: [10.1186/s12879-018-3652-1](https://doi.org/10.1186/s12879-018-3652-1).

RAJABI, O. et al. The activity of ozonated olive oil against *Leishmania major* promastigotes. **Iranian Journal Basic Medical Sciences**. v. 18, n. 9, p. 915-9, 2015. PMID: [26523224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26523224/).

RAMBABU, M.; JAYANTHI, S. Virtual screening of National Cancer Institute database for claudin-4 inhibitors: Synthesis, biological evaluation, and molecular dynamics studies. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 5, p. 8588-8600, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.28147>.

REN, H. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of a series of simple and novel potential antimalarial compounds. **Bioorganic and medicinal chemistry letters**, v. 11, n. 14, p. 1851-1854, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00308-0](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00308-0).

RIVAS, F. et al. New multifunctional Ru (II) organometallic compounds show activity against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania infantum*. **Journal Inorganic Biochemistry**. v. 237, p. 112016, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112016>.

ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 104, p. 8965-8977, 2020. DOI: [10.1007/s00253-020-10856-w](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w).

RODRIGUES, A. et al. *Leishmania infantum* exerts immunomodulation in canine Kupffer cells reverted by meglumine antimoniate. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 55, p. 42–52, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2017.09.004>.

RODRIGUES, C. A. et al. 4-Phenyl-1,3-thiazole-2-amines as scaffolds for new antileishmanial agents. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. v. 24, n. 26, 2018. doi: [10.1186/s40409-018-0163-x](https://doi.org/10.1186/s40409-018-0163-x).

RODRÍGUEZ-VEGA, A. et al. Quantitative analysis of proteins secreted by *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* strains associated to distinct clinical manifestations of American Tegumentary Leishmaniasis. **Journal of Proteomics**. v. 10, n. 232, p. 104077, 2021. DOI: [10.1016/j.jprot.2020.104077](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104077).

ROJAS MADRIZ, B. Leishmaniasis cutánea: una revisión centrada en Costa Rica. **Medicina Legal de Costa Rica**, v. 36, n. 2, p. 82-94, 2019. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1040448>.

SANDOVAL PACHECO, C. M. et al. Macrophage Polarization in the Skin Lesion Caused by Neotropical Species of *Leishmania* sp. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, p. 5596876, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/5596876>.

SANTIAGO, A. S. et al. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543-e29510716543, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16543>.

SANZ, C. R. et al. Modulation of Host Immune Response during *Leishmania infantum* Natural Infection: A WholeTranscriptome Analysis of the Popliteal Lymph Nodes in Dogs. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.794627>.

SCARIOT, D. B. et al. Leishmaniasis and Chagas disease: Is there hope in nanotechnology to fight neglected tropical diseases?. **Frontiers Cellular and Infection Microbiology**. v. 16, n. 12, p. 1000972, 2022. DOI: [10.3389/fcimb.2022.1000972](https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1000972).

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE – SESAU. Sesaú orienta sobre prevenção, diagnóstico e tratamento da leishmaniose. 2023. Disponível em: <https://www.saude.al.gov.br/>

[sesau-orienta-sobre-prevencao-diagnostico-e-tratamento-da-leishmaniose/](#). Acesso em: 26 de dezembro de 2023.

SERAFIM, T. D. et al. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in Parasitology**. v. 37, n. 11, p. 976-987, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.07.003>.

SOUTO, J. A. et al. A New Family of Jumonji C Domain-Containing KDM Inhibitors Inspired by Natural Product Purpurogallin. **Frontiers in Chemistry**. v. 8, p. 312, 2020. DOI: [10.3389/fchem.2020.00312](https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00312).

SUGIYAMA, H. et al. Purpurogallin as an antioxidant protector of human erythrocytes against lysis by peroxy radicals. **Life Sciences**, v. 53, n. 4, p. PL39-PL43, 1993. DOI: [10.1016/0024-3205\(93\)90759-v](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90759-v).

SUNDAR, S.; SINGH B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. v. 22, n. 6, p. 467-486, 2018. doi: [10.1080/14728222.2018.1472241](https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1472241).

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>.

TASLIMI, Y. et al. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**. v. 145, n. 4, p. 497-507, 2018. DOI: [10.1017/S003118201600216X](https://doi.org/10.1017/S003118201600216X).

TAVARES, J. et al. Anti-leishmanial activity of the bisnaphthalimidopropyl derivatives. **Parasitology International**. v. 61, p. 360-363, 2022. doi: [10.1016/j.parint.2011.11.005](https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.11.005).

TEIXEIRA, E. M. et al. *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of fexinidazole Against new worls *Leishmania* species. **Journal of Antimicrobial Chemotheapy**. v. 74, p. 2318–2325, 2019. Doi: [10.1093/jac/dkz172](https://doi.org/10.1093/jac/dkz172).

TEUFEL, L. U. et al. Immunotherapeutic Potential of Interleukin-32 and Trained Immunity for Leishmaniasis Treatment. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 130–141. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.PT.2020.09.014>.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 19–25, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2020.02.004>.

URBANOVÁ, K. et al. Effective Tetradentate Compound Complexes against *Leishmania* spp. that Act on Critical Enzymatic Pathways of These Parasites. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 134, 2018. doi: [10.3390/molecules24010134](https://doi.org/10.3390/molecules24010134).

VARLOUD, M. et al. Veterinary Compositions for Preventing and/or Treating Leishmaniosis. Assignee: Ceva Sante Animale. WO2022/008708A1.

VASCONCELOS, C. R. S.; REZENDE, A. M. Systematic *in silico* Evaluation of *Leishmania* spp. Proteomes for Drug Discovery. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 607139, 2021. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.607139>.

WILHELM, T. J. Visceral Leishmaniasis. **Der Chirurg**, v. 90, n. 10, p. 833-837, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00104-019-0994-1>.

WIPO (2020) – International Patent Classification Guide (IPC). available in: <http://ipc.inpi.gov.br/classifications/ipc/ipcpub/media/help/pt/guide.pdf>. access in: November 27, 2023.

WYREPKOWSKI, C. D. C. et al. Pharmacological aspects of drug therapy used specifically for leishmaniasis: a literature review. **REA**, v. 12, n. 8, p. e3352-e3352, 2020. <https://doi.org/10.25248/reas.e3352.2020>.

XIE, X. et al. Purpurogallin is a novel mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor that suppresses esophageal squamous cell carcinoma growth *in vitro* and *in vivo*. **Molecular Carcinogenesis**, v. 58, n. 7, p. 1248-1259, 2019. DOI: [10.1002/mc.23007](https://doi.org/10.1002/mc.23007).

ZHANG, C. et al. Synthesis, characterization, and antileishmanial activity of neutral N-heterocyclic carbenes gold(I) complexes. **European Journal Medicinal Chemistry**, 2018;143:1635-1643. doi: [10.1016/j.ejmech.2017.10.060](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.060).

ZHEN, A. X. et al. Purpurogallin protects keratinocytes from damage and apoptosis induced by ultraviolet B radiation and particulate matter 2.5. **Biomolecules and Therapeutics**. v. 27, n. 4, p. 395, 2019. DOI: [10.4062/biomolther.2018.151](https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.151).

10. APÊNDICES

10.1 . APÊNDICE A

PHARMACEUTICAL INNOVATIONS FOR VISCERAL LEISHMANIASIS TREATMENT IN THE AMERICAS - A PATENT REVIEW (2017-2023)

Camilla Amanda de Oliveira Gomes ^{a,e}, Shakira Cavalcante de Albuquerque Ferreira ^{d,e}, Márcio Thomaz dos Santos Varjão ^{b,e}, Andressa Letícia Lopes da Silva ^{a,e}, Hilda Caroline do Nascimento Santos ^{a,e}, Éder da Silva Rocha Santos ^{c,e}, Fábio Souza Moura ^{a,e}, Alysson Wagner Fernandes Duarte ^f, Magna Suzana Alexandre Moreira ^{b,e}, Aline Cavalcanti de Queiroz ^{a,c,e,f}.

Affiliations:

^aPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas-UFAL/Campus AC Simões, Maceió, AL, Brazil.

^bPostgraduate Program in Health Sciences, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas-UFAL/Campus AC Simões, Maceió, AL, Brazil.

^cPostgraduate Program in Medical Sciences, Institute of Medical Sciences, Federal University of Alagoas-UFAL/Campus A. C. Simões, Maceió, AL, Brazil.

^dPostgraduate Program in Translational Neuroscience, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^eLaboratory of Pharmacology and Immunity, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas - UFAL/Campus AC Simões, Maceió, AL, Brazil.

^fLaboratory of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Center for Medical and Nursing Sciences, Federal University of Alagoas - UFAL/Campus Arapiraca, Arapiraca, AL, Brazil.

* Corresponding author: Aline Cavalcanti de Queiroz

Email: aline.queiroz@arapiraca.ufal.br

Address: Laboratory of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Center for Medical and Nursing Sciences, Federal University of Alagoas - Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa – Bom Sucesso, Arapiraca – AL, 57309-005, Brazil.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a parasitic disease caused by the *Leishmania* genus and represents the most severe form of the disease, primarily affecting individuals in socially vulnerable conditions, those with comorbidities, and immunocompromised individuals, leading to a high mortality rate. In the Americas, Brazil has the highest number of infections caused by the species *Leishmania infantum chagasi*; however, current pharmacotherapy has significant limitations. Considering this issue, the study aims to prospect patents reporting major pharmacological innovations against the *Leishmania infantum chagasi* species in the last six years (2017–2023). A patent investigation was conducted across various platforms, including the Brazilian Patent and Trademark Office (INPI), the United States Patent and Trademark Office (USPTO), the World Intellectual Property Organization (WIPO), The Lens and the European Patent Office (EPO). Eleven documents were selected, with Spain being the main country that published patents on new prototypes against *Leishmania*. It is observed that there are numerous pharmacotherapeutic innovations in the search for drugs to treat visceral leishmaniasis; however, research progress is limited. Therefore, investment in research to advance pharmacological trials is crucial to develop a less toxic and more selective prototype for the parasite.

KEYWORDS: Leishmaniasis, Patents, Innovations, Treatment.

INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis is a neglected disease present in approximately 102 countries, including Brazil, where it accounts for about 90% of infections, with around three thousand new cases per year (Ortiz; Anversa, 2015). The parasite of the genus *Leishmania* is responsible for this pathology and its species cause various clinical manifestations in infected individuals (Akbari *et al.*, 2021).

Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease, characterized by symptoms such as hepatosplenomegaly, irregular fever, weight loss, and other manifestations. In the Americas, VL is considered a zoonosis that affects mammals. In Brazil, the species

Leishmania infantum chagasi is the causative agent of the disease, with the sandfly of the genus *Lutzomyia* being its vector (Wilhelm, 2019).

In the Americas, this form of the disease is endemic in 13 countries, with higher incidence reported in Brazil, Argentina, Bolivia, Colombia, Paraguay, Venezuela and Uruguay. In 2020, Brazil continued to lead the number of cases in Latin America, accounting for approximately 97% of cases with a mortality rate of about 90% in untreated patients (PAHO, 2023).

The primary therapeutic option for this parasitosis is pentavalent antimonials, such as meglumine antimoniate, although its mechanism of action is not yet fully understood. It is known that this drug can inhibit glycolytic and oxidative pathways, converting pentavalent antimony into trivalent antimony, making it a prodrug (Bastos *et al.*, 2016).

Other alternatives include deoxycholate amphotericin B and liposomal amphotericin B, which have antifungal and leishmanicidal potential by binding to ergosterol on the parasite's surface, resulting in depolarization of the cell membrane. It is considered the best treatment choice when there is a high level of resistance to antimonials, especially in immunocompromised patients (Kumari *et al.*, 2022).

Pentamidine is another possible treatment for cases of leishmaniasis. Some hypotheses about its mechanism of action suggest that this drug may act on the parasite's genome (Wyrepkowski *et al.*, 2020). Miltefosine is an orally administered medication that acts directly on the endoparasite, preventing the synthesis of important compounds for the protozoan's plasma membrane (Castro, 2020). The antibiotic paromomycin exhibits leishmanicidal activity; its mechanism of action involves the inhibition of protein synthesis and disruption of mitochondrial activities essential for *Leishmania* survival (Santiago *et al.*, 2021).

However, current medications have numerous limitations, including parasite resistance, various side effects, long-term treatment, and high cost, leading patients to abandon therapeutic interventions (Farias, 2020). The search for new pharmaceutical alternatives and the improvement of existing medications are essential to combat this disease. Pharmacology, along with biotechnology, is increasing efforts to establish medications with

lower cytotoxicity to provide a better quality of life for patients undergoing treatment (Hefnawy *et al.*, 2017).

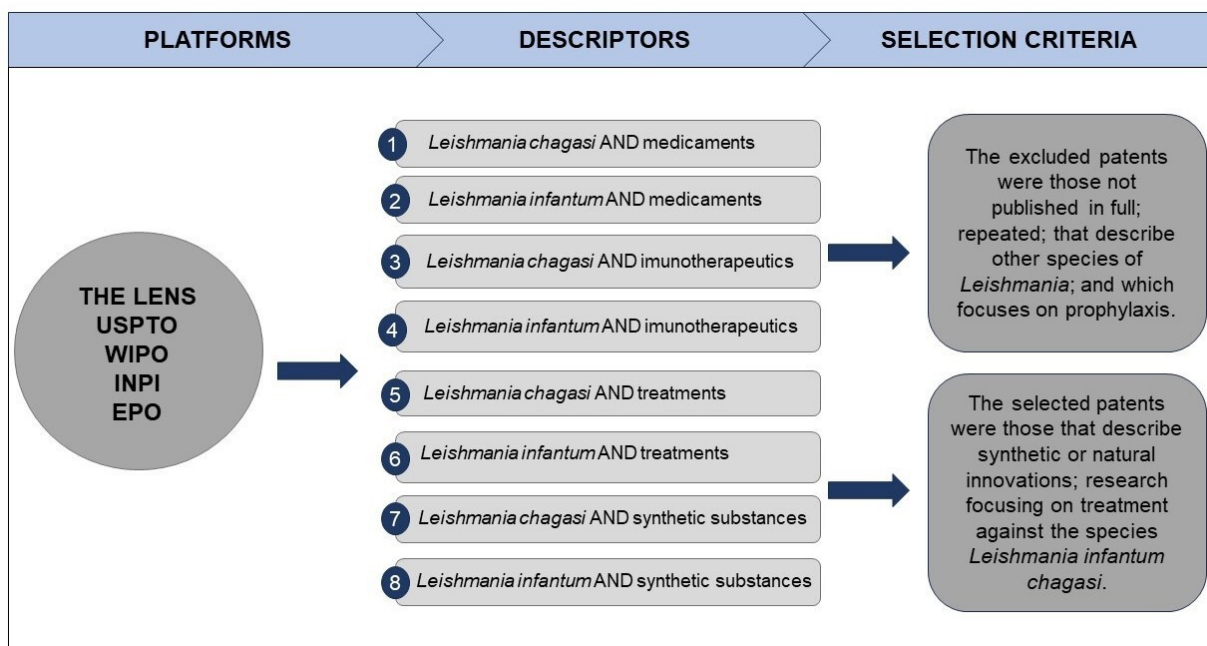
This study aims to conduct technological prospecting through a patent review of pharmacological innovations for the treatment of visceral leishmaniasis in the Americas over the last six years (2017–2023).

MATERIALS AND METHODS

Patent research was conducted using the selected descriptors (Figure 1) on the platforms THE LENS, World Intellectual Property Organization (WIPO), European Patent Office (EPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO) and Brazilian Patent and Trademark Office (INPI).

The filters on the platforms were "Full Text," "Publication Date" and "Any Field." In INPI, which is a Brazilian research base, all terms were modified to Portuguese and the search was conducted through the "advanced search" feature. The parameters for patent investigation included year, inventors, country of origin, IPC, clinical trials and bioactives.

Figure 1 - Patent platforms and combinations of terms used.



RESULTS AND DISCUSSIONS

Patent Databases

By using the respective combinations of descriptors on the defined platforms, numerous patents were obtained, as demonstrated in Table I. A total of 451.980 records were found after applying the specified search filters. Some selected terms were excluded due to the impossibility of analysis and were identified with the truncation character "*", resulting in a total of 5.110 remaining patents for evaluation. The databases The Lens and EPO had the highest number of patents, followed by INPI, USPTO and WIPO in descending order.

Table I - Quantitative data of patents per platforms

Search terms	INPI	THE LENS	WIPO	EPO	USPTO	TOTAL
<i>Leishmania chagasi</i> AND medicaments	32	184	172	54	48	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND medicament	210	205	0	80	48	0
<i>Leishmania infantum</i> AND medicaments*	32	453	510	107	141	0
<i>Leishmania infantum</i> AND medicament*	761	492	0	201	137	00
Visceral AND medicaments*	424	8.518	0	1.495	1.810	0
Visceral AND medicament*	766	8.522	0	4.448	543	00
<i>Leishmania chagasi</i> AND immunotherapeutics	86	50	38	7	14	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND immunotherapy	253	162	0	46	48	0
<i>Leishmania infantum</i> AND immunotherapeutics	86	128	90	15	31	0
<i>Leishmania infantum</i> AND immunotherapy	253	310	0	87	83	0

Visceral AND immunotherapeutics*	22	1.334	0	159	340	0
Visceral AND immunotherapy*	259	3.521	7	1.324	934	00
<i>Leishmania chagasi</i> AND treatments*	219	412	358	89	103	00
<i>Leishmania chagasi</i> AND treatment*	12.665	406	10	142	103	0
<i>Leishmania infantum</i> AND treatments*	32	971	908	283	283	0
<i>Leishmania infantum</i> AND treatment*	12.665	1.062	16	398	297	00
Visceral AND treatments*	225	22.798	6	6.141	5.461	00
Visceral AND treatment*	12.667	22.780	1	19.249	5.431	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND synthetic substances	74	278	227	92	64	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND synthetic substance*	961	300	0	71	59	0
<i>Leishmania infantum</i> AND synthetic substances*	74	697	656	281	210	0
<i>Leishmania infantum</i> AND synthetic substance*	961	758	0	230	179	0
Visceral AND synthetic substances*	511	11.929	0	3.959	2.680	00
Visceral AND synthetic substance*	968	11.929	0	3.872	2.116	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND drugs	93	418	39	116	94	0000
<i>Leishmania chagasi</i> AND drug	124	418	39	124	90	00
<i>Leishmania infantum</i> AND drugs*	93	886	6	278	224	0
<i>Leishmania infantum</i> AND drug*	124	886	17	332	212	0
Visceral AND drugs*	99	19.561	98	11.396	4.636	00
Visceral	130	19.562	175	12.697	4.350	00

AND drug*						
<i>Leishmania chagasi</i> AND compounds*	5.687	423	2	117	102	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND compound*	6.026	423	0	117	91	00
<i>Leishmania infantum</i> AND compounds*	5.687	1.025	5	353	285	0
<i>Leishmania infantum</i> AND compound*	6.026	1.025	0	334	258	0
Visceral AND compounds*	5.693	18.783	24	7.032	4.353	00
Visceral AND compound*	6.029	18.783	5	8.809	3.921	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND substances	393	337	2	101	85	0
<i>Leishmania chagasi</i> AND substance*	799	337	0	92	68	0
<i>Leishmania infantum</i> AND substances*	393	829	0	265	236	0
<i>Leishmania infantum</i> AND substance*	799	829	0	264	192	0
Visceral AND substances*	399	16.141	5	8.705	3.766	00
Visceral AND substance*	805	16.141	3	8.038	2.824	00
Subtotal	0	0	0	0	0	00
Total	451.980					

*Terms excluded due to impossibility of analysis.

Document Selection

The patents were analyzed following inclusion criteria consisting of experimental research on synthetic or natural prototypes, pharmacological assays *in vitro* or *in vivo*, published within the last six years, in any language and involving the evaluation of compounds against *Leishmania infantum chagasi*. Exclusion criteria included publications not found in full text, duplicates, studies involving other species of *Leishmania*, as well as studies focusing on prophylaxis rather than the treatment of VL.

After the analysis, 11 patents meeting the research criteria were found (Table II). The platform The Lens yielded the highest result, with 46% (5 patents), followed by WIPO with 27% (3 patents) and EPO with 27% (3 patents). However, no patents were selected from the USPTO and INPI platforms (Figure 2).

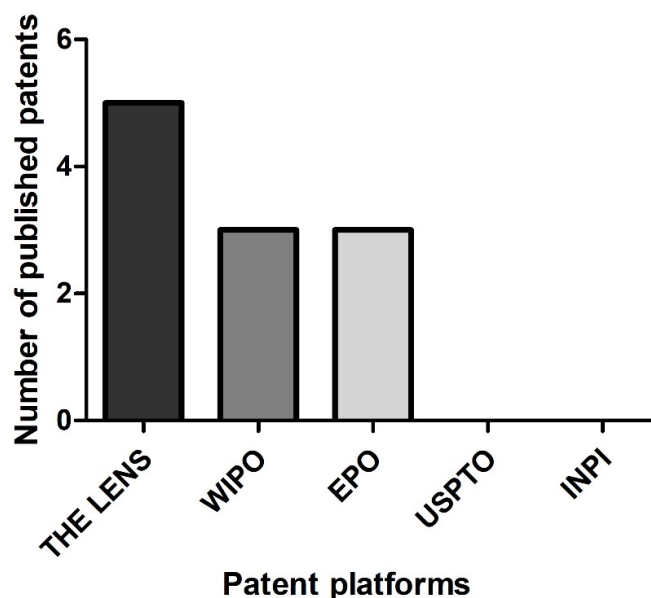
Table II - Data of selected patents according to the research criteria

Codes	Titles	IPC	Authors	Origin	Year of publication	Clinical trials	Bioactives
EP2950795B1	Method of treating and curing leishmaniasis with fexinidazole	A61K31/4164; A61P33/02;	Pollmeier and Blair	United States of America	2018	<i>in vivo</i>	fexinidazole
WO2018015595A2	Compounds for the treatment of diseases caused by parasites of the genus <i>Leishmania</i>	Without classification	Gómez <i>et al.</i>	Spain	2018	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Illa (O-benzyl hydroxamate)

JP201804399 8A	Pharmaceutical compositions comprising conventional liposomes and prolonged circulation liposomes for treating visceral leishmaniasis	A61K31/12; A61K31/137; A61K31/138; A61K31/155; A61K31/192; A61K31/198; A61K31/352; A61K31/4196; A61K31/422; A61K31/454; A61K31/47; A61K31/4706; A61K31/474; A61K31/496; A61K31/519; A61K31/56; A61K31/685; A61K31/7036; A61K31/704; A61K31/7052; A61K31/739; A61K33/24; A61K38/20; A61K45/00; A61K47/24; A61K47/28; A61K9/127; A61P33/02;	Frederico <i>et al.</i>	Brazil	2018	<i>in vivo</i>	Meglumine antimoniate encapsulated in conventional liposomes and prolonged circulation liposomes
EP3502109A1	Triazole-phenyl-thiazole heterocycles as innovative trypanothione reductase inhibitors and their use as leishmanicide	CO7D417/04; A61K31/426; A61P33/02; CO7D417/14;	Camarasa <i>et al.</i>	Spain	2019	<i>in vitro</i>	5-6-5 triazole-phenyl-thiazole heterocycles
WO20201392 91	Naphthalimide derivatives as antiparasitic agents in the treatment of leishmaniasis, as well as viral, bacterial and neoplastic diseases	C07D221/14; C07D401/12; C07D417/12; C07D413/12; A61K31/437; A61P33/00;	Guzel <i>et al.</i>	Turkey	2020	<i>in vitro</i>	Bisnaphthalimidopropyl

WO2021205303	Formulation comprising ozonized oil for use in the prevention and/or treatment of leishmaniasis	A61K33/00; A61K36/28; A61K9/00; A61P33/02;	Carocci	England	2021	<i>in vivo</i>	Ozonized peanut oil
EP4092030A1	Pyrrolopyrimidine derivatives and their use in the treatment of leishmaniasis	C07D487/04; A61P33/14; A61K31/519;	Breese <i>et al.</i>	Europe	2022	<i>in vivo</i>	Pyrrolopyrimidine derivatives
WO2022101588A1	Gold (I) complexes with fluorinated N-heterocyclic carbene ligands and their use as therapeutic agents	A61P35/00; C07F1/00; C07H23/00;	Gornitzka <i>et al.</i>	France	2022	<i>in vitro</i>	Gold complexes with N-heterocyclic carbene ligands
WO2022/008708A1	Veterinary compositions for prevention and/or treatment of leishmaniasis	A61P33/02 A61K31/357	Varloud <i>et al.</i>	France	2022	<i>in vivo</i>	Artesunate
EP3995502A1	4-hydroxyphenylphosphonium salts with antiparasitic properties	C07F9/54; A61K31/66;	Dardonville <i>et al.</i>	Spain	2022	<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	4-hydroxyphenyl phosphonium
WO2022/008784A1	Use of simple acyclic polyamines in the treatment of diseases caused by parasites of the genus <i>Leishmania</i>	A61P33/02 A61K33/02 C07D221/00 C07D215/02	García-Espanã <i>et al.</i>	Spain	2022	<i>in vitro</i>	Simple acyclic polyamines

Figure 2 – Number of patents selected by platforms.

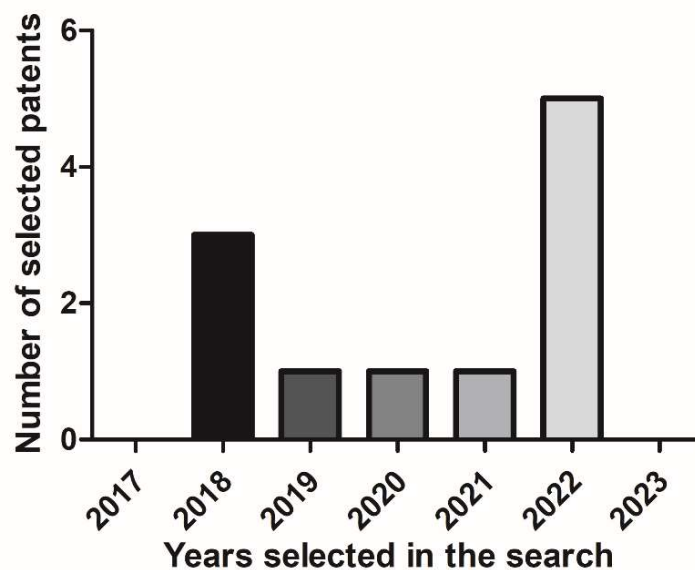


Temporal Distribution

The distribution of patents regarding pharmacological innovations for the treatment of visceral leishmaniasis in the Americas from 2017 to 2023 varied considerably. Among the selected research, there were no patents published on this topic in 2017. However, in 2018, there was a significant number of publications (3 patents) on these pharmacological innovations for the treatment of VL compared to other years of the investigation.

In the following years, there was a decrease in publications in 2019, 2020 and 2021 with only one patent each year. In 2022, the number of publications related to this topic increased, with the highest number of patents published (5 patents). So far, no publications meeting the selected criteria have been found for the year 2023 (Figure 3).

Figure 3 - Temporal distribution of selected patents.

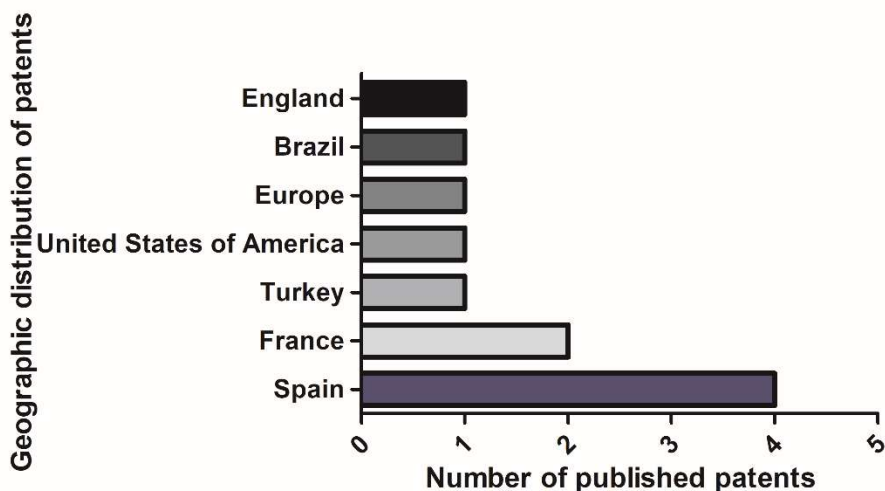


Geographic Distribution

Upon analyzing the geographic distribution of the selected patents (Figure 4), it was observed that Spain had the highest number of patents related to the research of new drugs for this disease (4 patents), followed by France with 2 patents. Next in line were the United States, Brazil, Turkey, England, and the European continent, each with only one patent.

Brazil is one of the main countries with cases of visceral leishmaniasis. However, the lack of investment in science hampers the advancement of research in Brazil towards more advanced clinical phases, hindering the development of an effective drug with high therapeutic potential for this neglected disease (Franco *et al.*, 2021).

Figure 4 - Geographic distribution of patents designated in the research.



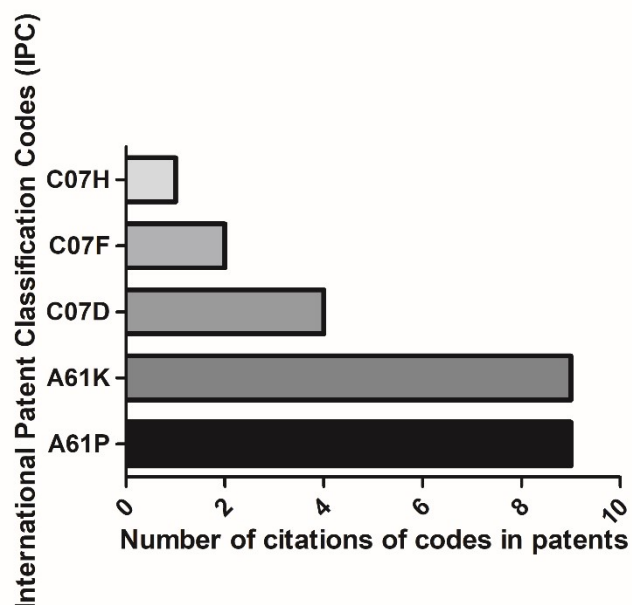
Evaluation of International Patent Classification Codes (IPC)

Patents are categorized with different codes from the International Patent Classification (Figure 5). The code A61P was mentioned in nine out of the eleven selected patents, representing documents that report on the specific therapeutic activity of chemical compounds or medicinal preparations. However, the code A61K was the most cited in nine designated patents, representing research focused on the field of human necessities with preparations for medical, dental, or personal hygiene purposes. The code C07D was cited in four patents, categorizing them in the chemistry/metallurgy field concerning heterocyclic compounds.

Other less cited codes included C07F (2 patents), involving research on acyclic, carbocyclic, or heterocyclic compounds containing elements other than carbon, hydrogen, halogens, nitrogen, sulfur, selenium, or tellurium. However, the code C07H (1 patent) encompasses work with sugars; their derivatives; nucleosides; nucleotides; and nucleic acids.

Almost all patent documents feature an International Patent Classification (IPC) code, which serves to facilitate the uniform identification of intellectual property documents. Patents are organized into sections, subsections, classes, subclasses, and groups, following a hierarchical principle based on the origin of innovations and their objectives. The IPC enables researchers to search for novelty, validity, patentability, infringement, and information, becoming a tool of significant relevance (WIPO, 2020).

Figure 5 - International Patent Classification of selected documents.



Pharmacological Innovations Against Visceral Leishmaniasis in the Americas

Visceral leishmaniasis is the most severe form of the disease with approximately 3.000 new cases per year. When left untreated, this parasitic infection leads to the death of 90% of infected individuals. Among Latin American countries, Brazil stands as the primary country with the highest number of reported cases. Just in 2020, 1.933 cases were registered with a widespread distribution across Brazilian states (PAHO, 2021).

The current pharmacotherapy for *Leishmania infantum chagasi* presents numerous limitations, highlighting the need for new prototypes with greater efficiency, lower cytotoxicity and minimal side effects for infected individuals. Although neglected tropical diseases are not the primary investment choice for major pharmaceutical industries due to limited financial return, the importance of seeking new treatments for this disease, present in various countries and with high mortality rates worldwide, cannot be underestimated (Vasconcelos; Rezende, 2021).

The Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) exposes drug prototypes for visceral leishmaniasis. In phase I clinical trials, acoziborol, nitroimidazole, GSK245 and DNDI-6899 are mentioned. However, in phase II clinical trials, only Novartis's LXE408 is

being tested. In phase III, tests are described with combinations of existing treatments used for leishmaniasis, such as liposomal amphotericin B + miltefosine for visceral leishmaniasis cases in Asia and miltefosine + paromomycin or liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis cases in Sudan. Similarly, the use of miltefosine + paromomycin in cases of visceral leishmaniasis in Africa has shown to be a promising treatment alternative (DNDi, 2023).

In Latin America, a collaborative study sought a better alternative for visceral leishmaniasis treatment. This research was conducted in Brazil with the support of DNDi, the Ministry of Health, the University of Brasília and the Oswaldo Cruz Foundation, demonstrating that liposomal amphotericin B is the treatment of choice, being shorter and safer. However, this medication triggers significant side effects, highlighting the need to search for new pharmacological alternatives (DNDi, 2022).

The referenced research EP2950795B1 describes the investigation of fexinidazole for the treatment of *L. infantum chagasi* *in vivo*. In the experiment, naturally infected dogs in an endemic environment were used, resulting in promising findings: There was complete elimination of the parasite and absence of symptoms (Pollmeier; Blair, 2018). Fexinidazole belongs to the group of nitroimidazoles and acts as a prodrug activated by the parasite's nitroreductase enzymes, exerting an antiprotozoal action (Fersing *et al.*, 2018).

Recent research confirms the leishmanicidal potential of fexinidazole *in vivo* in BALB/c mice infected with promastigotes. This drug, originally marketed as a trypanocidal agent, also demonstrated the ability to reduce the parasitic load of *L. infantum chagasi* in the liver and spleen (Teixeira *et al.*, 2019). Registry NCT01980199 describes fexinidazole as an oral treatment in phase II clinical trials in patients with visceral leishmaniasis in Sudan, providing absence of the parasite on day 28 of treatment or day 56, eliminating the need for additional medication until day 210. However, the studies were interrupted due to the lack of observed efficacy throughout the research (Clinical Trials, 2015).

The research mentioned in patent EP4092030A1 discusses the synthesis of pyridopyrimidine derivatives and their leishmanicidal potential in the *in vivo* model of hamster *L. infantum chagasi*. After the administration of three derivatives, C1 (methoxybenzonitrile), C3 (amine) and C4 (carbonitrile), in addition to the control (miltefosine), a reduction in the number of parasites in the liver, spleen, and bone marrow

was observed (Breese *et al.*, 2022). Synthetic pyrimidines represent chemical structures capable of generating derivatives like pyrroliprimidine, which exhibit anti-parasitic potential against *Trypanosoma brucei*, making them a promising alternative for drug innovations derived from this compound, which can play an anti-Leishmania activity (Gibson *et al.*, 2009).

New derivatives of triazolopyridopyrimidines were evaluated for their *in vivo* leishmanicidal potential in murine models with acute infection by *L. infantum chagasi*. Derivative 1a (3-phenyl-6,8-di(2-pyridyl)-[1,2,3]triazolo[5',1':6,1]pyrido[2,3-d]pyrimidine) showed remarkable anti-*Leishmania* activity against amastigote forms present in the spleen of these animals by its ability to affect the parasite's DNA integrity and induce the generation of reactive oxygen species (ROS) (Adam *et al.*, 2015).

The file EP3502109A1 explores the capacity of 5-6-5 triazole-phenyl-thiazole heterocycles and their structurally substituted derivatives (IA) and cationic triazole salts (IB) as inhibitors of the activity and dimerization of the trypanothione reductase enzyme present in the parasite. Among promastigote forms, compound 10d (IB) showed a superior efficacy of 47,02%. In axenic amastigotes, derivative 8j (IA) exhibited a maximum effect of 25,08% and in intracellular amastigotes, derivative 8e (IA) achieved an efficacy of 33,6% (Camarasa *et al.*, 2019).

Currently, new formulations of triazole derivatives are being developed to validate their leishmanicidal potential. Researcher Gontijo (2021) investigates the action of alkyltriazoles and alkylphosphocholines in female hamsters infected with *L. infantum chagasi* amastigotes. When compared to the control group, which showed values of 4,67 and $5,92 \times 10^5/\text{g}$ of parasites in the animals spleen and liver, respectively, treatment with alkyltriazoles showed more promising results, recording values of $1,30^4/\text{g}$ and $1,36 \times 10^3/\text{g}$ in the spleen and liver, respectively.

Document WO2020139291 exposes the potential of bisnaphthalimidopropyl derivatives as prototypes for drugs against parasitic diseases, including leishmaniasis. Among the various compounds developed, compound 9 exhibited activity against the promastigote form of *L. infantum chagasi in vitro*, resulting in a mortality rate of 45% after 3 days of treatment (Guzel *et al.*, 2020). Synthetic derivatives of bisnaphthalimidopropyl reveal a

mechanism of action by inhibiting the NAD^{+} dependent sirtuin deacetylase activity, leading to apoptosis in *L. infantum chagasi* promastigotes (Keskin *et al.*, 2019; Islek *et al.*, 2022).

Variations of bisnaphthalimidopropyl derivatives were created and investigated for their *in vivo* anti-*Leishmania* potential. In experimental tests, chronically infected BALB/c mice with *L. infantum chagasi* received these compounds, resulting in a significant reduction in the parasitic load in the liver and spleen of these animals, even in a short treatment period (Tavares *et al.*, 2012).

Document WO2021205303 explores the efficacy of ozonized peanut oil against *L. infantum chagasi* *in vivo*. The experiment was conducted with four dogs (2 males and 2 females) naturally infected with *L. infantum chagasi*, each animal showing varied symptoms of the disease. The results revealed regression of symptoms or complete recovery of the clinical condition in dogs that received the treatment (Caroci, 2021). Ionization is a process that adds superoxide ions ($\cdot$) to the O_2 molecule. Ozonotherapy has been implemented using vegetable oils, which have been extensively studied against parasitic infections (Akash; Rajasekar, 2021).

Research indicates that ozone induces peroxidation and destruction of the cellular walls and cytoplasmic membranes of *Leishmania*, degrading essential components such as glycoproteins, glycolipids, and crucial amino acids for the parasite's structure (Rajabi, 2015). Author Moda *et al.* (2014) evaluated the effects of intra-abdominal and intra-renal ozonotherapy in dogs infected with *L. infantum chagasi* for four weeks, observing significant improvements in the renal conditions of the animals with a decrease in serum levels of urea and creatinine, which are often altered in dogs infected by this species of *Leishmania*.

Patent WO2018015595A2 mentions the investigation of benzyl O-hydroxamate compound linked to gold nanoparticles and its leishmanicidal potential *in vitro* in promastigotes and amastigotes, as well as *in vivo* in BALB/c mice against *L. infantum chagasi*. The results obtained were promising, showing a reduction in the number of parasites by more than 90% (Gómez *et al.*, 2018). Hydroxamic acids can operate through different mechanisms of action, including the inhibition of histone deacetylases found in the *Trypanosoma* spp. parasite and acting on the inhibition of IspC, an enzyme present in *Plasmodium berghei* (Behrendt *et al.*, 2011; Kelly *et al.*, 2012).

Hydroxamic acids are found in natural products, and their metal chelation properties demonstrate anti-trypanosomal action against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*, showing efficacy against *Leishmania* spp. species (Alam, 2019; Foscolos *et al.*, 2022). Another study involving O-alkyl hydroxamate derivatives implemented in gold nanoparticles demonstrated increased activity against *L. infantum chagasi* amastigotes introduced into BALB/c mice, resulting in a lower parasitic load in the liver and spleen of these animals (Corpas-López *et al.*, 2020).

The research described in patent EP3995502A1 discusses the potential of 4-hydroxyphenylphosphonium derivatives against promastigote and amastigote forms of *L. infantum chagasi*, the causative agent of visceral leishmaniasis. Compound 1 with the chemical formulation of Bromide of (15-(2,4-di-hydroxyphenyl)-15-oxopentacil) triphenylphosphonium did not show a significant reduction in the *in vitro* parasitic load. However, *in vivo* studies in treated BALB/c mice demonstrated a reduction of more than 98% in the number of parasites when analyzing the liver and spleen of these animals (Dardonville *et al.*, 2022).

Triphenylphosphonium salts are molecules that act on the mitochondria of *Leishmania*, interfering with the energy metabolism and affecting ATP synthesis. BALB/c mice were infected with *L. infantum* promastigotes and treated with 4-hydroxyphenylphosphonium derivatives. After this period, the spleen and liver were removed to analyze the parasitic load, confirming the reduction of parasites with the established treatment (Manzano *et al.*, 2019).

The patent document JP2018043998A reports the enhancement of conventional liposomes with meglumine antimoniate associated with long-circulating liposomes in the treatment of *L. infantum chagasi*. *In vivo* assays performed in BALB/c mice showed a significant decrease in the number of parasites in the liver and spleen of the animals (Frederic *et al.*, 2018). Although the mechanism of action of meglumine antimoniate is not fully elucidated, it is believed that this drug acts by inhibiting several enzymes, such as trypanothione reductase and topoisomerase, to induce protozoan apoptosis (Santiago *et al.*, 2021).

Dos Santos *et al.* (2020) define the therapeutic potential of conventional liposomes and PEGylated liposomes for the delivery of meglumine antimoniate + allopurinol for the

treatment of leishmaniasis. *In vivo* experiments in dogs show promising results compared to allopurinol and the untreated group. There was suppression of the parasitic load of *L. infantum chagasi* in the liver, spleen, and bone marrow, potentiated by these liposomal complexes. The use of liposomal nanoparticles is increasingly emerging for the treatment of various diseases, precisely due to their physicochemical characteristics that provide biocompatibility and efficient drug delivery to the target region (Eygeris *et al.*, 2022).

In patent description WO2022101588A1, the leishmanicidal action of gold complexes with fluorinated heterocyclic carbene ligands is investigated. *In vitro* experimental tests with axenic amastigotes of *L. infantum chagasi* show that most formulated gold complexes were equally or more effective than control drugs (amphotericin B, pentamidine, miltefosine and fexinidazole) (Gornitzka *et al.*, 2022).

Zhang *et al.* (2018) analyzed a series of five new gold complexes containing heterocyclic carbenes *in vitro* in promastigotes and axenic amastigotes of *L. infantum chagasi*. The gold complexes have a mechanism of action that modifies and blocks cysteine residues in the active sites of the protozoan enzymes. The complexes in the research were active and selective against *L. infantum* compared to standard drugs (amphotericin B, pentamidine and miltefosine).

Patent WO2022/008708A1 evaluates artesunate in dogs naturally infected with *L. infantum chagasi*. Artesunate is a semi-synthetic organic peroxide from the artemisinin group used for the treatment of severe malaria, administered orally with a daily dose for 6 days. This drug demonstrated safety and efficacy, with a significant reduction in clinical symptoms and parasitic load compared to meglumine antimoniate + allopurinol.

The experimental study by Medkour *et al.* (2020) highlights the action of artesunate against *L. infantum chagasi* in naturally infected dogs. The research included 42 dogs followed for a period of 6 months, where the control group received standard medications, meglumine antimoniate and allopurinol for 28 days, while the treated group received artesunate for 6 days. There was a decrease in antibodies, making the animals that received artesunate seronegative (58%), along with improvements in clinical signs and elimination of parasites, without side effects during artesunate treatment, making it a promising alternative in conjunction with the results of meglumine antimoniate and allopurinol.

Document WO2022008784A1 investigates the activities of simple acyclic polyamines linked to heterocyclics for the treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis *in vitro*. The results obtained in the promastigote and amastigote forms of *L. infantum* demonstrate that the compounds from this research have the ability to inhibit superoxide dismutase, an exclusive enzyme of kinetoplastid parasites belonging to the genus *Leishmania*.

Several polyamine substances are being investigated to understand their leishmanicidal action in inhibiting crucial enzymes for the parasite's survival, such as iron superoxide dismutase. Polyamine derivatives have shown efficacy against *L. infantum chagasi*, presenting a notable metabolic alteration with an increase in succinate, leading to high levels of redox stress, as well as L-alanine and acetate (Urbanová *et al.*, 2019).

When analyzing the drug innovations described in the DNDi, none of the prototypes mentioned in the patents were included. This highlights the scarcity of options to treat visceral leishmaniasis, a recurring and lethal disease in Latin America. This emphasizes the lack of recognition for cases of this neglected disease, highlighting the urgency for advances in research against visceral leishmaniasis and the expansion of pharmacological trials.

It is important to note that the prototypes mentioned in the patents show promising results and are strong candidates for medications, exhibiting considerable potential against *Leishmania infantum chagasi* both *in vitro* and *in vivo*. These different innovations are effective against the promastigote and/or amastigote forms of the protozoan, capable of acting on different molecular targets present in *Leishmania*, resulting in the induction of leishmanicidal activity.

CONCLUSION

Therefore, this study demonstrated advances in the search for new compounds in the pharmacological and biotechnological areas, where these findings are relevant for innovation in the pharmacotherapy of this disease. The recent patent scenario describes new prototypes against *L. infantum chagasi*, both synthesized and natural products and their potential has been validated in *in vitro* and *in vivo* experiments. Advances in research into leishmaniasis treatments are still challenging and preliminary, as there is no mention of clinical studies.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by the Foundation for the Support of Research in Alagoas (60030.0000000161/2022; 60030.0000000862/2022).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CAPES, CNPq, MCTC, FINEP and FAPEAL for their support. Additionally, the authors would like to thank various colleagues at UFAL for their constructive criticisms and assistance with this project.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

REFERENCES

- Akash N, Rajasekar A. Effect of Chlorhexidine, Ozonated Olive Oil and Olive Oil Mouthwash on Oral Health Status of Patients with Gingivitis: A Randomised Controlled Trial. *J. Pharm. Res. Int.*, 2021;33(62B):401-410. <https://doi.org/10.9734/jpri%2F2021%2Fv33i62B35627>.
- Akbari M, Oryan A, Hatam G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. *Imunol. Lett.* 2021;233:80-86, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.03.011>.
- Alam MA. Methods for Hydroxamic Acid Synthesis. *Curr. Org. Chem.* 2019;23(9):978-993. Doi: [10.2174/1385272823666190424142821](https://doi.org/10.2174/1385272823666190424142821).
- Bastos MM, Hoelz LVB, Boechat N, De Oliveira AP. Antileishmanial Chemotherapy: A literature Review. *RVQ*, 2016;8(6):2072-2104. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160139>.
- Bi K, Chen Y, Zhao S, Kuang Y, Wu CJ. Current visceral leishmaniasis research: a research review to inspire future study. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9872095. <https://doi.org/10.1155/2018/9872095>.
- Breese K, Chatelain E, Heppell J, Keenan M, Geldern T. Pyrrolopyrimidine derivatives and their use in the treatment of leishmaniasis. Assignee: Medicines for Neglected Diseases Initiative. EP4092030A1. 2022.

Camarasa RMJ, Velázquez S, Revuelto A, Gago F, Jiménez-Ruiz A, Toro MA, *et al.* Triazole-phenyl-thiazole heterocycles as innovative trypanothione reductase inhibitors and their use as leishmanicides. Assignee: Univ Alcalá Henares. EP3502109A1. 2019.

Carocci G. Formulation Comprising Ozonized Oil for Use in the Prevention and/or Treatment of Leishmaniasis. Assignee: Project and Communications LTD. WO2021205303. 2021.

Carvalho SH, Frézard F, Pereira NP, Moura AS, Ramos LMQC, Carvalho GB, *et al.* American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for and alternative treatment. *Trop Med Int Health* 2019;24(4):380:391. <https://doi.org/10.1111/tmi.13210>.

Castro SV. Use of miltefosin in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *JIBI*, 2020;5(1):38-42. Published in: <https://www.ojs.ufpi.br/index.php/jibi>. Accessed 12 September 2023.

Clinical Trials gov (2015) – Trial to Determine Efficacy of Fexinidazole in Visceral Leishmaniasis Patients in Sudan. NCT01980199.

Corpas-López V, Tabraue-Chávez M, Sixto-López Y, Panadero-Fajardo S, Alves de Lima Franco F, Domínguez-Seglar JF, *et al.* O-Alkyl Hydroxamates Display Potent and Selective Antileishmanial Activity. *J Med Chem.* 2020;63(11):5734-5751. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b02016.

Dardonville C, Cueto DEJ, Gamarro CF, Manzano GJI, Perea MA, Alunda RJM, *et al.* 4-hydroxyphenylphosphonium salts with antiparasitic properties. Assignee: Consejo Superior Investigacion, Univ Madrid Complutense. EP3995502A1. 2022.

Donato LE, Freitas LRS, Duarte EC, Romero GAS. Visceral leishmaniasis lethality in Brazil: an exploratory analysis of associated demographic and socioeconomic factors. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20200007. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0007-2020>.

Dos Santos CCP, Ramos GS, De Paula RC, Faria KF, Moreira POL, Pereira RA, *et al.* Therapeutic Efficacy of a Mixed Formulation of Conventional and PEGylated Liposomes Containing Meglumine Antimoniate, Combined with Allopurinol, in Dogs Naturally Infected

with *Leishmania Infantum*. Antimicrob Agensts Chemother, 2020;64(7):e00234-20. <https://doi.org/10.1128/aac.00234-20>.

Fersing C, Boudot C, Pedron J, Hutter S, Pristas N, Castera-Ducros C, *et al.* 8-Aryl-6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-a]pyridines as potent antitrypanosomatid molecules bioactivated by type 1 nitroreductases. Eur. J. Med. Chem. 2018;157:115-126. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.064>.

Foscolos AS, Tsotinis A, Taylor MC, Kelly JM, Papanastasiou IP. Probing adamantane arylhydroxamic acids against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. Molbank, 2022(2). <https://doi.org/10.3390/M1363>.

Franco AMR, Comandolli-Wyrepkowski CD, Chagas AFS, Jensen BB, Brasil AMV, Barros AMC, *et al.* Bioactive candidate substances for alternative treatment of cutaneous Leishmaniasis. BJD, 2022;7:77011-77026. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n8-088>.

Frederic JGF, Erly GA, Raulrio R, Cynthia PD, Sydnei MS, Simone AR. Pharmaceutical compositions composed of conventional liposomes and prolonged circulation liposomes for treatment of visceral leishmaniasis. Assignee: Federal University of Minas Gerais. JP2018043998A. 2018.

Gargía-Espanã ME, Clares GMP, Delgado PE, Marín SC, Sánchez MM, Martín ER, *et al.* Use of simple acyclic polyamines for the treatment of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania*. Assignee: University Granada. WO2022/008784A1.

Gibson CL, Huggan JK, Kennedy A, Kiefer L, Lee JH, Sucking C, *et al.* Diversity oriented syntheses of fused pyrimidines designed as potential antifolates. Org. Biomol. Chem., 2009;7(9):1829-1842. [Doi 10.1039/b818339b](https://doi.org/10.1039/b818339b).

Gómez AJV, Días MG, Franco FM, Morillas FM, Corpas VL, Martín JS, *et al.* Compounds for the treatment of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania*. Assignee: University of Granada. WO2018015595A2. 2018.

Gornitzka H, Valentin A, Bourgeade-Delmas S, Hemmert C. Gold(I) complexes with fluorinated N-heterocyclic carbene ligands and their use as therapeutic agents. Assignee: Center Nat Rech Scient. WO2022101588A1. 2022.

Guzel M, Uçisik MH, Sahin F, Keskin E, Islek Z. Naphthalimide derivatives as antiparasitic agents for the treatment of leishmaniasis, as well as viral, bacterial and neoplastic diseases. Assignee: Istanbul Medipol Universities. WO2020139291. 2020.

Hefnawy A, Berg M, Dujardin J, De Muylder G. Exploiting knowledge about *Leishmania* drug resistance to support the search for new medicines. *Parasitol Trends*. 2017;33(3):162-174. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.003>.

Islek Z, Uçisik MH, Keskin E, Sucu BO, Gomes-Alves AG, Tomás AM, *et al*. Antileishmanial activity of BNIPdaoct-and BNIPdanon-loaded emulsions on *Leishmania infantum* parasites. *Front. Nanotech.*, 2022;3:101. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.773741>.

Kelly JM, Taylor MC, Horn D, Loza E, Kalvinsh I, Björkling F. Inhibitors of human histone deacetylase with potent activity against the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(5):1886-90. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.01.072.

Keskin E, Uçisik MH, Sucu BO, Guzel M. Novel Synthetic Approaches for Bisnaphthalimidopropyl (BNIP) Derivatives as Potential Anti-Parasitic Agents for the Treatment of Leishmaniasis. *Molecules*. 2019;24(24):4607. doi: [10.3390/molecules24244607](https://doi.org/10.3390/molecules24244607).

Kumari S, Kumar V, Tiwari RK, Ravidas V, Pandey K, Kumar A. Amphotericin B: A drug of choice for visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2022;235:106661. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106661>.

Manzano JI, Cueto-Díaz EJ, Olías-Molero AI, Perea A, Herraiz T, Torrado JJ, *et al*. Discovery and pharmacological studies of 4-hydroxyphenyl-derived phosphonium salts active in a mouse model of visceral leishmaniasis. *J. M. Chem.*, 2019;62(23):10664-10675. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00998>.

Medkour H, Bitam I, Laidoudi Y, Lafri I, Lounas A, Hamidat HK, *et al*. Potential of Artesunate in the treatment of visceral leishmaniasis in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: Efficacy evidence from a randomized field trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(12):e0008947. doi: 10.1371/journal.pntd.0008947.

Moda, TF, De Lima CJ, Fernandes AB, Zângaro RA, Moreira LH. Effects of intra-abdominal and intra-retal ozonization on the renal evaluation of dogs affected by visceral leishmaniasis. XXIV Brazilian Congress of Biomedical Engineering – CBEB, 2014. Available in: https://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014_submission_561.pdf. access at: November 26, 2023.

Ortiz RC, Anversa L. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo, Brazil, 2004-2012: a descriptive study. *Epidemiol. Serv. Health*. 2015;24(1):97-104. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742015000100011>.

Ott, I. Chapter Four – Metal *N*-heterocyclic carbene complexes in medicinal chemistry. *Adv. Inorg. Chem.*, 2020;75:121-148. <https://doi.org/10.1016/bs.adioch.2019.10.008>.

Pan American Health Organization – PAHO (2021) Leishmaniasis epidemiological bulletin of the Americas, published in: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Accessed 30 August 2023.

Rajabi O, Sazgarnia A, Abbasi F, Layegh P. The activity of ozonated olive oil against *Leishmania major* promastigotes. *Iran J Basic Med Sci*. 2015;18(9):915-9. PMID: [26523224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26523224/).

Rivas F, Del Mármol C, Scalese G, Pérez-Díaz L, Machado I, Blacque O, *et al*. New multifunctional Ru(II) organometallic compounds show activity against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania infantum*. *J Inorg Biochem*. 2022;237:112016. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112016>.

Pollmeier M, Blair JJ. Method to treat and cure leishmaniasis using fexinindazole. Assignee: Boehringer Ingelheim Animal Health Usa Inc. EP2950795B1. 2018.

Pradhan S, Schwartz RA, Patil A, Grabbe S, Goldust M. Treatment options for leishmaniasis. *Clin. Exp. Derm*. 2022;47(3):516–521. <https://doi.org/10.1111/ced.14919>.

Santiago AS, Pita SSR, Guimarães ET. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. *Res. Soc. Dev*. 2021;10(7):e29510716543-e29510716543. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16543>.

Tavares J, Ouaisi A, Silva AM, Lin PKT, Roy N, Cordeiro-da-Silva A. Anti-leishmanial activity of the bisnaphthalimidopropyl derivatives. *Parasitol. Int.* 2012;61:360-363. doi:10.1016/j.parint.2011.11.005.

Teixeira EM, Rabello ALT, Aguiar MMG. In vitro activity and in vivo efficacy of fexinidazole Against new worls *Leishmania* species, *J. Antimicrob. Chemother.* 2019;74:2318–2325. Doi: 10.1093/jac/dkz172.

Urbanová K, Ramírez-Macías I, Martín-Escolano R, Rosales MJ, Cussó O, Serrano J, *et al.* Effective Tetradentate Compound Complexes against *Leishmania* spp. that Act on Critical Enzymatic Pathways of These Parasites. *Molecules.* 2018;24(1):134. doi: 10.3390/molecules24010134.

Varloud M, Mediannikov O, Medkour H, Davoust B. Veterinary Compositions for Preventing and/or Treating Leishmaniosis. Assignee: Ceva Sante Animale. WO2022/008708A1.

Vasconcelos CRS, Rezende AM. Systematic in *silico* Evaluation of *Leishmania* spp. Proteomes for Drug Discovery. *Front. Chem.*, 2021;9:607139. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.607139>.

Wilhelm TJ. Visceral Leishmaniasis. *Der Chirurg.* 2019;90(10):833-837. <https://doi.org/10.1007/s00104-019-0994-1>.

WIPO (2020) – International Patent Classification Guide (IPC). available in: <http://ipc.inpi.gov.br/classifications/ipc/ipcpub/media/help/pt/guide.pdf>. access in: November 27, 2023.

Wyrepkowski CDC, Paz AC, Jensen BB, Franco AMR. Pharmacological aspects of drug therapy used specifically for leishmaniasis: a literature review. *REA*, 2020;12(8):e3352-e3352. <https://doi.org/10.25248/reas.e3352.2020>.

Zhang C, Bourgeade Delmas S, Fernández Álvarez Á, Valentin A, Hemmert C, Gornitzka H. Synthesis, characterization, and antileishmanial activity of neutral N-heterocyclic carbenes gold(I) complexes. *Eur J Med Chem.* 2018;143:1635-1643. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.10.060.

10. 2. APÊNDICE B

LEISHMANICIDAL POTENTIAL *IN VITRO* OF SYNTHETIC COMPOUNDS DERIVED FROM PURPUROGALLIN

Camilla Amanda de Oliveira Gomes^{a,b}, Iasmim Lucas da Silva^d, Shakira Cavalcante de Albuquerque Ferreira^b, Márcio Thomaz dos Santos Varjão^b, Hilda Caroline do Nascimento Santos^{a,b}, Andressa Letícia Lopes da Silva^{a,b}, Celso Amorim Camara^d, Tânia Maria Sarmento da Silva^d, Alysson Wagner Fernandes Duarte^c, Magna Suzana Alexandre Moreira^b, Aline Cavalcanti de Queiroz^{a,b,c}.

Affiliations

^aPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas-UFAL/Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brazil.

^bLaboratory of Pharmacology and Immunity, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas - UFAL / Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brazil.

^cLaboratory of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Center for Medical and Nursing Sciences, Federal University of Alagoas - UFAL / Campus Arapiraca, Arapiraca, AL, Brazil.

^dLaboratory of Phytochemical Bioprospecting, Department of Chemistry, Federal Rural University of Pernambuco - UFRPE, Recife, PE, Brazil.

***Corresponding Author:** Aline Cavalcanti de Queiroz

Address: Laboratory of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Center for Medical and Nursing Sciences, Federal University of Alagoas - Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa - Bom Sucesso, Arapiraca - AL, 57309-005, Brazil. Email Address: aline.queiroz@arapiraca.ufal.br

Highlights

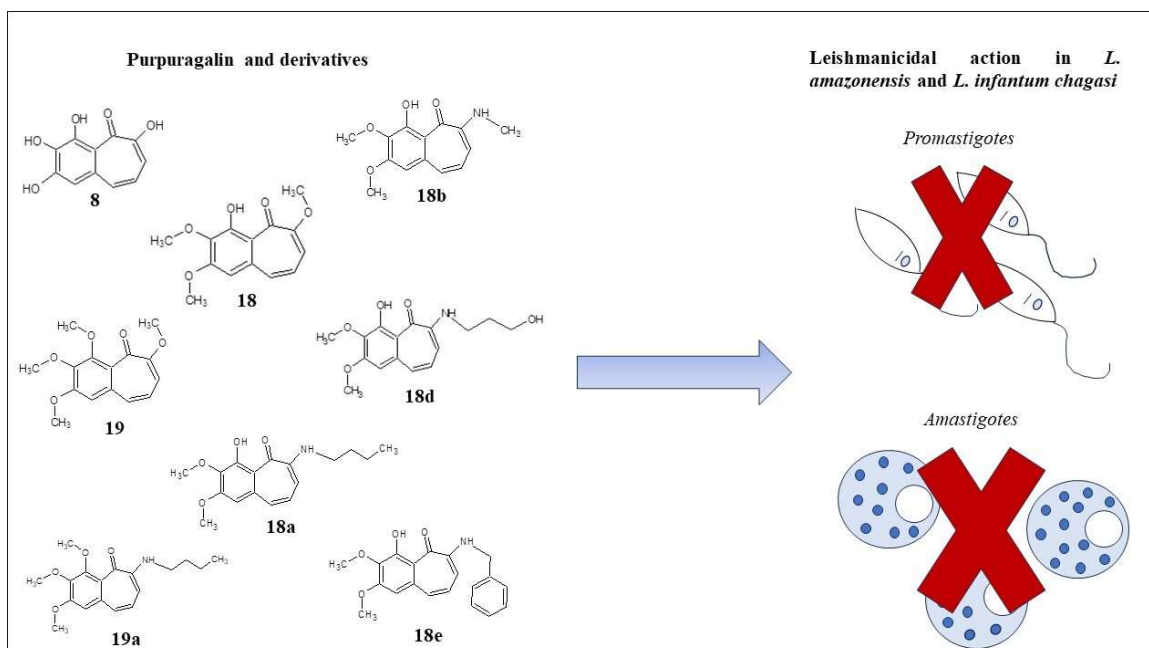
- Synthetic derivatives of purpurogallin showed low toxicity to J774.A1 macrophage cells.
- Compounds 19a, 18b, 18d and 18e exhibited significant cytotoxicity (>80%) against *L. amazonensis* and *L. infantum chagasi* species.
- Derivative 18 presented a significant selectivity index (>10,06) against *L. infantum chagasi*, being more selective to the parasite than to the macrophages.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a neglected disease with several limitations in its pharmacological therapy, which should be considered in the search for new prototypes. Purpurogallin is a phenol that plays various pharmacological and biological activities, including antiparasitic activity. Therefore, this study investigated the in vitro leishmanicidal potential of synthetic derivatives of purpurogallin. The cytotoxicity of the compounds was evaluated in J774.A1 macrophages by MTT colorimetric assay, and the anti-*Leishmania* action was assessed in the promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. infantum chagasi*. The derivatives showed low cytotoxicity in host cells (<50%), except for 19a and 18e. Conversely, substances 19a, 18b, 18d and 18e showed promise in inhibiting *L. amazonensis* and *L. infantum chagasi* species with cytotoxicity >80%. The derivative 18 demonstrated a selectivity index >10,06 against *L. infantum chagasi* compared to macrophages (J774.A1). In conclusion, based on the results obtained, synthetic derivatives of purpurogallin appear to be strong leishmanicidal candidates due to their low cytotoxicity to human cells and significant inhibition against the evaluated species.

Keywords: Leishmanicidal, Synthetic Compounds, Prototypes.

Graphical Abstract



INTRODUCTION

A Leishmaniasis is an infectious disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, which is categorized among Neglected Tropical Diseases (NTDs). Its higher incidence occurs in countries lacking governmental investment in public healthcare quality and basic sanitation. Consequently, this disease primarily affects impoverished, immunocompromised, and malnourished individuals (Fampa *et al.*, 2021).

This parasite is transmitted by the female phlebotomine vector, commonly known as the sandfly, through the blood-feeding process. Promastigote forms develop within the invertebrate vector and when transmitted to the vertebrate host, these flagellated protozoa are phagocytosed by immune cells, mainly macrophages. Once internalized, promastigotes alter their evolutionary forms into amastigotes, displaying an oval morphology with an internalized flagellum that proliferates and causes cell lysis, leading to new phagocytosis events (Serafim *et al.*, 2021).

The clinical manifestations of this disease may vary depending on the infecting species. The most recurrent manifestation is tegumentary leishmaniasis (LT). However, visceral leishmaniasis (LV) is considered the most severe form, triggering symptoms like hepatosplenomegaly, anemia, irregular fevers, weight loss, among other symptoms that might

be common in other pathologies, potentially leading to misdiagnosis or delayed diagnosis (Mann, 2021).

Current pharmacological therapies present considerable limitations such as cost, administration route, low drug safety leading to parasite resistance and high toxicity. Choosing appropriate treatment requires understanding the individual in a singular way, considering important factors such as age, co-infection with other pathologies, infecting species, clinical manifestations and accessibility to pharmacotherapy (Sundar; Singh, 2018).

Currently, pharmaceutical industries show no interest in investing in new drug formulations for eradicating neglected diseases like leishmaniasis due to low treatment accessibility, making the financial return unfeasible for these companies. However, records of infection cases caused by this parasite have been gradually increasing over the years (Carvalho *et al.*, 2019).

Natural products have been used in folk medicine for centuries due to their pharmacological and biological potentials in treating various human pathologies. These biomolecules have different chemical structures and are widely distributed in nature, being found in plant, animal, microbial and marine organisms (Koparde *et al.*, 2019).

Biotechnology has contributed to improving natural compounds that present limitations due to their complex chemical structures and low productivity of molecules. However, chemical synthesis contributes to formulating natural products of pharmacological importance, aiming to eliminate limitations found in specific biomolecules (Li, 2018; Cravens, 2019).

Natural phenolic compounds are widely used for their diverse biological activities. Among these compounds is purpurogallin (2,3,4,6-tetrahydroxy-5H-benzocyclohepten-5-one), comprising a benzotropolone. This molecule can be found in various plant organisms, mainly in oak galls and nuts from *Quercus* spp. However, this chemical structure can be obtained synthetically through different methodologies, with the primary method used currently being the oxidation process with pyrogallol (Kim, 2018).

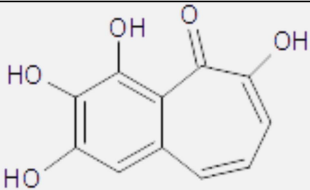
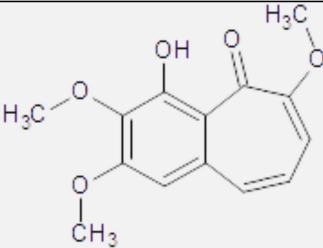
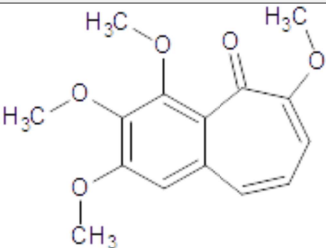
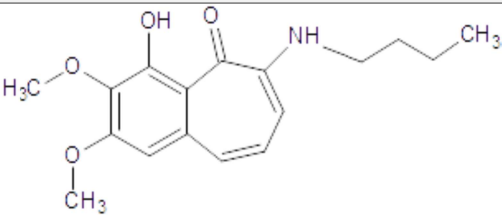
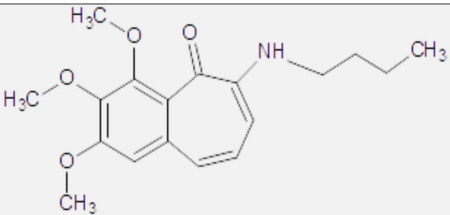
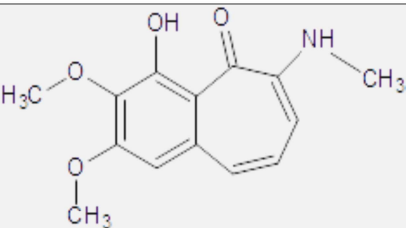
Therefore, the present research was conducted to evaluate the *in vitro* leishmanicidal potential of synthetic derivatives of purpurogallin against strains of *L. infantum chagasi* and *L. amazonensis*.

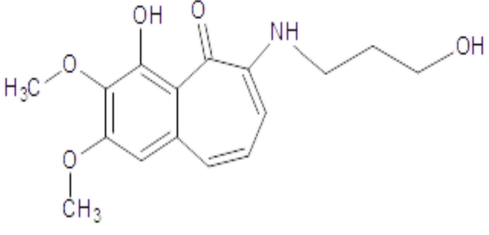
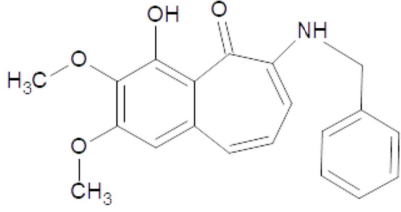
MATERIALS AND METHODS

Production of purpurogaline derivatives

Purpurogaline and its derivatives represented in table 1, were synthesized and characterized at the Bioactive Compound Synthesis Laboratory (LSCB) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE) by Prof. Dr. Celson Amorim Camara and Master Yasmim Lucas da Silva.

Table 1 - Molecular structures of purpurogaline derivatives

 8 2,3,4,6-tetrahydroxy-5H- benzo[7]annulen-5-one	 18 4-hydroxy-2,3,6-trimethoxy-5H-benzo[7]annulen-5-one
 19 2,3,4,6-tetramethoxy-5H- benzo[7]annulen-5-one	 18a 6-(butylamino)-4-hydroxy-2,3-dimethoxy-5H- benzo[7]annulen-5-one
 19a 6-(butylamino)-2,3,4-trimethoxy-5H-	 18b 4-hydroxy-2,3-dimethoxy-6-(methylamino)-5H-

benzo[7]annulen-5-one	benzo[7]annulen-5-one
 18d 4-hydroxy-6-[(3-hydroxypropyl)amino]-2,3-dimethoxy-5H-benzo[7]annulen-5-one	 18e 6-(benzylamino)-4-hydroxy-2,3-dimethoxy-5H-benzo[7]annulen-5-one

Maintenance of J774.A1 Macrophage Line

J774.A1 macrophages were cultured in culture bottles in 10 mL of RPMI medium (Roswell Park Memorial Institute-1640) supplemented with L-glutamine, pyruvate, non-essential amino acids, 10% fetal bovine serum (Roche), and maintained in an incubator at 37°C, 95% humidity and 5% CO₂.

Determination of Cell Viability in the J774.A1 Line

At the time of use, J774.A1 macrophages were cultured in 96-well plates at a concentration of 5×10^4 cells/well and incubated overnight in an incubator at 37°C with a humid atmosphere containing 5% CO₂. Subsequently, the supernatant was removed from the wells, and the cells were treated in triplicate with 200 µL of substances diluted in RPMI medium at different concentrations of 100, 30, 10, 3, 1 and 0,3 µM, reincubated for 48 hours. Cell viability was determined by the MTT reduction assay (Mosmann, 1983) and absorbance readings were taken at 550 nm using a spectrophotometer. The cell viability of macrophages treated with the compounds was compared to the death standard obtained in control cultures that received only supplemented RPMI medium.

Maintenance of *L. infantum chagasi* and *L. amazonensis* Species

The promastigote forms of the parasites *L. infantum chagasi* and *L. amazonensis* were maintained *in vitro* in Schneider's medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 2mM L-glutamine and 2% sterile human urine, in a Biological Oxygen Demand (BOD) incubator at 25°C. When they reached their optimal growth, they were used for the experiments.

Cytotoxicity Assay in *Leishmania* Promastigotes

The parasites were centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes at 25°C. Subsequently, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in Schneider's medium. A concentration of 1×10^5 parasites/mL was used, and then 100 μ L of this suspension was distributed into a 96-well plate. The treatment was performed in triplicate with the compounds diluted in 100, 30, 10, 1, 3, 0,3 μ M and amphotericin B from 100 to 0,001 μ M, as well as the 0,2% DMSO vehicle control prepared in supplemented Schneider's medium, to achieve a final volume of 200 μ L per well. The plate was incubated in a BOD incubator at 27°C for 48 hours. After this period, the number of parasites was determined using a Neubauer chamber with the aid of an optical microscope. The inhibition caused by each extract was expressed as a percentage in relation to cells cultured only in the presence of the DMSO vehicle and Schneider's medium.

Statistical Analysis

Statistical analyses of the data obtained in the *in vitro* assay were performed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc tests, using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA Statistical). Data were considered significant

when *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001 and ****p<0,0001 compared to the diluent of the DMSO 0,2% extracts.

RESULTS AND DISCUSSION

Cytotoxic evaluation in J774.A1 macrophages and leishmanicidal action of derivatives in *Leishmania* species.

Initially, the cytotoxicity of purpurogalin derivatives on J774.A1 lineage macrophages was evaluated, and the results can be observed in Table 2.

Table 2 - Cytotoxic effect of in vitro treatment of purpurugalin and derivatives on macrophages of the J774.A1 lineage for 48 hours.

Treatments	CI ₅₀ ^a (μM) ± S.E.M	Maximum cytotoxicity ± S.E.M (%) ^b
Amphotericin B	52,56 ± 4,08	63,82 ± 1,07****
8	>100	34,28 ± 1,82****
18	>100	30,68 ± 2,52*
19	>100	13,29 ± 2,99
18a	>100	6,23 ± 3,61
19a	27,89 ± 4,52	89,43 ± 0,37****
18b	>100	30,70 ± 1,66****
18d	> 100	32,24 ± 2,66****
18e	37,89 ± 0,96	90,61 ± 0,30****

^a50% Inhibitory Concentration ± Standard error of inhibitory concentration in J774.A1, calculated using concentration-response curves. ^bMean ± standard error of the mean of the maximum effect on the viability of J774.A1, in triplicate from a representative experiment. Maximum effect values were significant when ****p<0,0001 compared to the 0,2% DMSO group.

It is observed that out of the eight purpurogalin derivatives, only 19a and 18e were cytotoxic with a maximum effect >80%. However, the other derivatives showed an IC₅₀ (mean inhibitory concentration of the compound) >100 μM and a maximum effect <50%,

demonstrating low cytotoxicity to host cells, in contrast to amphotericin B, which presented an IC₅₀ of 52,56 μ M and a maximum effect of 63,83%. Substances 19a and 18e that exhibited cytotoxicity have a similarity in their chemical structures due to the presence of methoxyl radicals (CH₃O) at carbons 2 and 3 of the molecule, as well as a closed cyclic structure with a ketone (C = O).

It is understood that purpurogalin (PPG) plays a cytoprotective role as an antioxidant against xanthine oxidase, which is a flavoprotein that produces toxic superoxide anions. PPG can exert natural cytoprotection due to the presence of tropones that contribute to this bioactivity against toxic superoxide and hydroxyl radicals, as is the case with hydrogen peroxide that causes DNA damage and T cell apoptosis (Popov *et al.*, 2019).

Similarly, the cytotoxicity of derivatives and the selectivity index against host cells and the promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. infantum chagasi* were evaluated, as shown in Tables 3 and 4.

Table 3 - Leishmanicidal effect of purpurugalin and derivatives against promastigote forms of *L. amazonensis*.

Treatments	CI ₅₀ ^a (μ M) $\pm$ S.E.M	Maximum Cytotoxicity $\pm$ S.E.M (%) ^b	SI ^c
Amphotericin B	0,90 $\pm$ 0,04	92,81 $\pm$ 1,90****	58,4
8	>100	NC	-
18	>100	26,61 $\pm$ 1,24****	-
19	>100	48,92 $\pm$ 1,90****	-
18a	>100	18,70 $\pm$ 0,71***	-
19a	22,99 $\pm$ 1,35	91,47 $\pm$ 1,55****	1,21
18b	33,44 $\pm$ 2,64	90,70 $\pm$ 2,68****	>2,99
18d	22,43 $\pm$ 2,01	91,47 $\pm$ 0,77****	>4,45
18e	24,06 $\pm$ 0,68	88,37 $\pm$ 1,34****	1,57

^aInhibitory concentration of 50% $\pm$ standard error of inhibitory concentration in *L. amazonensis* promastigote, calculated using concentration-response curves. ^bMean $\pm$ standard error of the mean of the maximum effect on

Leishmania promastigote viability, in triplicate of a representative experiment. Maximum effect values were significant when **** $p < 0,0001$ compared to the 0,2% DMSO group. NC: Non-cytotoxic up to the maximum concentration tested, when compared to the 0,2% DMSO group. SI: Selectivity index = CC_{50} (macrophages) / IC_{50} (*Leishmania* spp.).

Promastigotes of the species *L. amazonensis* were subjected to treatment with purpurogalin derivatives, and it was found that 19a (22,99 μ M), 18b (33,44 μ M), 18d (22,43 μ M) and 18e (24,06 μ M) demonstrated efficacy in inhibiting this parasite with a maximum effect of >80%, similar to the standard drug, which exhibited a maximum effect of 92,81% and an IC_{50} of 0,90 μ M. However, substances 8, 18, 19 and 18a did not exhibit cytotoxicity greater than 50%.

The derivatives 19a, 18b, 18d and 18e are active against the parasite strain, showing functional groups in their chemical structures with the presence of secondary amine groups (N-butylamine, butylamine, methylamine or benzylamine) and methyl radicals (CH_3). What differs among them are the quantities and distributions of these structures within the purpurogalin molecule; however, 18e is the only derivative with the addition of a benzylamine.

The purpose of the selectivity index is to obtain a parameter for selecting substances for human cells or strains of *Leishmania* species, considering a substance to be selective if the value is equal to or greater than 10. Substances 18b and 18d showed values >2,99 and >4,45, respectively. Thus, as they did not reach definitive values, it can be concluded that these derivatives may or may not be selective against the parasite.

Table 4 - Leishmanicidal effect of purpurugalin and derivatives against promastigote forms of the species *L. infantum chagasi*.

Treatments	$CI_{50}^a (\mu M) \pm$ S.E.M.	Maximum Cytotoxicity $\pm$ S.E.M (%) ^b	SI ^c
Anfotericina B	26,46 $\pm$ 3,62	78,86 $\pm$ 0,90****	2,41
8	>100	NC	-
18	9,94 $\pm$ 4,15	60,22 $\pm$ 3,87****	>10,06
19	79,01 $\pm$ 8,28	59,14 $\pm$ 2,15****	>1,26

18a	25,30 ± 0,55	75,27 ± 1,07****	>3,95
19a	28,66 ± 5,98	89,81 ± 0,92****	0,97
18b	22,36 ± 1,45	86,13 ± 2,92****	>4,47
18d	38,01 ± 2,26	81,48 ± 2,45****	>2,63
18e	22,67 ± 2,21	90,48 ± 4,15****	1,67

^aInhibitory concentration of 50% ± Standard error of inhibitory concentration in *L. infantum chagasi* promastigote, calculated using concentration-response curves. ^bMean ± standard error of the mean of the maximum effect on *Leishmania* promastigote viability, in triplicate of a representative experiment. Maximum effect values were significant when ****p<0,0001 compared to the 0,2% DMSO group. NC: Non-cytotoxic up to the maximum concentration tested, when compared to the 0,2% DMSO group. ^cSI: Selectivity index = CC₅₀ (macrophages) / IC₅₀ (*Leishmania* spp.).

The derivatives 18 (9,94 µM), 19 (79,01 µM), 18a (25,30 µM), 19a (28,66 µM), 18b (22,36 µM), 18d (38,01 µM) and 18e (22,61 µM) showed significant efficiency in inhibiting *L. infantum chagasi* with a maximum effect >59%. However, noteworthy are substances 19a, 18b, 18d and 18e, which were the most effective against the protozoan, demonstrating a maximum effect superior to 80%. These products revealed greater cytotoxicity than amphotericin B, which exhibited an efficacy of 78,86% and an IC₅₀ of 26,46 µM.

It is observed that the derivatives that showed higher efficiencies (19a, 18b, 18d and 18e) were the same as those that yielded promising results in the inhibition of *L. amazonensis*. When analyzing the selectivity index, only substance 18 was selective against *L. infantum chagasi* promastigotes with a value >10,06 and demonstrating a lower IC₅₀ of 9.94 µM compared to the others originated. However, the derivatives 19 (>1,26), 18a (>0,97), 18b (>4,47) and 18d (>2,63) did not present a determined value, indicating a potential for attaining selectivity against the parasite.

Substance 8 did not demonstrate cytotoxicity to either *Leishmania* species, it originated from an oxidative reaction with pyrogallol and contains the chemical structure of purpurogalin without modifications. Through this synthetic purpurogalin, other derivatives were generated.

In the molecule identification process conducted by the author Da Silva in synthesizing the derivatives in the study, substance 8, which is the purpurogalin that gives rise to the derivatives, has hydroxyls in its chemical structure, giving it a more polar

characteristic. However, when replacing the hydroxyls with methoxyls and/or amine groups, it resulted in increased non-polarity compared to the original substance. Thus, structural changes through other chemical configurations, both in quantity and extent, can influence the interaction of substances with the non-polar regions in the *Leishmania's* plasma membrane.

Scientific studies have shown that derivatives containing amine or methoxy groups exhibit leishmanicidal activity. Rodrigues *et al.* (2018) synthesized compounds of 4-phenyl-1,3-thiazol-2-amines. Upon evaluating the results, it was found that the substance 4-C(CH₃)₃ induced a reduction in *L. amazonensis* promastigotes *in vitro*, with an IC₅₀ of 20,78 µM. The IC₅₀ values were similar in the same species treated with purpurogalin derivatives: 19a (22,99 µM), 18d (22,43 µM) and 18e (24,06 µM).

Phenethylamine derivatives showed potential against *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* promastigotes in a 48-hour treatment. It is noteworthy that N-phenethylbenzamide has a similar IC₅₀ (9,6 µM) to substance 18 of purpurogalin (9,94 µM). However, the compound N-(4-methylphenethyl)benzamide demonstrates an IC₅₀ of 27,9 µM, comparable to the IC₅₀ values of derivatives 18a (25,30 µM), 19a (28,66 µM) and 18e (22,67 µM) of purpurogalin (Brasil *et al.*, 2017).

The synthesis and biological evaluation of fatty acids from *Sommeria sabiceoides* resulted in anti-*Leishmania* activity against *L. donovani* promastigotes. The (±)-2-methoxy-6-heptadecynoic acid contains methoxy in its chemical structure and demonstrated a CE₅₀ of 74,0 µM. This compound was promising in inhibiting *Leishmania* topoisomerase IB enzyme. It is noteworthy that the cytotoxicity index of the new fatty acid was similar to derivative 19 of purpurogalin in *L. infantum chagasi*, which showed an IC₅₀ of 79,01 µM (Carballeira *et al.*, 2012).

Currently, few studies describe the antiparasitic potential of purpurogalin, as demonstrated by authors Lamba and Roy (2023), who reported PPG's action on *Plasmodium falciparum* species by inhibiting DNA gyrase, which is a type II topoisomerase present in unicellular organisms. The substance induced a significant reduction in parasite growth (>90%) with a 96-hour treatment.

DNA gyrase is a type II topoisomerase present in the nuclear genome of bacteria and parasites such as *P. falciparum*, playing an essential role in DNA replication. However, it is important to note that apicoplast gyrase, found in protozoa, is not present in humans. In this context, purpurogalin has shown promising results in inhibiting protozoan growth, as it directly interferes with this enzyme, offering antiparasitic action (Pakosz *et al.*, 2021).

Author Ren *et al.* (2001) produced derivatives containing aromatic and aliphatic esters with hydroxyl group from a purpurogalin benzotropinone. During the investigation of *in vitro* antiparasitic activity, compound 3l showed an IC₅₀ of 8,9 mM against *P. falciparum*, while derivative 3f exhibited an IC₅₀ of 9,2 mM, values comparable to derivative 18 of synthetic purpurogalin, which showed an IC₅₀ of 9,94 µM.

CONCLUSION

The tested derivatives show low toxicity against J774.A1 macrophages, extracts 19a and 18e. However, substances 19a, 18b, 18d and 18e are strong antiparasitic candidates due to their high efficiency against *L. amazonensis* and *L. infantum chagasi* species in their promastigote forms. It's worth noting that derivative 18 showed selectivity towards the species causing VL. Thus, advancements in research with purpurogallin and its derivatives are crucial for formulating a safe and effective prototype against this parasitosis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Dr. Prof. Celso Amorim Câmara and MSc. Iasmin Lucas da Silva for supporting the research and providing the synthetic derivatives of purpurogallin. Similarly, they extend their gratitude to Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos for kindly providing the strains of *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) and to Dr. Valéria de Matos Borges da Gonçalo Moniz for providing the *L. chagasi* species (MCAN/BR/89/BA262). The authors also express their appreciation to FAPEAL. Additionally, the authors would like to thank UFAL and colleagues who contributed to the research.

FINANCIAL SUPPORT

This research was funded by the Research Support Foundation of the State of Alagoas – FAPEAL (E:60030.0000000862/2022) and Federal University of Alagoas – UFAL.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

BRASIL, P. F. et al. (2017). Antiproliferative and ultrastructural effects of phenethylamine derivatives on promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. *Parasitology international*. v. 66, n. 2, p. 47 – 55, 2017. doi: [10.1016/j.parint.2016.11.010](https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.11.010).

CARBALLEIRA, N. M. et al. (2012). First total synthesis of the (±)-2-methoxy-6-heptadecynoic acid and related 2-methoxylated analogs as effective inhibitors of the *Leishmania* topoisomerase IB enzyme. **Pure and Applied Chemistry**. v. 84, n. 9, p. 1867-1975, 2012. doi: [10.1351/PAC-CON-11-10-21](https://doi.org/10.1351/PAC-CON-11-10-21).

CARVALHO, S. H. et al. (2019). American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, p. 380-391, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1111/tmi.13210>.

CRAVENS, A. et al. (2019). Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. **Nature Communications**., v. 10, n. 1, p. 2142, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09848-w>.

EVANS, T. W.; DEHN, W. M. (1930). Organic oxidations by iodic acid. **Journal of The American Chemical Society**, 1930, 52, 3647. <https://doi.org/10.1021/ja01372a031>.

FAMPA, P. et al. (2021). anti-*Leishmania* effects of Volatile Oils and Their Isolates. **Rev. Bras. de Farmacogn.**, v. 31, n. 5, p. 561-578, 2021. <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00146-5>.

KIM, K. et al. (2018). Inhibitory Effect of Purpurogallin on Osteoclast Differentiation in Vitro through the Downregulation of c-FOS and NFATc1. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 2, p. 601, 2018. [doi: 10.3390/ijms19020601](https://doi.org/10.3390/ijms19020601).

KOPARDE, A. A. et al. (2019). Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacognosy-medicinal plants**. IntechOpen, 2019. [Doi: 10.5772/intechopen.82860](https://doi.org/10.5772/intechopen.82860).

LAMBA, S.; ROY, A. (2023). Demystifying the potential of inhibitors targeting DNA topoisomerases in unicellular protozoan parasites. **Drug Discov. Today**, p. 103574, 2023. [doi: 10.1016/j.drudis.2023.103574](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103574).

LI, J. et al. (2018). Cell-free synthetic biology for *in vitro* biosynthesis of pharmaceutical natural products. **Synth. Syst. Biotechnol.**, v. 3, n. 2, pág. 83-89, 2018. [doi: 10.1016/j.synbio.2018.02.002](https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.02.002).

MANN, S. et al. (2021). A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. **Curr. Trop. Med. Rep.**, v. 8, p. 121-132, 2021. [doi: 10.1007/s40475-021-00232-7](https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7).

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

PAKOSZ, Z. et al. (2021). Inhibitory compounds targeting *Plasmodium falciparum* gyrase B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 10, p. 10.1128/aac.00267-21, 2021.

POPOV, A. M. et al. (2019). The antioxidant and membrane activities of the Benzotropolone pigment purpurogallin. **Biophysics**, v. 64, p. 543-550, 2019. <https://doi.org/10.1134/S0006350919040171>.

REN, H. et al. (2001). Design, synthesis, and biological evaluation of a series of simple and novel potential antimalarial compounds. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 11, n. 14, p. 1851-1854, 2001.

RODRIGUES, C. A. et al. (2018). 4-Phenyl-1,3-thiazole-2-amines as scaffolds for new antileishmanial agents. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. v. 24, n. 26, 2018. [doi: 10.1186/s40409-018-0163-x](https://doi.org/10.1186/s40409-018-0163-x).

SERAFIM, T. D. et al. (2021). Leishmaniasis: the act of transmission. Trends in Parasitology, v. 37, n. 11, p. 976-987, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.07.003>.

SUNDAR, S.; SINGH B. (2018). Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. **Expert Opin Ther Targets**. 2018 Jun;22(6):467-486. doi: 10.1080/14728222.2018.1472241.

10. 3. APÊNDICE C

Avaliação leishmanicida de produtos naturais da *Abarema cochliacarpus* (Gomes 1803) Barneby & Grimes 1996 (Barbatimão)

Camilla Amanda de Oliveira Gomes^{1,4}, <https://orcid.org/0009-0001-3052-8645>

Stella Freitas de Queiroz^{2,3}, <https://orcid.org/0009-0003-2228-9562>

Francis Soares Gomes³, <https://orcid.org/0000-0003-1346-3162>

Alysson Wagner Fernandes Duarte⁵, <https://orcid.org/0000-0001-9626-7524>

Magna Suzana de Alexandre Moreira^{1,4}, <https://orcid.org/0000-0002-9979-1994>

Aline Cavalcanti de Queiroz^{1,3,5*}, <https://orcid.org/0000-0002-6362-2726>

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Química e Biologia Celular, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Brasil.

³Laboratório de Metabolismo e Proteômica, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Brasil.

⁴Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Brasil.

⁵Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Médicas e de Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Brasil.

***Autor Correspondente:** Aline Cavalcanti de Queiroz

Phone: +55 (82) 99669-7317. E-mail: aline.queiroz@arapiraca.ufal.br

Federal University of Alagoas, *Campus* Arapiraca, Alagoas, Brazil. CEP 57309-005.

Suporte financeiro: Esse trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à pesquisa (60030.0000000161/2022; 60030.0000000862/2022).

Conflito de interesses: Os autores declaram que não existe conflito de interesses em relação à pesquisa realizada.

Resumo

Introdução: A utilização de produtos naturais é utilizada a décadas pela sociedade para diversos problemas de saúde humana. A *Abarema cochliacarpus* (Gomes, 1803) Barneby & Grimes 1996, conhecida popularmente como barbatimão, contém proteínas lectinas, que podem desempenhar atividades farmacológicas. Atualmente, parasitoses como a leishmaniose acarretam em um alto índice de letalidade e as farmacoterapias atuais demonstram diversas limitações graves, com isso, a busca por novos protótipos é essencial para a erradicação dessa enfermidade.

Objetivo: Dessa maneira, o presente estudo procura investigar por intermédio de ensaios farmacológicos *in vitro* o potencial leishmanicida e ação citotóxica em células hospedeiras da linhagem J774.A1 (macrófagos) de produtos naturais derivados da entrecasca de *Abarema cochliacarpus*.

Métodos: A citotoxicidade dos extratos e da proteína parcialmente isolada foram avaliadas em macrófagos da linhagem J774.A1 através de ensaio colorimétrico MTT em diferentes concentrações (100, 30, 10, 3, 1, 0,3 µg/mL). A ação leishmanicida foi averiguada na forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*, através de leitura em microscópio óptico, posteriormente os dados foram implementados no GraphPad Prism 8 para análise estatística.

Resultados: Os derivados naturais da *Abarema cochliacarpus* não demonstra toxicidade nas células hospedeiras J774.A1 (macrófagos) e não foram ativas em ambas as cepas de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi* na maior concentração testada.

Conclusão: Portanto, pesquisas com os derivados das entrecasas de *A. cochliacarpus* são necessárias para o isolamento e purificação total da proteína lectina, e posterior avaliação da atividade leishmanicida, isolamente.

Palavras-chave: Barbatimão, Extratos, Lectinas.

Introdução

A leishmaniose é uma parasitose que se enquadra como uma Doença Tropical Negligenciada (DNTs) em que a pobreza, desnutrição e falta de investimento na saúde pública, contribuem para a proliferação do vetor e aumento no número de infecções. Na América Latina, o território brasileiro continua sendo um dos principais países com maiores registros de casos dessa doença, em que as formas sistêmicas são a leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar, essa última manifestação clínica se subdivide em leishmaniose cutânea (LC) e mucocutânea (LCM).^(1,2)

Atualmente, existem alguns fármacos utilizados para a eliminação do parasito, como o antimoniato de meglumina, anfotericina B, pentamidina, paramonicina e miltefocina. Todavia, esses medicamentos apresentam diversas limitações e a escolha terapêutica para a leishmaniose depende de vários fatores associados ao vetor-hospedeiro, como a resistência do protozoário, efeitos colaterais, alto custo, acessibilidade limitada e coinfeções com outras doenças.⁽³⁾

O investimento financeiro do governo e interesse das grandes empresas farmacêuticas, são escassos ao contrapor com os índices de mortalidades parasitose. Portanto, a busca por novos protótipos contra o gênero *Leishmania*, é imprescindível para a erradicação da enfermidade, diante disso, as pesquisas por produtos naturais vêm se ampliando para solucionar as deficiências encontradas na farmacoterapia atual contra a leishmaniose.^(4,5)

Produtos naturais são utilizados há séculos na medicina popular por seus diversos compostos bioativos que desempenham benefícios farmacológicos para os homens e animais, várias estruturas vegetais como folhas, caules e raízes podem conter biomoléculas com potenciais

terapêuticos, assim, sendo alternativas viáveis para investigação de protótipos e formulação de fitoterápicos eficazes contra diferentes patologias.⁽⁶⁾

A espécie *Abarema cochiliacarpus* (GOMES 1803) BARNEBY & GRIMES 1996 é uma árvore endêmica da Caatinga e Cerrado brasileiro, é conhecida popularmente como barbatimão e suas propriedades medicinais são exploradas por seus inúmeros benefícios como ação anti-inflamatória, antitumoral, antiparasitária, antimicrobiana, entre outros potenciais farmacêuticos que são desempenhados por estruturas químicas como flavonoides, terpenos, estilbenos, taninos e metabólitos secundários como as lectinas.⁽⁷⁻⁹⁾

As proteínas lectinas, podem ser encontradas em organismos vegetais ou animais, são biomoléculas não imunes, que contém diferentes estruturas moleculares, químicas e biofísicas, podendo se ligarem a carboidratos presentes nas superfícies celulares. Dessa forma, desempenhando atividades biológicas como hemaglutinante,⁽¹⁰⁾ anticancerígeno,⁽¹¹⁾ antimicrobiano,⁽¹²⁾ antifúngico,⁽¹³⁾ antiparasitária.⁽¹⁴⁾

Portanto, o objetivo da pesquisa é avaliar a atividade leishmanicida de produtos naturais derivados da *Abarema cochiliacarpus* (Gomes 1803) Barneby & Grimes 1996 em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*.

Métodos

Obtenção da espécie e preparo das amostras

A lectina foi isolada, caracterizada e purificada parcialmente pelo Laboratório de Metabolismo e Proteômica (LAMP) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). A *A. cochiliacarpus* foi coletada na reserva ambiental de Mata Atlântica na cidade de Coruripe – Alagoas. A espécie vegetal foi identificada no Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA).

Em seguida, foi conduzida até o Laboratório de Metabolismo e Proteômica, onde foi realizado o preparo do extrato bruto, extrato bruto filtrado e purificação parcial da proteína lectina por cromatografia em matriz de quitina. Posteriormente, a avaliação citotóxica e leishmanicida dos derivantes, foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) da Universidade Federal de Alagoas.

Manutenção de macrófagos J774.A1

A manutenção das células da linhagem J774.A1 (macrófagos) foram realizadas com meio RPMI suplementado com L-glutamina, piruvato, aminoácidos não essenciais, 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37°C com 95% de umidade e 5% CO₂.

Ensaio de citotoxicidade dos compostos na linhagem J774.A1

Os macrófagos foram plaqueados na concentração de 5×10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas *overnight* em estufa a 37°C, 7% de umidade e 5% de CO₂. Em seguida, foram removidos os sobrenadantes dos poços e posteriormente foram distribuídas as amostras em triplicata diluídas em meio RPMI nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 Mg/mL em um volume de 200 µL/poços e reincubadas por 48h. Os poços controles foram células cultivadas somente com meio de cultura ou células cultivadas na presença do diluente dos derivados (Tampão fosfato). A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico de MTT⁽¹⁵⁾ realizando a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular dos macrófagos tratados com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle que receberam o meio RPMI.

Cultivo das espécies de *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis*

As espécies do parasito *Leishmania*, foram cultivadas nas formas promastigotas em meio Schneider's (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2mM de L-glutamina e 2% de urina humana estéril e incubados em uma incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) a 27°C.

Ensaio citotóxico dos extratos nas espécies do parasito *Leishmania*.

Os parasitos foram centrifugados e ressuspensos em 1 mL de meio Schneider para obter uma concentração de 1×10^5 parasitos/mL. Em seguida, foram distribuídos 100µL dessa suspensão em placa de 96 poços e posteriormente o tratamento diluído (100, 30, 10, 1, 3 e 0,3 mg/mL) foi adicionado sobre os parasitos em triplicatas. Assim como, o fármaco padrão de anfotericina B (100 a 0,001 µM) e o controle de veículo tampão fosfato (0,1%) preparadas em meio Schneider suplementado, para alcançar um volume final de 200µL por poço. A placa então foi incubada em estufa BOD a 27°C por 48 horas. O número de promastigota foi determinado utilizando câmara de Neubauer em microscópio óptico. A inibição causada por

cada extrato foi expressa como uma porcentagem em relação às células cultivadas apenas na presença do veículo tampão fosfato.

Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos no ensaio *in vitro* foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) e testes post-hoc de Tukey, utilizando o GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA Statistical). Os dados foram considerados significativos quando $*p > 0,05$, $**p > 0,01$, $***p > 0,001$ e $****p > 0,0001$ em relação ao diluente dos extratos em Tampão Fosfato.

Resultados

Avaliação da citotoxicidade dos compostos naturais em J774.A1 e nas cepas do parasito *Leishmania*

Foi analisada a citotoxicidade de extrato bruto, extrato bruto filtrado e de proteína semi-isolada da *A. cochliacarpus* sobre as células hospedeiras (macrófagos da linhagem J774.A1), os resultados podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 – Efeito citotóxico dos produtos naturais da *Abarema cochliacarpus* sobre macrófagos da linhagem J774.A1 durante 48 h.

Tratamento	IC ₅₀ ± EP ^a	Citotoxicidade Máxima (%±EP) ^b
Anfotericina B	69,70 ± 6,14 µM	66,17 ± 1,00****
Extrato Bruto	>100 µg/mL	Não citotóxico
Extrato Bruto Filtrado	>100 µg/mL	Não citotóxico
Proteína dialisada	>100 µg/mL	Não citotóxico

^aConcentração inibitória de 50% ± erro padrão do efeito máximo na cepa J774.A1, calculada usando curvas concentração-resposta. ^bMédia ± erro padrão do efeito máximo na viabilidade de J774.A1, triplicado de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram significativos quando $****p < 0,0001$ em comparação com o grupo de tampão fosfato de sódio 0,2 M PH 7.

Os produtos da *A. cochliacarpus* apresentam resultados promissores frente as células hospedeiras de macrófagos J774.A1 em experimento *in vitro*. O extrato bruto, extrato bruto

filtrado e proteína semi-isolada não demonstram citotoxicidade e o valor do $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ao comparar com meio RPMI e tampão fosfato (controle veículo).

O fármaco padrão apresenta maior citotoxicidade ($IC_{50} = 69,70 \mu\text{M}$), demonstra assim, uma vantagem dos derivados naturais testados. Igualmente, foi avaliada a atividade leishmanicida dos produtos naturais sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*, os resultados podem ser contemplados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Potencial anti-*Leishmania in vitro* dos derivados naturais da *Abarema cochliacarpus* contra as formas promastigotas da espécie *L. amazonensis*.

Tratamento	$IC_{50} \pm EP^a$	Citotoxicidade Máxima ($\% \pm EP$) ^b
Anfotericina B	$0,92 \pm 0,04 \mu\text{M}$	$92,80 \pm 1,90^{****}$
Extrato Bruto	$>100 \mu\text{g/mL}$	Não Ativo
Extrato Bruto Filtrado	$>100 \mu\text{g/mL}$	Não Ativo
Proteína dialisada	$>100 \mu\text{g/mL}$	Não Ativo

^aConcentração inibitória de 50% $\pm$ erro padrão do efeito máximo em promastigota de *L. amazonensis* calculado usando curvas concentração-resposta. ^bMédia $\pm$ erro padrão do efeito máximo sobre a viabilidade promastigota de *Leishmania*, triplicada a partir de um experimento representativo. O efeito máximo os valores foram significativos quando $****p < 0,0001$ comparado ao grupo tampão fosfato. NA: Substância não ativa na concentração máxima testada, em comparação com o veículo tampão fosfato.

Tabela 3 – Potencial anti-*Leishmania in vitro* dos derivados naturais da *Abarema cochliacarpus* contra as formas promastigotas da espécie *L. amazonensis*.

Tratamento	$IC_{50} \pm EP^a$	Citotoxicidade Máxima ($\% \pm EP$) ^b
Anfotericina B	$0,46 \pm 0,42 \mu\text{M}$	$100,00 \pm 0,00^{****}$
Extrato Bruto	$>100 \mu\text{g/mL}$	Não Ativo
Extrato Bruto Filtrado	$>100 \mu\text{g/mL}$	Não Ativo
Proteína dialisada	$>100 \mu\text{g/mL}$	Não Ativo

^aConcentração inibitória de 50% $\pm$ erro padrão do efeito máximo em promastigota de *L. infantum chagasi* calculado usando curvas concentração-resposta. ^bMédia $\pm$ erro padrão do efeito máximo sobre a viabilidade promastigota de *Leishmania*, triplicada a partir de um experimento representativo. O efeito máximo os valores foram significativos quando $****p < 0,0001$

comparado ao grupo tampão fosfato. NA: Substância não ativa na concentração máxima testada, em comparação com o veículo tampão fosfato.

Os produtos obtidos da *A. cochliacarpus* não foram ativos ao serem testados na forma promastigota das espécies *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi* em nenhuma das concentrações avaliadas ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$).

Discussão

Estudos comprovam a atividade de lectinas vegetais, como a pesquisa do autor Carneiro⁽¹⁶⁾ que valida a ação leishmanicida de lectina isolada da semente da *Parkia pendula* em cepa de *L. infantum chagasi in vitro*.

Essa glicoproteína também foi isolada da casca de amendoim da espécie *Arachis hypogea* L. e avaliada sua atividade anti-*Leishmania*, evidencia-se uma inibição considerável no crescimento de amastigotas em macrófagos murinos em espécie de *Leishmania* spp.⁽¹⁷⁾ Outra biomolécula da família foi isolada do látex da planta *Synadenium carinatum* e submetida a avaliada sua atividade leishmanicida por 48 e 72h em *L. amazonensis*, demonstrando redução na carga parasitária ao contrapor com o controle de meio RPMI.⁽¹⁸⁾

A concanavalina-A (Con-A) é uma lectina isolada da *Canavalia ensiformis*, popularmente conhecida como feijão de porco, a molécula foi testada em amastigota indireta da espécie *L. amazonensis*, resultando em um potencial indutor na produção de ROS e ativação do perfil Th1, assim induzindo a morte do parasito.⁽¹⁹⁾

Entretanto, a presença de vários metabólitos secundários presentes em extratos vegetais, como os terpenos e taninos, pode influenciar na atividade isolada de uma biomolécula específica, por esses compostos interagem entre si de maneira aditiva ou sinérgica.⁽²⁰⁾ As estruturas químicas secundárias não desempenham uma função metabólica determinada, são distribuídas em várias espécies vegetais e animais, assim como suas composições estruturais variadas levam à ideia de serem produtos residuais.⁽²¹⁾

Acredita-se que, a complexidade de moléculas presentes nos extratos da *A. cochliacarpus* podem ter influenciado diretamente na atividade da proteína lectina semi-isolada e na sua ação antiparasitária, sobre as cepas de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*.

Portanto, os produtos naturais da *A. cochliacarpus* não foram citotóxicos para macrófagos, no entanto também não apresentaram atividade leishmanicida contra ambas as espécies avaliadas. Pesquisas futuras são necessárias para realizar a purificação total da proteína lectina, assim como analisar sua bioatividade isoladamente.

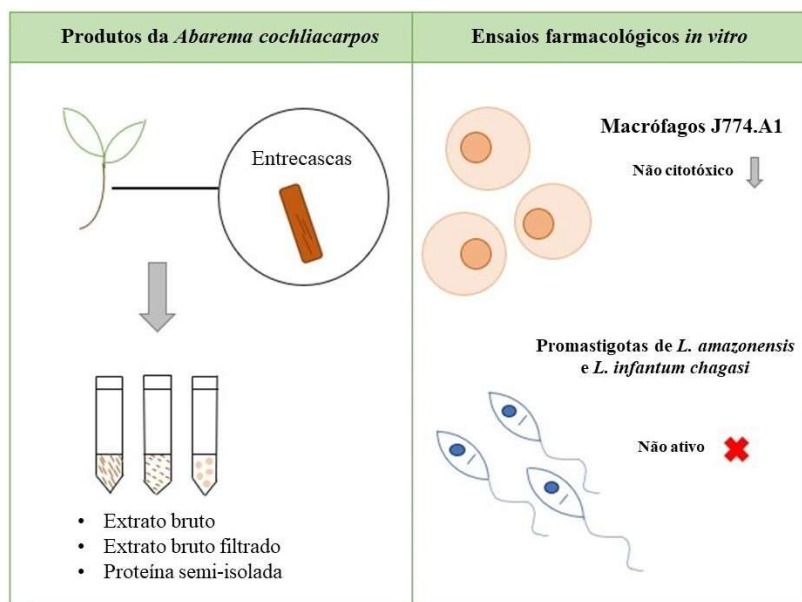


Figura 1 – Obtenção e avaliação do potencial leishmanicida dos derivados da *Abarema cochliacarpus*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Prof. Francis Soares Gomes e Me. Stella Farias de Queiroz pelo apoio na pesquisa e fornecimento dos derivados de *Abarema cochliacarpus*. Os autores agradecem ao Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos pela gentileza de fornecer os promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), à Dra. Valéria de Matos Borges da Gonçalo Moniz pelo fornecimento de *L. chagasi* (MCAN/ BR/89/BA262). Os autores agradecem também à CAPES, CNPq, MCTC, FINEP, INCT-INOVAR e FAPEAL. Além disso, os autores também gostariam de agradecer à UFAL e aos colegas que contribuíram e auxiliaram na pesquisa.

Referências

1. Organização pan-americana da saúde. Leishmanioses: Relatório Epidemiológico das Américas – OPAS. 2022 [Acesso 01/09/2023]. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56832>.
2. Costa-da-Silva AC, Nascimento DO, Ferreira JRM, Guimarães-Pinto K, Freire-de-Lima L, Morrot A, *et al.* Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2022;7(4):54. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>.
3. Prasanna P, Kumar P, Kumar S, Rajana VK, Kant V, Prasad SR, *et al.* (2021). Current status of nanoscale drug delivery and the future of nano-vaccine development for leishmaniasis – A review. *Biomed. Pharmacother.* 2021;141:111920. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111920>.
4. Barrenho, E, Miraldo M, Smith PC. Does global drug innovation correspond to burden of diseases? The neglected diseases in developed and developing countries. *Health Economics.* 2018;28(1):123-143, DOI: <https://doi.org/10.1002/hec.3833>.
5. Gervazoni LFO, Barcellos GB, Ferreira-Paes T, Almeida-Amaral EE. Use of natural products in leishmaniasis chemotherapy: An overview. *Front. Chem.* 2020;8:579891. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.579891>.
6. Fernandes BF, Gonçalves HR, Guimarães MR, Alves AA, Bieski IGC. Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal. *SAJES.* 2019;5(9):16-22 [acesso 01/09/2023]. Disponível em: <https://revista.ajes.edu.br/index.php/sajes/article/view/302>.
7. Fonseca SA, Costa JRM, Gomes NRS, Cunha AL, Da Costa JG, Matos-Rocha TJ, *et al.* Antioxidant and cicatrizing activity of the species *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & J. W. Grimes. *AJPP.* 2019;13(14):170-180. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJPP2019.4996>.
8. Santos LS, Andrade CS, Da Silva CTL, Santana RA, Borges JMP. Pharmacological and toxicological aspects of barbatimão (*Abarema cochliacarpus* (GOMES) Barneby & J. W. Grimes). *Int. j. adv. eng. res. sci.* 2021;8(8):504-511. DOI: <https://dx.doi.org/10.22161/ijaers.88.57>.
9. Dos Santos PAL, Dos Santos LC, Costa RA, Estevam AS, Da Silva MRP, Reis IAO, *et al.* Chemical profile and antimicrobial activity of *Abarema cochliacarpus*. *Res. Soc. Dev.* 2022;11(4):e22911427226-e22911427226, 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27226>.

10. Awuchi CG, Udeogu E, Amagwula IO. Hemagglutinin Activities of Lectin Extracts from Selected Legumes. Food Sci. Technol. 2020;1-13. DOI: [10.13140/RG.2.2.26051.02082](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26051.02082).
11. Dent M, Mayer KL, Garcia NV, Guo H, Kajiura H, Fujiyama K, *et al.* Impact of glycoengineering and antidrug antibodies on the anticancer activity of a plant-made lectin-Fc fusion protein. Plant Biotechnol. J. 2022;20(11):2217-2230. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.13902>.
12. De Souza Silva VC. (2022). Avaliação do efeito do extrato aquoso, fração proteica e lectina das sementes de *Moringa oleifera* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Health Res. 2022;3(4):951-958 [Acesso 01/09/2023]. Disponível em: <https://ojs.europubpublications.com/ojs/index.php/ejhr/article/download/524/529>.
13. Mohsen SFE, Abbassy MA, Rabea EI, Abou-Taleb HK. Isolation and antifungal activity of plant lectins Against some plant pathogenic fungi. ASEJ. 2018;39:161-167. DOI: [10.21608/asejaiqjsae.2018.5872](https://doi.org/10.21608/asejaiqjsae.2018.5872).
14. Aranda-Souza MA, De Lorena VMB, Correia MTS, De Figueiredo RCBQ. In vitro effect of *Bothrops leucurus* lectin (BLL) against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* infection. Int. J. Biol. Macromol. 2018;120:431-439. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.064>.
15. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 1983;65:55-63. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
16. Carneiro RF, Aguiar ES, Santos V, Dos Santos ALE. Elucidation of the primary structure and molecular modeling of *Parkia pendula* lectin and *in vitro* evaluation of the leishmanicidal activity. Process. Biochem. 2021;101(6):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.004>.
17. Srinivasan S, Raja MRC, Kar A, Ramasamy A, Jayaraman A, Vadivel V, *et al.* (2023). Partial characterization of purified glycoprotein from nutshell of *Arachis hypogea* L. towards macrophage activation and leishmaniacidal activity. **Glycoconj J.** 2023;40(1):1-17. DOI: [10.1007/s10719-022-10096-2](https://doi.org/10.1007/s10719-022-10096-2).
18. Afonso-Cardoso SR, Silva CV, Ferreira MS, Souza MA. Effect of the *Synadenium carinatum* látex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. Exp. Parasitol. 2011;128(1):61-67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.006>.

19. Thomazelli APFS, Tomiotto-Pellissier F, Miranda-Sapla MM, Da Silva SS, Alvarenga DS, Panis C, *et al.* Concanavalin-A displays leishmanicidal activity by inducing ROS production in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2018;40(5):387-392.
DOI:<https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1510960>.
20. Boate UR, Abalis OR. Review on the bio-insecticidal properties of some plant secondary metabolites: types, formulations, modes of action, advantages and limitations. *Asian J. Res. Zool.* 2020;3(4):27-60,
DOI:<https://doi.org/10.9734/ajriz/2020/v3i430099>.
21. SWAIN, T. Secondary compounds as protective agents. *Revista Anual de Fisiologia Vegetal.* 1977;28(1):479-501,
DOI:<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.28.060177.002403>.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não existe conflito de interesse.

Contribuição dos autores

Conceituação e pesquisa: Camilla Amanda de Oliveira Gomes

Metodologia: Camilla Amanda de Oliveira Gomes e Stella Freitas de Queiroz.

Curadoria de dados: Francis Soares Gomes.

Análise formal: Alysson Wagner Fernandes Duarte.

Administração do projeto: Aline Cavalcanti de Queiroz e Magna Suzana Alexandre Moreira.

Supervisão e revisão: Aline Cavalcanti de Queiroz.

10. 4. APÊNDICE D

NEW THERAPEUTIC STRATEGIES FOR AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS: A PATENT REVIEW

Shakira Cavalcante de Albuquerque Ferreira^{1,2}, Camilla Amanda de Oliveira Gomes^{2,3}, Márcio Thomaz Márcio Thomaz dos Santos Varjão^{2,4}, Lilyana Waleska Nunes Albuquerque², Hilda Caroline do Nascimento Santos³, Andressa Letícia Lopes da Silva^{2, 3}, Anderson Brandão Leite², Alysson Wagner Fernandes Duarte⁵, Aline Cavalcanti de Queiroz^{2,3,5}, Magna Suzana Alexandre Moreira^{1,2,3,4,*}

¹Postgraduate Program in Translational Neuroscience, Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²Pharmacology and Immunology Laboratory, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas - UFAL / Campus A.C. Simões, Maceio, AL,

Brazil.

³Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas-UFAL/ Campus A.C.Simões, Maceió, AL, Brazil.

⁴Postgraduate Program in Health Sciences, Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas-UFAL/ Campus A.C.Simões, Maceió, AL, Brazil.

⁵Microbiology, Immunology and Parasitology Laboratory, Medical and Nursing Sciences Center, Federal University of Alagoas - UFAL / Campus Arapiraca, Arapiraca, AL, Brazil.

***Corresponding Author**

Magna Suzana Alexandre-Moreira, suzana.magna@gmail.com

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease caused by flagellate protozoa. Despite the many cases, the available therapeutic arsenal needs to be improved and more toxic. Faced with this problem, the present work aimed to review patents that describe new treatments for tegumentary leishmaniasis in the last five years. The search for patent documents was searched by the European Patent Office, Google Patents, National Institute of Industrial Property, The LENS, United States Patent and Trademark Office and World Intellectual Property Organization. Thirteen patents were selected according to the criteria of the work. According to the results, in 2017 there was the highest number of published patents. The country that most published patents related to the search for new treatments for tegumentary leishmaniasis was Brazil. Thus, given results, it was observed that there are new works that see new works the *Leishmania* parasite, but advances in research are still necessary to obtain a less toxic and more accessible drug for leishmaniasis.

1. INTRODUCTION

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by several species of the genus *Leishmania*, transmitted through the blood meal of sandflies (VALERO; URIARTE, 2020). Endemic in 102 countries, this disease mainly affects communities living under low-income conditions and has been growing in urban areas due to disorderly geographic expansion (BORGES et al, 2022).

Leishmaniasis presents a wide variety of clinical manifestations related to the parasite's different species. Clinical forms can be divided into tegumentary leishmaniasis and visceral leishmaniasis. The tegumentary condition is characterized by the involvement of the skin and mucous membranes, and the visceral form is the most severe and lethal (ABADÍAS-GRANADO et al, 2021; SASIDHARAN, SAUDAGAR, 2021).

The therapeutic arsenal currently available for leishmaniasis is very outdated. The conventional treatment uses pentavalent antimonials as the first choice and amphotericin B, pentamidine, and miltefosine as the second choice (ROATT, 2020). However, the administration of these drugs has limitations, such as high cost, induction of parasite resistance, and severe adverse effects (GHORBANI; FARHOUDI, 2017). Faced with this problem, the academic community is looking for new substances that are safer for the treatment of leishmaniasis.

New chemotherapeutic and herbal medicines are continuously investigated in relation to their leishmanicidal potential, with the aim of developing new, safer and more effective drugs for this neglected disease (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018; HASSAN et al, 2022). The present work is a review of the patents that describe the search for new treatments against American tegumentary leishmaniasis between 2017 and 2021.

2. MATERIALS AND METHODS

The present study was carried out through the search for patent records and deposits between the months of April and August 2022. The following technological bases were used for the search process: European Patent Office (EPO), Google Patents, National Property Institute Industrial (INPI), The LENS, United States Patent

and Trademark Office (USPTO) and World Intellectual Property Organization (WIPO).

The patent search was conducted using eight combinations of keywords in English using the Boolean operator “AND” (Table 1). The combinations “American cutaneous leishmaniasis AND new drugs”, “American cutaneous leishmaniasis AND new treatments”, “*Leishmania braziliensis* AND new drugs,” and “*Leishmania braziliensis* AND new treatment” were excluded from the search due to the large number of patents found and which were outside of the objective of the work.

This study’s inclusion criteria were patents describing new treatments for American tegumentary leishmaniasis in the last five years (2017-2021). The exclusion criteria were patent documents that addressed new treatments for visceral leishmaniasis or for the species that cause this form of the disease.

Table 1. Keyword combinations used in patent searches

Keyword 1	Boolean operator	Keyword 2
“American cutaneous leishmaniasis”	AND	“new drugs”
“American cutaneous leishmaniasis”	AND	“new treatments”
“ <i>Leishmania amazonensis</i> ”	AND	“new drugs”
“ <i>Leishmania amazonensis</i> ”	AND	“new treatments”
“ <i>Leishmania braziliensis</i> ”	AND	“new drugs”
“ <i>Leishmania braziliensis</i> ”	AND	“new treatments”
“ <i>Leishmania guyanensis</i> ”	AND	“new drugs”
“ <i>Leishmania guyanensis</i> ”	AND	“new treatments”

After selecting the patent documents, the variables temporal distribution, geographic distribution in relation to the continents and countries in which the patents were published were analyzed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Selection of patent documents according to search criteria

Initially, a search was performed with all combinations of keywords in the databases. A total of 118,185 patents were found. Due to the large number of patent documents found that did not fit the search criteria, it was necessary to carry out a second stage of searches. In the second stage, four combinations of keywords were used, totaling 4,887 patents, which were selected according to the eligibility criteria (Table 2).

Table 2. Number of patents found in the database

Search terms	INPI	Google patentes	WIPO	The Lens	EPO	USPTO	TOTAL
American cutaneous leishmaniasis AND new drugs	0	14.410	6.359	1.887	602	0	23.258
American cutaneous leishmaniasis AND new treatments	0	58.077	6.569	1.945	500	0	67.091
<i>Leishmania amazonensis</i> AND new drugs	0	194	960	237	76	37	1.504
<i>Leishmania amazonensis</i> AND new treatments	0	222	1.093	248	62	3	1.628
<i>Leishmania braziliensis</i> AND new drugs	0	4.981	3.851	1.650	616	2	11.100
<i>Leishmania braziliensis</i> AND new treatments	0	5.006	4.263	1.823	753	4	11.849
<i>Leishmania guyanensis</i> AND new drugs	0	101	569	134	34	3	841
<i>Leishmania guyanensis</i> AND new treatments	0	115	632	140	27	0	914
Total	0	83..106	24.296	8.064	2.670	49	118.185

During the database search, many patents related to new treatments for tegumentary leishmaniasis were observed. Thus, it can be inferred that the academic community has been seeking new treatment alternatives for this disease. Thus, after completing the search, refinement and exclusion of patents that did not fit

the scope of the research, out of the 4,887, 13 patent documents were selected for the review construction (Table 3).

Table 3. Selected patent documents

Title	Patent number	IPC	Inventors	Country	Publication year
Compounds for treating parasitic infections	US 2019/0152938 A1	C07D 307/90 C07D 417/12 C07D 405/12 C07D 307/87 C07C/ 237/40 A01N 43/78 A01N 43/40 A01N 43/12 A01N 37/22 A61K 31/343	Hamza et al.	United States	2019
Synthesis and use of amine-containing flavonoids as potent anti-leishmanial agents	US 9562037 B2	C07D 311/30 C07D 405/12 C07D 405/14 C07D 405/14 A61K 31/352 A61K 31/4433 A61K 31/4439 A61K 31/444 A61K 31/4545 A61K 31/496 A61K 31/551 A61K 45/06	Chow et al.	Hong Kong	2017
Dronedarone for use in leishmaniasis, formulations and associations for use in leishmaniasis	US 9700540 B2	A61K 31/34 A61K 31/343	Beilles et al.	France	2017
Cream formulation with amphotericin B and oil in water useful for topical application to mucous tissue and skin against disease produced by leishmaniasis	US 9801895 B1	A61K 31/7048 A61K 9/06	Velez- Bernal et al.	Colombia	2017

Topical Compositions For The Treatment Of Cutaneous Leishmaniasis	WO 2019/043212 A1	A61K	Auclair et al.	Switzerland	2019
Amines derived from 2-benzyl-5-nitroindazole with antiprotozoal proprierts against Trypanosoma, Leishmania and Trichomonas	WO2019077174A1	C07D 231/56 A61K 31/416 A61P 33/02	Escario García-Trevijano et al.	Spain	2019
Topical pharmaceutical formulation	WO2018185685A1	A61K 9/00 A61K 31/155 A61K 31/661 A61K 31/4164 A61K 31/496 A61K 31/4965 A61P 33/02	Carreño García et al.	Colombia	2018
Combination, pharmaceutical composition, medicament, method for treating leishmaniasis and use of the composition	WO2018152602A1	A61K 38/17 A61K 31/7048 A61K 31/155 A61K 31/29 A61K 31/7036 A61K 31/685 A61P 33/02	Silva et al.	Brazil	2018
An Immunotoxin for use in the treatment of leishmaniasis	US20170369574A1	C07K16/28 C12N9/10 C12N9/24 A61K39/00	Barth et al.	Germany	2017
Novel antiparasitic compounds and methods	WO2021077102A1	A61K31/195 A61K31/517 C07D403/04	Wetzel et al.	United States	2021

PHARMACEUTICAL COMPOSITION WITH SEAWEED DERIVED FRACTIONS AND THEIR USE AS A LEISHMANICID E AGENT	BR 102019018113-3 A2	A61K 36/02; A61K 2236/00; A61P 33/02	SANTOS et al	Brazil	2021
PROCEDURE FOR OBTAINING, FORMULATING STANDARDIZED EXTRACTS, FRACTION AND ISOLATED SUBSTANCES FROM BRAZILIAN BEE GEOMPROLIS AND ITS USE AS A LEISHMANICID E AGENT	BRPI 1103291-0 A2	A61K 35/644; A61P 33/02	Dutra; Guerra; Ribeiro	Brazil	2018

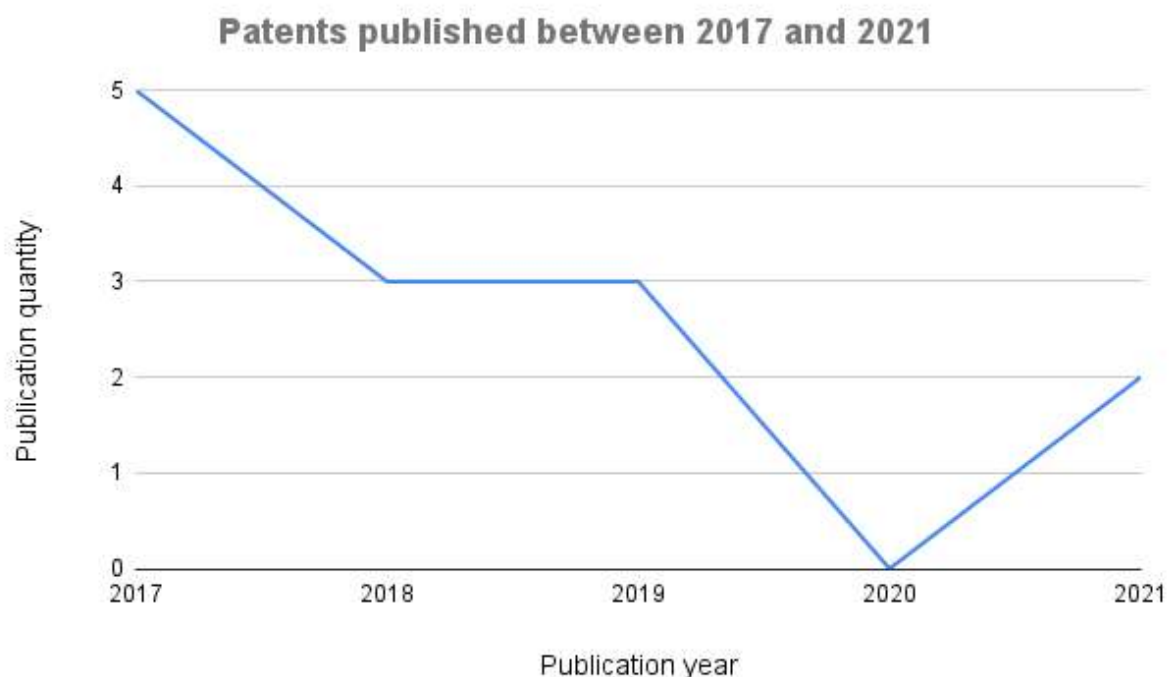
407 AND 8-HYDROXYCHINOLIN THERMORREVERSIBLE MICELAR SYSTEM, METHOD OF OBTAINING, PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USES	BR 102015032488-0 A2	A61K 9/107; A61K 47/10; A61K 31/47; A61P 33/02	Coelho et al	Brazil	2017
--	----------------------------	---	--------------	--------	------

3.2 Temporal distribution of patent documents on new treatments for tegumentary leishmaniasis.

The temporal distribution of the selected patent documents was carried out according to the year of publication between 2017 and 2021. In 2017, 5 patents related to new treatments for tegumentary leishmaniasis were published. The following year, there was a decrease in the number of publications, totaling 3 patents. In 2019, there was a tie compared to the previous year, totaling 3 documents. Of the patents selected for the present work, no publication was observed in 2020, and only 2 patents were in 2021 (Figure 1).

The coronavirus pandemic explains the drastic decrease in the publication of patents related to neglected tropical diseases, especially in 2020. According to the 2021 G-finder report, funding for research and development of neglected diseases fell by about 4% compared to 2019, a record year. A significant impact caused by Covid-19 was the development of clinical trials, with a decrease of US\$ 124 million in 2020, which reflects a 10% decrease in all sectors.

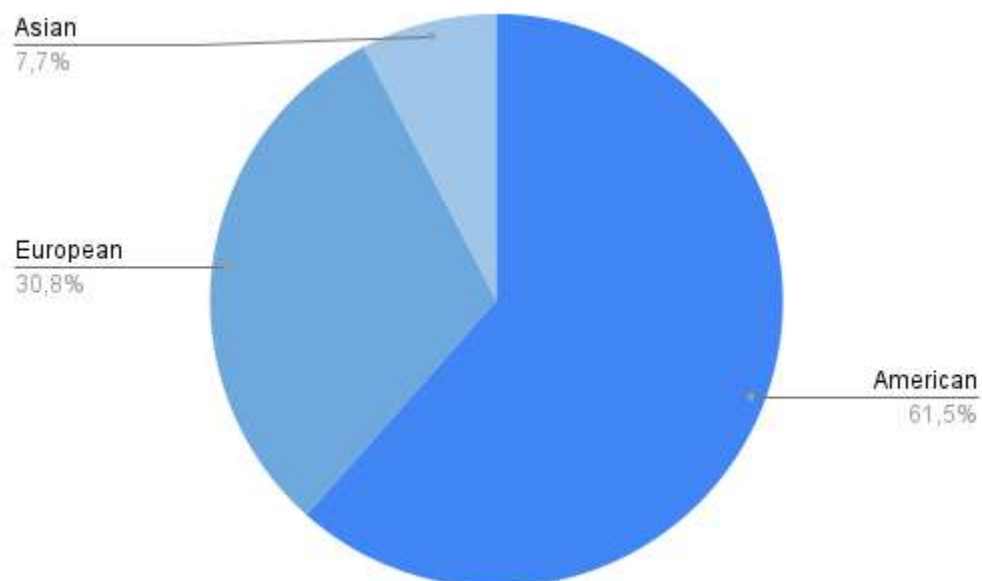
Figure 1. Annual distribution of published patents on new treatments for tegumentary leishmaniasis.



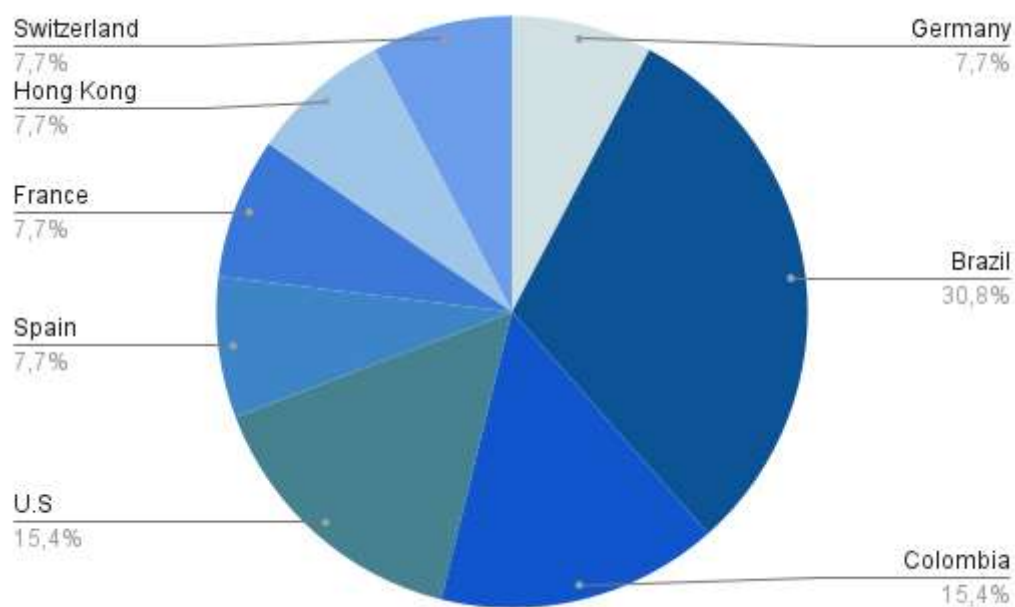
3.3 Geographic distribution

An analysis of the geographic distribution of patents was performed based on the continents and countries of publication of the 13 patents selected for this review. From the point of view of continental distribution, the American continent obtained the highest percentage of publications between the years 2017 and 2021, totaling 61.5% (8 patents). The European continent obtained 30.8% publication retention, corresponding to 4 patent documents. In addition, the Asian continent had a smaller percentage, 7.7% (Figure 2).

The selected patents are from eight countries, namely Germany, Brazil, Colombia, the United States, Spain, France, Hong Kong, and Switzerland. Brazil was the country that led the filing of patents on new treatments for tegumentary leishmaniasis, totaling 4 patents (30.8%). The Brazilian leadership in publishing patents can be explained by the search for new treatments for American tegumentary leishmaniasis since Brazil is an endemic country. In addition, according to data from the Pan American Health Organization, in 2020, the countries that reported the highest number of cases were Brazil (16,432), Colombia (6,161), Peru (4,178), Nicaragua (3,443) and Bolivia (2,059), which together represented 81% of the cases in the Region of the Americas (PAHO 2021). Colombia and the United States had 2 patents published during the patent document selection period. Furthermore, the other countries presented one patent each (Figure 3).

Figure 2. Geographic distribution – continentes

Source: Author, 2022

Figure 3. Geographic distribution – countries

Source: Author, 2022

3.4 Evaluation of International Patent Classification Codes (IPC)

The patents selected for this review have different international patent classification (IPC) codes. Among patent documents, classes A61K and C07D were the most cited, totaling 64.1% and 16.4%, respectively. The first is related to the preparation for medical, dental, and hygienic purposes, and the second is with heterocyclic compounds. Other subclasses were also cited but to a lesser extent. A6P1 presented a total of 4 citations, A01N the same amount as the previous one, and the subclasses C07J and C12N showed two citations each.

The international classification of patents is related to several subjects. This is proven by the diversity of subclasses that a patent document can present. For example, the A6P1 subclass relates to patents that describe therapeutic activities of chemical compounds or pharmaceutical preparations. This subclass reflects some patents selected for the review since it relates the use of chemical compounds as a new search for treatment for leishmaniasis.

3.5 Analysis of patents

Tegumentary leishmaniasis is a disease that affects the skin causing lesions that leave scars that are often permanent and disfigure the patient (NASSIF et al, 2017). Due to these characteristics of the disease, new studies are being carried out to seek an effective treatment, which can be represented by the patents found in this review (Table 4). Some of these patents are focused on developing a topical treatment to combat lesions in the integumentary form of the disease.

In patent document US 9700540 B2, Beilles et al. (2017) demonstrate the use of dronedarone to treat cutaneous leishmaniasis. In this work, three formulations of dronedarone were produced: formulation 5 (aqueous gel), formulation 6 (semi-solid hydrophilic waxy formula), and formulation 7 (water-in-oil emulsion). Initially, in vivo tests were performed in BALB/c mice infected with *L.amazonensis*. Mice were infected in the ear region and topically treated with 20 mg of the formulations once a day for 30 days. When compared with intralesional Glutamine treatment, formulation 5 achieved similar results. Already 6 and 7 induced increased lesions but not the parasite's growth.

In addition to the in vivo experiments, the in vitro leishmanicidal activity of dronedarone formulations against axenic amastigotes and intracellular amastigotes

of *L. amazonensis* was evaluated. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) for axenic amastigotes of dronedarone hydrochloride was $0.34 \pm 0.06 \mu\text{M}$, while the control meglumine antimoniate, miltefosine, and amphotericin B showed IC₅₀ of respectively, $908 \pm 159 \mu\text{M}$, $0.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and $0.031 \pm 0.002 \mu\text{M}$. The IC₅₀ for intracellular amastigotes was $0.50 \pm 0.22 \mu\text{M}$.

In their work, Velez-Bernal et al. (2017) (US 9801895 B1) also developed a topical treatment for cutaneous leishmaniasis. This consists of using a cream based on amphotericin B and a mixture of excipients. The water present in the formulation, when it undergoes an evaporation process, increases the concentration of the drug and helps in the treatment. The evaluation of the therapeutic response of the cream was carried out in vivo in hamsters of the species *Mesocricetus aereates*. The animals were divided into the following groups: cream formulation once a day, twice a day, placebo once a day, and placebo twice a day.

In the research, it was possible to observe that when the cream was used once a day for 15 days, the percentage of cure was 62.5%. When used twice a day, the chances of cure increased to 75%. The effectiveness of meglumine antimoniate was 71%. In addition to cure, it was also observed that topical and placebo formulations did not affect the weight of treated animals when compared to meglumine antimoniate.

Much research has focused on the development of a topical treatment for leishmaniasis. Patent number WO 2019/043212 A1, authored by Auclair et al. (2019), also reports the search for a substance that helps treat this disease. In their work, the use of a ethyl 3-chloroacetamidobenzoate, the flavonoid dihydroquercetin (DHQ), and the sesquiterpene α -bisabolol was reported, aiming at the leishmanicidal activity through the inhibition of the parasite's tubulin and trypanothione peroxidase.

In addition, researchers are also looking for new treatments based on existing drugs on the market, as is the case of the work carried out by Carreño García et al. (2018) (WO2018185685A1). The researchers used a formulation containing pentamidine isethionate (PMD), ketoconazole (KTZ), and miltefosine (MIL). The in vitro tests were carried out with promastigotes of *L. braziliensis*, the combination of KTZ with MIL presented an IC₅₀ of $0.43 \pm 0.18 \mu\text{M}$. Furthermore, toxicity in THP-1 cells and anti-leishmania susceptibility to promastigotes and amastigotes were evaluated. The active agents were KTZ, PMD, and MIL with IC₅₀ of, respectively,

4.36 $\pm$ 1.1, 0.310 $\pm$ 0.5 and 7.4 $\pm$ 1.7 μ M. These active agents also showed a selectivity index > 3 . This is an important fact, as it is verified that there is selectivity for the parasite and may have more significant activity.

One of the ways to combat the parasite *Leishmania* spp. is the production of new substances that act on some molecular target of parasite metabolism to cause inhibition and death of the same. In this context, Hamza et al (2019) (US 2019/0152938 A1) present in their work compounds helpful in inhibiting the membrane heme transport (LHR1) of parasites. Thus, to verify the activity of the compounds, an assay was performed against amastigotes of *L. amazonensis* with incubation for 72 hours with an LHR1 antagonist. It was observed that the compound Cmpd#34 and the antagonist FX40 killed approximately 50% of amastigotes of *L. amazonensis* at the concentration of 10 μ M. The results also showed that the FX40 compound has little or no cytotoxicity against bone marrow-derived macrophages.

New compounds with leishmanicidal activity, soluble in water and orally bioavailable, were presented in patent document US 9562037 B2. The substances consist of modified monomeric flavonoids with an amine function. The monomeric flavonoids FM01, FM02, FM04, FM05, FM06, FM09, FM13, FM014, FM15 and FM17 have an IC₅₀ lower than 5 μ M and show low to moderate toxicity for fibroblasts and RAW264.7. FM09 was the compound with the highest leishmanicidal activity, IC₅₀ 0.3 $\pm$ 0.1 μ M. The index and selectivity for *L. amazonensis* were 63. In addition to causing the parasite's death, the compound FM09 induces the expression of reactive oxygen species (ROS) in a time-dependent manner. Thus, one of the mechanisms of action of this substance can be inferred, at least in part, is related to the increase in ROS, which helps in the intracellular death of the parasite.

Substances derived from animals are also allies in the search for new prototypes of leishmanicidal drugs. Silva et al. (2018) (WO2018152602A1) demonstrated using a combination of crotamine, a toxin from the snake *Crotalus durissus terrificus*, and drugs already used in the treatment of leishmaniasis. Crotamine is a nonapeptide that interacts with human DNA, presenting cellular penetration that helps drug delivery. This invention is based on the premise that crotamine will carry leishmanicidal drugs into the cell and, consequently, will reduce the adverse effects.

Initially, the combinations of crotamine and the drugs pentamidine (P1 and P2), glucantime (G1 and G2), and amphotericin B were performed. Treatments P1

and P2 were not more efficient than pentamidine, with an inhibition percentage of 82.2%, 66.3%, and 90.2%. The combinations A1, A,2 and amphotericin B inhibited *L. amazonensis* promastigotes, in that order, 65.1, 47.2% and 65.2%. Treatments G1, G2 and glucantime resulted in the following inhibition percentages: 65.1%, 47.42% and 65.2%. In addition, the combinations also combat the amastigotes of the species.

Another test performed was the quantification of proteins from inflammatory pathways. J774 cells were infected with *L. amazonensis* promastigotes with standard drugs and their combinations with crothamine. Pentamidine and combinations with this drug-induced phospho NF- κ B inhibition. Amphotericin B and its combinations inhibit NF- κ B p65 and stimulate phospho NF- κ B, SAPK/JUK and I κ B.

The patent filed by Escario García-Trevijano and collaborators (2019), under WO2019077174A1, describes the leishmanicidal activity of three families of amines derived from 5-nitroindazole. From the experiments carried out, it was observed that the 1,2-disubstituted imidazolinones compound 8,9 and 11 and the 3-(alkylamino)indazoles 21, 22, and 24 have high activity against *L. amazonensis* promastigotes when compared to the drug amphotericin B.

Patent number WO2021077102A1 describes the use of new compounds to treat leishmaniasis and other parasites that act on the dynamics of the parasite's tubulin. This work used 400 compounds in the Malaria box to discover new leishmanicidal agents. Among the compounds, the most active was MMV676477, with an EC₅₀ of 510 nM when tested against amastigotes of *L. amazonensis*. Furthermore, MMV676477 promotes the partitioning of the parasite's tubulin into the polymeric form in promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*. Thus, a possible mechanism of action against Leishmania can be inferred.

Natural products and substances from marine organisms are also targets in the search for new leishmanicidal molecules. Patent document BR 102019018113-3 A2, described by Santos et al., 2021 demonstrates the use of seaweed derivatives as leishmanicidal agents. In their study, initially, the crude extract with the solvent ethyl acetate of the seaweed *Prasiola crispa* was used and then fractions were produced. Notably, the fraction called F10 showed leishmanicidal activity against promastigotes of *L. braziliensis*, reducing the metabolic activity and killing the parasite even at the lowest concentration used (6.25 μ g/ml). Furthermore, the fractions do not induce cytotoxicity in human macrophages.

Patent document BRPI 1103291-0 A2 aimed to use extracts, fractions and substances isolated from Brazilian geopropolis from stingless bees as a leishmanicidal agent. Assays against promastigotes of *L. amazonensis* were carried out using geopropolis hydroalcoholic extracts from *Melipona fasciculata* (EHG), ethyl acetate fraction (F-1), hydroalcoholic fraction (F-2) and geopropolis hydroalcoholic extract isolate (IGP). As for the results, the extracts and fractions presented IC₅₀ of, respectively, 47.01, 9.37, <1 and 28, 85µg/mL. Thus, it is possible to observe that geopropolis extracts can be promising in the search for new active substances against the parasite *Leishmania* spp.

The patent document BR 102015032488-0 A2 refers to a thermosensitive micellar system of poloxamer 407 containing the compound 8-hydroxyquinoline for the treatment of leishmaniasis. The products 8-hydroxyquinoline (8-HQN), micellar system (SM) and micellar system incorporated with 8-HQN (SM/8-HQN) were tested against *L. amazonensis* promastigotes. After experimentation, it was verified that the products presented IC₅₀ of, respectively, 0.50±0.20, 10.60±1.50 and 0.08±0.01µg/mL.

In addition to the leishmanicidal assays, the cytotoxicity of the compounds on murine macrophages was verified. The 8-HQN, SM, SM/8-HNQ products showed CC₅₀, in that order, 16.40±3.20, 31.54±2.45 and 18.26±1.76µg/mL. Through the data obtained, the authors were able to infer the selectivity index (SI) that determines, through the cytotoxicity ratio and leishmanicidal activity, how selective the tested compounds are for the parasite. As the selectivity index is recommended to be greater than 10, the ones that presented the best SI were 8-HQN (32.80) and SM/8-HQN (228.3).

The patent entitled An Immunotoxin for use in the treatment of leishmaniasis demonstrates the action of an H22xRA immunotoxin directed at CD64 composed of an antibody. Through the tests, it was observed that this treatment induces cell death of the parasite by apoptosis and decreases the parasite's survival in infected human macrophages.

Table 4. New compounds/treatments for leishmaniasis

New treatment	Leishmania species	Type of study (in vivo/in vitro)	Reference
Dronedarone	<i>L. amazonensis</i>	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Beilles et al. (2017)
Cream based on amphotericin b and mixture of excipientes	-	<i>in vitro</i>	Velez- Bernal et al. (2017)
Combination of ethyl 3-chloroacetamidobenzoate, dihydroquercetin (DHQ) flavonoid and a(-) bisabolol sesquiterpene	-	—	Auclair et al (2019)
Topical composition pentamidine isethionate (PMD), ketoconazole (KTZ) and miltefosine (MIL)	<i>L. braziliensis</i>	<i>in vitro</i>	Carreño García et al (2018)
Compounds that inhibit parasite membrane heme transport.	<i>L. amazonensis</i>	<i>in vitro</i>	Hamza et al (2019)
Monomeric Flavonoids	<i>L. amazonensis</i>	<i>in vitro</i>	Chow et al (2017)
Combination of crotamine, toxin from the Crotalus durissus terrificus snake, with standard drugs	<i>L. amazonensis</i>	<i>in vitro</i>	Silva et al. (2018)
Amines derived from 5-nitroimidazole	<i>L. amazonensis</i>	<i>in vitro</i>	Escario García-Trevijano et al. (2019)
400 compounds available in the Malaria box	<i>L. amazonensis</i>	<i>in vitro</i>	Wetzel et al. (2021)
Fractions of Prasiola crispa	<i>L. braziliensis</i>	<i>in vitro</i>	Santos et al. (2021)

Geopropolis hydroalcoholic extracts from <i>Melipona fasciculata</i> (EHG), ethyl acetate fraction (F-1), hydroalcoholic fraction (F-2) and geopropolis hydroalcoholic extract isolate (IGP)	<i>L. amazonensis</i>	<i>in vitro</i>	Dutra; Guerra; Ribeiro (2018)
Poloxamer 407 thermosensitive micellar system containing the compound 8-hydroxyquinoline	<i>L. amazonensis</i>	<i>in vitro</i>	Coelho et al (2017)
H22xRA immunotoxin	<i>L. amazonensis</i>	<i>in vivo e in vitro</i>	Barth et al (2017)

In view of the analysis of the patents, it was possible to verify that there are currently several aspects in the search for new treatments against tegumentary leishmaniasis (Table 4). Research encompasses synthetic substances, products derived from animals, and even formulations for topical use that in initial studies, whether in vitro or in vivo, guarantee leishmanicidal activity. However, it is necessary to advance these works for clinical research so that, in the near future, new drugs will be available for treating leishmaniasis.

4. CONCLUSION

Therefore, this patent review demonstrated new patent documents that aimed to seek new treatments for tegumentary leishmaniasis. In the work, it was possible to observe that currently, there is a broad spectrum of research, such as synthetic substances, natural products, and products from animals in addition to topical treatment for this disease. In addition, the countries of the American continent are holders of research, particularly Brazil, the country with the highest number of patent publications. Thus, it is essential to encourage the search for new leishmanicidal substances that aim to best treat those patients affected by this neglected disease.

Financial Support

This work has been supported by the CAPES (88887.714928/2022-00)

Acknowledgments

The authors thank the CAPES, CNPq, MCTC, FINEP, and FAPESP. Moreover, the authors would like to thank several colleagues working at the UFAL for constructive criticism of and assistance with this project.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

ABADÍAS-GRANADO, I. et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601-618, 2021.

AUCLAIR, Christian et al. 2019. [Topical Compositions For The Treatment Of Cutaneous Leishmaniasis](#). Assignee: AC Bioscience SA. WO 2019/043212 A1. 2019 March 7.

BARTH, stefan; THEPEN, Theophilis. 2016. An Immunotoxin for use in the treatment of leishmaniasis. Assignee: Fraunhofer-Gesellschaft Zur Forderung der angewandten forschung . US20170369574A1. 2016 July 28.

BEILLES, Stephane et al. 2017. Dronedarone for use in leishmaniasis, formulations and associations for use in leishmaniasis. Assignee: Safoni. US 9700540 B2. 2017 Jul 11.

CHOW, Larry Ming-Cheung et al. 2017. Synthesis and and use of amine-containing flavonoids as potent anti-leishmanial agents. Assignee: The Hong Kong polytechnic university. [US 9562037 B2](#). 2017 Feb 7.

CARREÑO GARCÍA, Heider; ESCOBAR RIVERO, Patricia. 2018. Topical pharmaceutical formulation. Assignee: Universidad Industrial de Santander. [WO2018185685A1](#). 2018 Oct 11.

COELHO, Eduardo Antonio Ferraz et al. 2017. Sistema micelar termorreversível poloxâmico 407 E 8-hidroxiquinolina, processo de obtenção, composição farmacêutica e usos. Assignee: Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de Ouro Preto. BR 102015032488-0 A2. 2017 Jun 27.

DUTRA, Richard Pereira et al. 2018. Processo de obtenção, formulação de extratos padronizados, fração e substâncias isoladas da geoprópolis brasileira de abelha sem ferrão e seu uso como agenda leishmanicida. Assignee: Universidade Federal do Maranhão, Fundação do amparo a pesquisa e ao desenvolvimento científicos e tecnológico do Maranhão - FAPEMA.PI 1103291-0 A2. 2018 Feb 27.

ESCARIO GARCÍA-TREVIJANO et al. 2019. Amines derived from 2-benzyl-5-nitroindazole with antiprotozoal proprierts against Trypanosoma, Leishmania and Trichomonas. Assignee: Universidad Complutense de Madrid. [WO2019077174A1](#). 2019 Abril 25.

Factors associated with the expansion of leishmaniasis in urban areas: a systematic and bibliometric review (1959–2021)

HAMZA, Iqbal et al. 2019. Compounds for treating parasitic infections. Assignee: University of Maryland. [US 2019/0152938 A1](#). 2019 May 23.

HASSAN, Abdalla A. et al. Antileishmanial Activities of Medicinal Herbs and Phytochemicals In Vitro and In Vivo: An Update for the Years 2015 to 2021. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7579, 2022.

NASSIF, Priscila Wolf et al. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology**, v. 144, n. 8, p. 995-1004, 2017.

Organização Pan Americana da Saúde. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas [Internet]. Núm. 10, dezembro del2021. Washington, D.C.: OPS; 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>

VALERO, Nerida Nadia H.; URIARTE, María. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 119, n. 2, p. 365-384, 2020.

VELEZ-BERNAL et al. 2017. Cream formulation with amphotericin B and oil in water useful for topical application to mucous tissue and skin against disease produced by leishmaniasis. Assignee: Universidad de Antioquia; Humax Pharmaceutical. [US 9801895 B1](#). 2017 Oct 31.

ROATT, Bruno Mendes et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965-8977, 2020.

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

SILVA, João et al. 2018. Combination, pharmaceutical composition, medicament, method for treating leishmaniasis and use of the composition. Assignee: Fundação Oswaldo Cruz. WO2018152602A1. 2018 August 30.

SANTOS, Dilvani Oliveira et al. 2021. Composição farmacêutica com frações derivadas de algas marinhas e seu uso como agente leishmanicida. Assignee: Universidade Federal Fluminense.) BR 102019018113-3 A2. 2021 August 16.

ULIANA, Silvia RB; TRINCONI, Cristiana T.; COELHO, Adriano C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, 2018.

GHORBANI, Masoud; FARHOUDI, Ramin. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug design, development and therapy**, p. 25-40, 2017.

WETZEL, Dawn M., et al. 2021. Novel antiparasitic compounds and methods. Assignee: The board of regents of the university of Texas system. [WO2021077102A1](#). 2021 April 22.