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

JULIANA DA CÂMARA ROCHA

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN SOBRE *Leishmania* spp.

JOÃO PESSOA – PB
2018

JULIANA DA CÂMARA ROCHA

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN SOBRE *Leishmania* spp.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito final para a obtenção do título de DOUTOR em PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS – Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientadoras:

Drª. Josiane de Campos Cruz

Drª. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

JOÃO PESSOA – PB
2018

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R672i Rocha, Juliana da Câmara.
Investigação da atividade biológica dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sobre Leishmania spp / Juliana da Câmara Rocha. - João Pessoa, 2018.
179 f. : il.

Orientação: Josiane de Campos Cruz, Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Atividade anti-Leishmania. 3. Compostos sintéticos. 4. Leishmanioses. 5. Morita-Baylis-Hillman. I. Cruz, Josiane de Campos. II. Clemente, Tatjana Keesen de Souza Lima. III. Título.

UFPB/BC

JULIANA DA CÂMARA ROCHA

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN SOBRE *Leishmania* spp.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito final para a obtenção do título de DOUTOR em PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS – Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Data da aprovação 04 / 05 / 18

Banca examinadora

Prof.ª Dr.ª Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente
(Orientadora)

Prof.ª Dr.ª Márcia Regina Piuvezam
(Membro Interno)

Prof.ª Dr.ª Camille de Moura Balarini
(Supervisora)

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura
(Membro Externo)

Prof.ª Dr.ª Sandra Rodrigues Mascarenhas
(Membro Interno)

Prof.ª Dr.ª Caliandra Maria Bezerra Luna Lima
(Membro Externo)

A minha mãe, **Jubercília**, pelo exemplo
de vida, amor, coragem e fé.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu Papai do céu, por me proporcionar paz interior e felicidade sem limites, por me carregar no colo durante os meus dias maus e por nunca desistir de mim. Deus é minha fortaleza, obrigada pela sua infinita misericórdia em minha vida;

A **Nossa Senhora**, minha Mãezinha, por me colocar para dormir no seu colo tantas noites, me protegendo do mal e me guiando para mais perto do seu filho Jesus Cristo; és meu amparo e proteção;

Aos meus pais, **Jubercília e Rocha** (*in memorian*), por todos os ensinamentos de vida que me fizeram a mulher de hoje; em especial a minha mãe, por ser uma mulher guerreira, batalhadora, que se doa à família, especialmente às filhas;

À minha irmã, **Juliene**, acima de tudo minha amiga, sinônimo de coragem e determinação. Mesmo sendo mais jovem do que eu, me inspira a ser a cada dia uma pessoa melhor, uma cristã melhor. Meu orgulho!

À minha família, **tios e primos**, minha base para seguir a vida de cabeça erguida, sabendo que tenho a quem segurar a mão quando eu cair ou correr junto comigo rumo aos meus sonhos; pessoas com as quais posso compartilhar minhas alegrias e tristezas;

À minha orientadora, **Prof^{a}. Dr^{a}. Tatjana Keesen**, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional junto à pesquisa de imunologia de doenças infecciosas. Obrigada por todo o apoio, incentivo, puxões de orelha, paciência, confiança, e principalmente, por me ensinar através do exemplo a amar a ciência;

A todos os meus amigos do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LABIDIC), por todo o companheirismo, parceria, cumplicidade e amizade durante todo o curso do doutorado, como também por me ajudar no meu crescimento pessoal e espiritual; vou levar nossa amizade para a vida;

À **Prof^{a}. Dr^{a}. Josiane Campos Cruz**, por contribuir de forma inesperada com este trabalho; obrigada por ter aceitado prontamente essa missão;

À **Prof^{a}. Dr^{a}. Camille Balarini** por toda a disponibilidade e atenção durante o tempo que ficou como supervisora do meu trabalho de doutorado;

À **Prof^{a}. Dr^{a}. Márcia Rosa**, pelo seu coração sempre aberto a me receber; desde o mestrado, e mais uma vez abrindo seu laboratório para a realização dos

meus experimentos. Uma colaboração que acrescentou no meu aprendizado e desenvolvimento dessa tese;

Aos membros da banca de qualificação, **Prof.ª Dr.ª Sandra Mascarenhas**, **Prof.ª Dr.ª Márcia Rosa** e **Prof. Dr. Rafael Travassos**, pela disponibilidade em contribuir com mais uma etapa desse trabalho;

Aos membros da banca de defesa da tese, **Prof.ª Dr.ª Sandra Mascarenhas**, **Prof.ª Dr.ª Márcia Piuvezam**, **Prof. Dr. Ricardo de Moura** e **Prof.ª Dr.ª Caliandra Lima**, pela atenção, disponibilidade e contribuições para finalização desse trabalho;

Aos companheiros de experimentos do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Biologia Molecular/CCEN, **Patrícia Néris** e **Klinger Rodrigues**, por todo acompanhamento e parceria durante a construção desse trabalho;

Aos professores **Dr. Mário Vasconcellos** e **Dr. Claudio Gabriel**, por terem gentilmente cedido às moléculas avaliadas nessa tese, sendo sempre prestativos e contribuindo de forma direta para a realização da mesma;

Aos professores **Dr. Isac Almeida de Medeiros** e **Dr. Robson Cavalcante Veras** pela concessão na utilização da centrífuga e do citômetro de fluxo do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular/UFPB; especialmente a pós-doutoranda **Fátima Araújo**, por toda a disponibilidade e carinho em contribuir com o processo científico;

A todos os técnicos do Centro de Biotecnologia (CBiotec), em especial à **Tereza Cristina**, por toda dedicação e suporte técnico, sempre disposta a ajudar;

Aos **colegas da pós-graduação**, pela convivência durante o curso das disciplinas do doutorado;

A todos os **Professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, pela contribuição a minha formação acadêmica;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta tese, servindo como base para a conquista desse sonho.

“Eis que estou convosco todos os dias, até o fim do mundo.”
(Mt 28, 10b)

RESUMO

ROCHA, J. C. **INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN SOBRE *Leishmania* spp.** 2018. 179 f. **Tese** – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (CCS/UFPB), João Pessoa – PB.

O tratamento das leishmanioses é baseado na utilização de compostos antimoniais pentavalentes, como medicamentos de primeira escolha; sendo drogas altamente tóxicas e que apresentam vários efeitos colaterais. Esse complexo de doenças é um problema de saúde pública, com desafios na identificação de novas terapias que permitam uma maior adesão e melhor qualidade no tratamento aos pacientes. Com a elevada toxicidade e o aparecimento de resistência às drogas, se justifica a busca de novas alternativas para o tratamento das leishmanioses. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos adutos de Morita-Baylis-Hillman em modelos experimentais *in vitro* e *ex vivo*. A atividade dos compostos sobre as formas promastigotas e amastigotas axênicas do parasito *Leishmania*, além das células monucleares de sangue periférico humano foram avaliadas pelo teste colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio). A taxa de infecção em monócitos humanos e o perfil de morte celular de formas promastigotas foram avaliados por citometria de fluxo. Além disso, foi mensurada a atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos e a avaliação indireta dos níveis de óxido nítrico pelo reagente de Griess. A triagem das 36 moléculas oriundas da reação de Morita-Baylis-Hillman sobre as formas promastigotas de *L. donovani*, teve os MBH-A12 e MBH-A13 com um dos menores valores de CI_{50} (4,71 e 0,37 µg/mL), além de que apresentam o mesmo processo de síntese química, sendo assim selecionados para a continuação da avaliação biológica. Essas duas substâncias também apresentaram inibição de crescimento (CI_{50}) significativa sobre as formas promastigotas de *L. infantum* (5,6 e 5,3 µg/mL), *L. amazonensis* (13,2 e 13,4 µg/mL) e *L. braziliensis* (16,32 e 19,09 µg/mL); além disso, apresentaram atividade sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* (CE_{50} de 9,08 e 10,76 µg/mL) e *L. amazonensis* (CE_{50} de 13,4 e 10,4 µg/mL), demonstrando efeito sobre a diversidade de espécies de *Leishmania* que causam manifestações clínicas diferentes. Dentro das concentrações testadas, essas drogas não apresentaram toxicidade para células mononucleares de sangue periférico e eritrócitos humanos, apresentando assim índices de seletividade com tropismo para o parasito. No modelo de avaliação da taxa de infecção em monócitos humanos, não observamos diferença estatística com o tratamento das substâncias, nem modulação via síntese de óxido nítrico. O perfil de morte celular em promastigotas de *Leishmania* spp. sugere um padrão envolvendo mecanismo de morte via apoptose para os adutos MBH-A12 e MBH-A13, diferente da anfotericina B que também leva ao processo de necrose. Assim, conclui-se que os adutos de Morita-Baylis-Hillman são compostos com atividade anti-*Leishmania* em modelo *in vitro*, sendo moléculas a serem investigadas quanto ao mecanismo de ação, na busca por novos tratamentos para as leishmanioses.

Palavras-chave: atividade anti-*Leishmania*, compostos sintéticos, leishmanioses

ABSTRACT

ROCHA, J. C. **BIOLOGICAL RESEARCH ACTIVITY OF MORITA-BAYLIS-HILLMAN ADDUCTS ON *Leishmania* spp.** 2018. p. 179**. Thesis** – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (CCS/UFPB), João Pessoa – PB.

Leishmaniasis treatment is based on the use of pentavalent antimonial compounds, as first choice drugs; even though they are highly toxic presenting several side effects. This diseases complex is a public health problem, with challenges in the new therapies identification that allow a greater adhesion and better quality in the treatment of the patients. Due to high toxicity and drug resistance, the search of new alternatives for the treatment of leishmaniasis is justified. In this context, this study aimed to evaluate the anti-*Leishmania* activity of Morita-Baylis-Hillman adducts *in vitro* and *ex vivo* experimental models. Activity of the compounds on the promastigote and axenic amastigote forms of the *Leishmania* parasite, in addition to the human peripheral blood monuclear cells, were evaluated by the MTT colorimetric test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). The rate of infection in human monocytes and the cell death profile of promastigote forms were assessed by flow cytometry. In addition, hemolytic activity on human erythrocytes and indirect evaluation of nitric oxide levels by Griess's reagent were measured. Screening of 36 molecules from the Morita-Baylis-Hillman reaction on *L. donovani*'s promastigote forms had MBH-A12 and MBH-A13 as one of the lowest IC_{50} values (4.71 and 0.37 µg/mL), besides they present the same chemical synthesis process, being thus selected for the continuation of the biological evaluation. These two substances also showed significant inhibition of growth (IC_{50}) on the promastigote forms of *L. infantum* (5.6 and 5.3 µg/mL), *L. amazonensis* (13.2 and 13.4 µg/mL) and *L. braziliensis* (16.32 and 19.09 µg/mL). In addition, they showed activity on the axenic amastigote forms of *L. infantum* (EC_{50} of 9.08 and 10.76 µg/mL) and *L. amazonensis* (EC_{50} of 13.4 and 10.4 µg/mL), demonstrating effect on the diversity of *Leishmania* species that cause different clinical manifestations. Among the tested concentrations, these drugs did not present toxicity to peripheral blood mononuclear cells and human erythrocytes, thus demonstrating selectivity indices to parasite tropism. In the infection model evaluation of human monocytes, we did not observe statistical difference with the substances treatment, nor in modulation via nitric oxide synthesis. Cell death profile in *Leishmania* spp. suggests a pattern involving apoptosis death mechanism for MBH-A12 and MBH-A13 adducts, different from amphotericin B which also leads to the necrosis process. Thus, we concluded that the Morita-Baylis-Hillman adducts are compounds with expressive anti-*Leishmania* activity in an *in vitro* model, being molecules that need to be better investigated, regarding to the action mechanism, in the search for new treatments for leishmaniasis.

Keywords: anti-*Leishmania* activity, synthetic compounds, leishmaniasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxonomia de *Leishmania*	**22**
Figura 2	Formas promastigotas e amastigotas de parasitos do gênero *Leishmania* spp.	**23**
Figura 3	Insetos vetores fêmeas das leishmanioses	**24**
Figura 4	Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*	**26**
Figura 5	Distribuição geográfica das leishmanioses no mundo em 2015	**29**
Figura 6	Formas clínicas das leishmanioses	**31**
Figura 7	Reação de Morita-Baylis-Hillman	**38**
Figura 8	Estratégia de análise por citometria de fluxo	**55**
Figura 9	Dot plots representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de promastigotas de *L. infantum* tratadas com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e Anfotericina B	**57**
Figura 10	Dot plots representativos da avaliação de morte celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e Anfotericina B	**58**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Efeito dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e os fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina sobre a inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* após 72 h de tratamento **66**

Gráfico 2 Efeito dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e os fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina sobre a inibição de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* após 72 h de tratamento **67**

Gráfico 3 Efeito dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e os fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina sobre a inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis* após 72 h de tratamento **68**

Gráfico 4 Citotoxicidade em formas amastigotas axênicas de *L. infantum* na presença dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina após 24 h de tratamento **70**

Gráfico 5 Citotoxicidade em formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* na presença dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina após 24 h de tratamento **72**

Gráfico 6 Efeito dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e anfotericina B sobre a taxa de infecção de monócitos por *Leishmania infantum* ou *Leishmania amazonensis* após 24 h de tratamento **80**

Gráfico 7 Níveis de nitrito produzidos por monócitos infectados com *Leishmania infantum* e tratados com os compostos MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B **82**

Gráfico 8 Níveis de nitrito produzidos por monócitos infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados com os compostos MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B **83**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses **34**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Massa molecular e estrutura química dos compostos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman **45**

Tabela 2 Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI_{50}) de *Leishmania donovani* após 72 h de incubação com os compostos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman e fármacos de referência **61**

Tabela 3 Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI_{50}) de *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, após 72 h de incubação, com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina **69**

Tabela 4 Concentração efetiva sobre 50% da população de formas amastigotas axênicas (CE_{50}) de *L. infantum* e *L. amazonensis*, após 24 h de incubação, com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina **73**

Tabela 5 Concentração citotóxica para 50% das células mononucleares de sangue periférico humano (CC_{50}) dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e fármacos de referência após 24 h de incubação **74**

Tabela 6 Concentração capaz de lisar 50% das hemácias (CH_{50}) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman e fármacos de referência após 1 h de incubação **75**

Tabela 7 Atividade anti-*Leishmania*, efeitos citotóxicos contra células mononucleares de sangue periférico humano e eritrócitos humanos, e índice de seletividade dos adutos de Morita-Baylis-Hillman, antimoniato de meglumina e anfotericina B **78**

Tabela 8 Percentual de morte celular por apoptose/necrose de formas promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B **85**

Tabela 9 Percentual de morte celular por apoptose/necrose de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B **87**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

Cbiotec – Centro de Biotecnologia

CC_{50} – Concentração citotóxica sobre 50% de CMSP

CE_{50} – Concentração efetiva sobre 50% de amastigotas

CFSE – Éster succinimidílico de carboxifluoresceína

CH_{50} – Concentração hemolítica sobre 50% das hemácias

CI_{50} – Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas

CMSP – Células mononucleares de sangue periférico

DABCO – 1,4-diazabiciclo[2.2.2]octano

DBO – Demanda Biológica de Oxigênio (*Biochemical oxygen demand*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSS – Docecil sulfato de sódio

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GRE – grupo retirador de elétrons

IFN-γ – Interferon-γ

Ig – Imunoglobulina

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 – Interleucina-12

IL-13 – Interleucina-13

IL-17 – Interleucina-17

IL-22 – Interleucina-22

IL-1β – Interleucina-1 beta

IL-4 – Interleucina-4

IL-6 – Interleucina-6

IP – Iodedo de propídio

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

IS – Índice de seletividade

LABIDIC – Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LCL – Leishmaniose cutânea localizada

LD – Leishmaniose cutânea disseminada

LDPC – Leishmaniose dérmica pós-calazar

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LT – Leishmaniose tegumentar

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

LV – Leishmaniose visceral

MBH – reação Morita-Baylis-Hillman

MBH-A – aduto de Morita-Baylis-Hillman

MP – Matriz peritrófica

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio

NK – *natural Killer*

NO – Óxido nítrico

OMS – Órganização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate buffered saline* (salina fosfatada tamponada)

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SFB – Soro fetal bovino

TGF-β – Fator de transformação do crescimento-β

Th0 – Linfócito T auxiliar não-diferenciado

Th1 – Linfócito T auxiliar 1

Th2 – Linfócito T auxiliar 2

Th17 – Linfócito T auxiliar 17

TNF-α – Fator de necrose tumoral-α

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **19**

2 REVISÃO DE LITERATURA **21**

2.1 Parasito e vetor **21**

2.2 Ciclo Biológico **25**

2.3 Epidemiologia **27**

2.4 Manifestações clínicas **30**

2.5 Terapêutica das leishmanioses **33**

2.6 Adutos de Morita-Baylis-Hillman **36**

3 OBJETIVOS **40**

3.1 Objetivo geral **40**

3.2 Objetivos específicos **40**

4 MATERIAL E MÉTODOS **41**

4.1 Local da pesquisa **41**

4.2 Parasitos e manutenção das culturas *in vitro* **41**

4.2.1 Obtenção das formas amastigotas axênicas de *L. infantum* e de *L. amazonensis* **42**

4.3 Compostos químicos avaliados **43**

4.3.1 Fármacos de referência **43**

4.3.2 Compostos sintéticos adutos de Morita-Baylis-Hillman **43**

4.4 Atividade anti-*Leishmania* dos compostos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman sobre formas promastigotas de *L. donovani* **48**

4.5 Seleção dos adutos de Morita-Baylis-Hillman e avaliação da atividade anti-*Leishmania* sobre formas promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* **49**

4.6 Atividade anti-*Leishmania* dos compostos MBH-A12 e MBH-A13 sobre formas amastigotas axênicas de *L. infantum* **49**

4.7 Atividade anti-*Leishmania* dos compostos MBH-A12 e MBH-A13 sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* **50**

4.8 Obtenção das células sanguíneas humanas **51**

4.8.1 Obtenção e citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano pelo teste do MTT **51**

4.8.2 Citotoxicidade frente a eritrócitos humanos **52**

4.9 Determinação do índice de seletividade do MBH-A12 e do MBH-A13 ... **53**

4.10 Atividade dos compostos sintéticos MBH-A12 e MBH-A13 sobre a taxa de infecção de monócitos humanos por *L. infantum* e *L. amazonensis* **53**

4.11 Aquisição e análise dos dados de taxa de infecção por citometria de fluxo..... **54**

4.12 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico na infecção de monócitos humanos por *L. infantum* e *L. amazonensis* tratados com MBH-A12 e MBH-A13 ..... **55**

4.13 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* expostas ao MBH-A12 e ao MBH-A13 ..... **55**

4.13.1 Análise dos dados de perfil de morte celular de formas promastigotas de *L. infantum* expostas ao MBH-A12 e ao MBH-A13 por citometria de fluxo **56**

4.13.2 Análise dos dados de perfil de morte celular de formas promastigotas de *L. amazonensis* expostas ao MBH-A12 e ao MBH-A13 por citometria de fluxo **58**

4.14 Análise estatística **59**

5 RESULTADOS **60**

5.1 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* dos compostos orindos da reação de Morita-Baylis-Hillman sobre as formas promastigotas de *Leishmania donovani* **60**

5.2 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* do MBH-A12 e do MBH-A13 sobre as formas promastigotas de *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* **64**

5.3 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* do MBH-A12 e do MBH-A13 sobre formas amastigotas axênicas de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* **69**

5.4 Avaliação da citotoxicidade dos compostos MBH-A12 e MBH-A13 em células de mamíferos **73**

5.4.1 Citotoxicidade frente a células mononucleares de sangue periférico humano **73**

5.4.2 Citotoxicidade em eritrócitos humanos **74**

5.5 Determinação dos índices de seletividade das substâncias em estudo **75**

5.6 Avaliação da atividade dos compostos sintéticos MBH-A12 e MBH-A13 sobre a taxa de infecção de monócitos humanos por *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* **79**

5.7 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico **81**

5.8 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* expostas aos compostos MBH-A12 e MBH-A13 ..... **84**

6 DISCUSSÃO **88**

7 CONCLUSÃO **100**

REFERÊNCIAS **101**

ANEXO A **112**

ANEXO B **113**

ANEXO C **114**

ANEXO D **115**

ANEXO E **117**

ANEXO F **119**

APÊNDICES **123**

APÊNDICE A **124**

APÊNDICE B **128**

APÊNDICE C **140**

APÊNDICE D **154**

APÊNDICE E **168**

APÊNDICE F **175**

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por protozoários são um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, sendo essas a maior causa de morbidade e mortalidade em países tropicais e subtropicais (SACKS; SHER, 2002). Dentre tais doenças, podemos citar as leishmanioses que são causadas pela infecção com o parasito do gênero *Leishmania*, que faz parte da família *Trypanosomatidae* e da Ordem *Kinetoplastida*. As leishmanioses são um complexo de doenças tropicais endêmicas, infecto-parasitárias e não contagiosas (AKHOUNDI et al., 2016; DAVID; CRAFT, 2009; LINDOSO; LINDOSO, 2009).

As leishmanioses estão inseridas no grupo de "Doenças Tropicais Negligenciadas", as quais atingem principalmente pessoas que vivem sob condições socioeconômicas desfavoráveis, associada à desnutrição, condições precárias de habitação, sistema imunológico debilitado, entre outros fatores. Essas acometem as populações pobres da Ásia, da África e da América Latina, levando a óbito cerca de vinte a trinta mil pessoas por ano em todo o mundo (WHO, 2017a; DAVID; CRAFT, 2009; FEASEY et al., 2010; LINDOSO; LINDOSO, 2009). Essas doenças também são endêmicas em todas as regiões do Brasil, com focos na região do Nordeste, incluindo o estado da Paraíba; e possuem um forte impacto na saúde e na qualidade de vida da população (BRASIL, 2011a).

A doença causa um amplo espectro de manifestações clínicas, cuja evolução depende não apenas da espécie do parasito envolvida, como também da genética do hospedeiro e da capacidade do indivíduo em desenvolver uma resposta imunológica adequada ao controle da infecção (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). As formas clínicas podem apresentar lesões não ulceradas, ulcerativas e nodulares na pele, podendo evoluir para mucosas e cartilagens, na forma mucocutânea; e ser potencialmente fatal na forma clínica visceral, que é tida como a mais grave (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; KAYE; SCOTT, 2011).

Os medicamentos são a única opção na terapêutica das leishmanioses, já que até hoje não foi desenvolvida nenhuma vacina humana para a prevenção da mesma. Há várias décadas, os antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, tendo a anfotericina B e a pentamidina como fármacos de segunda opção, porém todos eles apresentam uma

elevada toxicidade e induzem uma série de efeitos colaterais para o paciente, como cefaleia, náuseas e febre (TORRES-GUERRERO et al., 2017; LIMA et al., 2007).

Diante do contingente de indivíduos infectados ou em risco de adquirir a infecção por residirem em áreas endêmicas, estudos que visem identificar potenciais compostos que possam ser utilizados no tratamento dos pacientes com leishmaniose, causando menos efeitos colaterais e mais acessíveis economicamente são absolutamente justificados. Desta forma, o estudo de novas drogas que sejam mais eficazes e seguras para o homem é de extrema importância no controle, tratamento e prevenção destas doenças (ROATT et al., 2014; OULELLETE et al., 2004).

Um dos grandes desafios no estudo das leishmanioses é identificar novos fármacos que permitam maior adesão e melhor qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento. Compostos sintéticos derivados da reação de Morita-Baylis-Hillman já demonstraram diversas atividades biológica como antiproliferativa, antimalárica e anti-*Leishmania* (LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012). Dentro desta linha de pesquisa, alguns trabalhos já foram realizados, *in vitro* e *in vivo* avaliando o efeito anti-*Leishmania* de algumas moléculas oriundas dessa reação sintética (XAVIER, et al. 2014; AMORIM, et al. 2013; BARBOSA et al., 2011; JUNIOR et al., 2010; BARBOSA et al., 2009), as quais demonstraram eficácia sob formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, espécies associadas a leishmaniose tegumentar; como também sob as formas promastigotas de *L. infantum*, espécie que causa a leishmaniose visceral.

Considerando os resultados promissores de outros compostos sintéticos derivados da reação de Morita-Baylis-Hillman em trabalhos anteriores, o baixo custo de síntese desses compostos e o cenário atual das leishmanioses, avaliou-se a possível atividade biológica de substâncias oriundas da reação de Morita-Baylis-Hillman para o futuro desenvolvimento de novas drogas a serem utilizadas na terapêutica das leishmanioses. Os estudos compreenderam a avaliação da atividade biológica anti-*Leishmania*, da citotoxicidade frente a células de mamíferos e a influência na taxa de infecção de monócitos humanos pelo parasito.

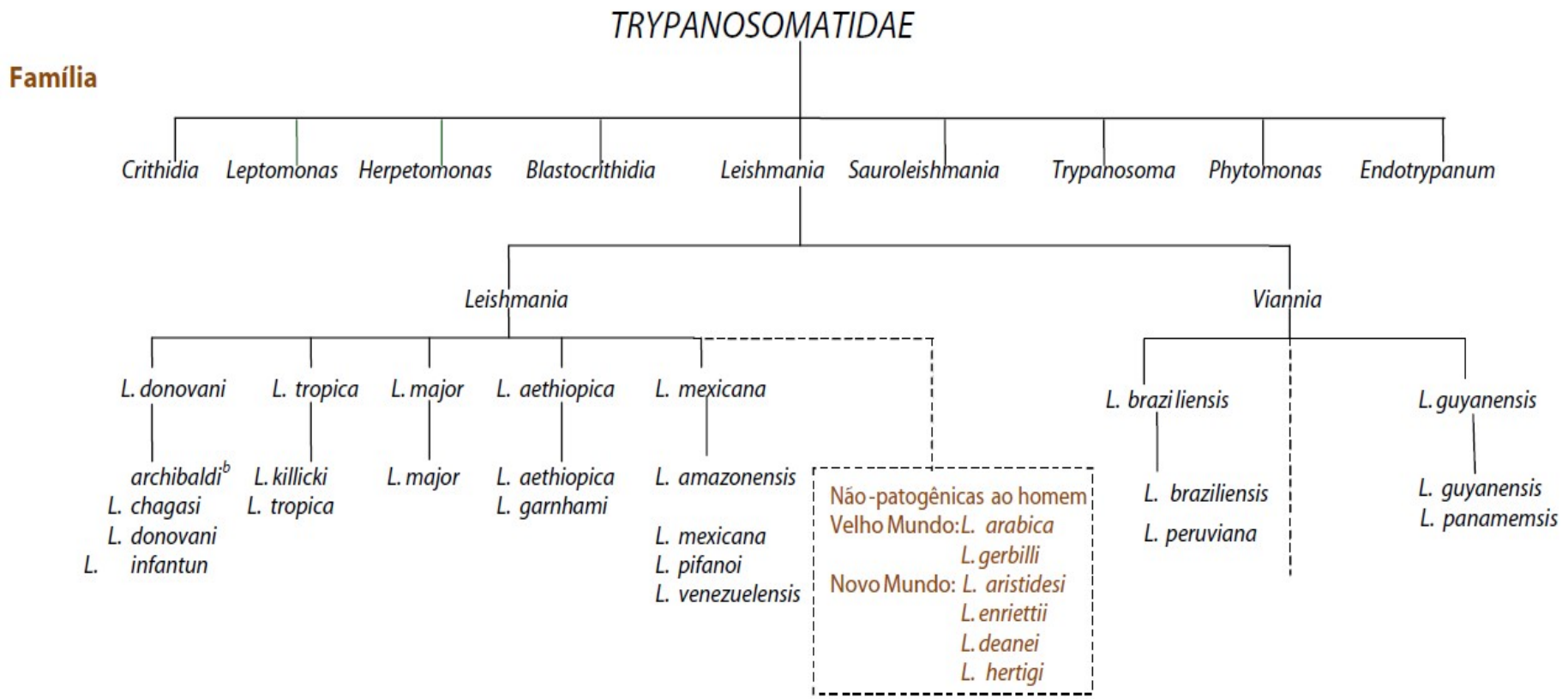
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Parasito e vetor

Os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados filogeneticamente na ordem Kinetoplastida, da família *Trypanosomatidae*, com mais de 20 espécies conhecidas e divididas nos subgêneros *Leishmania e Viannia* (**Figura 1**). Os dois subgêneros foram divididos de acordo com o local de desenvolvimento dos parasitos na porção do intestino do flebotomíneo e por análises filogenéticas (FRAGA et al., 2010). Parâmetros como distribuição geográfica, especificidade pelo vetor e formas clínicas da doença foram utilizados para determinar as relações filogenéticas. Além disso, os estudos moleculares como análise de polimorfismo e marcadores genéticos tornam possível o entendimento das relações evolutivas entre as espécies desse gênero (MARCILLI et al., 2014; LUKES et al., 2007).

Nos continentes da Ásia, África e Europa, encontram-se diversas espécies de *Leishmania* como a *Leishmania* (*Leishmania*) *major, Leishmania* (*Leishmania*) *tropica*, *Leishmania* (*Leishmania*) *aethiopica*, *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* e *Leishmania (Leishmania) donovani*. Já no continente americano, os principais agentes etiológicos são *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (GOTO, LINDOSO, 2010). Cada espécie do parasito apresenta características específicas quanto ao tipo de manifestações clínicas, vetores, reservatórios, padrões epidemiológicos, distribuição geográfica e resposta terapêutica. No Brasil, algumas espécies são responsáveis pelo desenvolvimento da leishmaniose, sendo a forma tegumentar causada principalmente pela *L. (V.) braziliensis, L. (V.) guyanensis e L. (L.) amazonensis,* enquanto a *L.* (*L.*) *chagasi*/*infantum* é a responsável pela doença na sua forma clínica visceral (BRASIL, 2007).

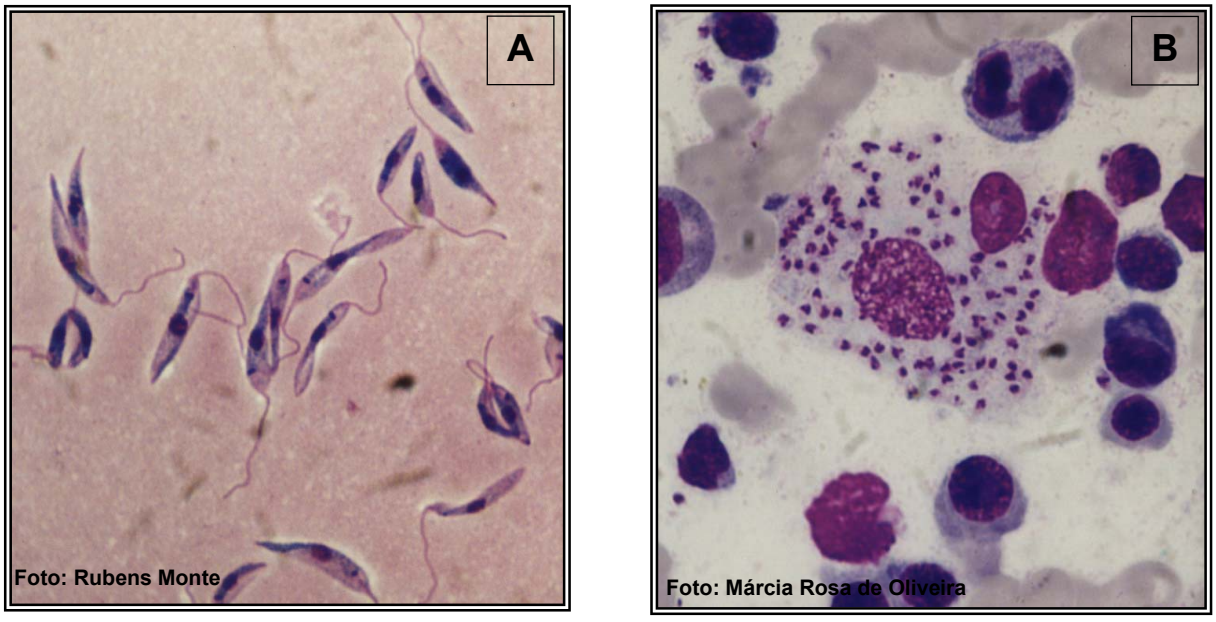
Figura 1 - Taxonomia de *Leishmania*



Fonte: BRASIL, 2010. Descrição taxonômica referente à família, gênero, sub-gênero e espécies do protozoário do gênero *Leishmania*.

Os parasitos do gênero *Leishmania* são caracterizados por duas formas evolutivas: as promastigotas, que colonizam o hospedeiro invertebrado (**Figura 2A**), e as amastigotas, presentes no hospedeiro vertebrado (**Figura 2B**); caracterizando assim um ciclo de vida heteroxênico. A forma promastigota é encontrada no trato digestivo do inseto vetor (insetos fêmeas hematófagos da família *Psychodidae* da subfamília *Phlebotominae*), caracterizada como sendo uma forma extracelular, móvel, de formato alongado e com flagelo longo exteriorizado. Enquanto que a forma amastigota é encontrada no hospedeiro mamífero, sendo uma forma intracelular obrigatória, de formato ovalado e sem flagelo exteriorizado. As amastigotas parasitam principalmente o interior dos macrófagos, podendo também parasitar células dendríticas, neutrófilos e fibroblastos (VANNIER-SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002). O cinetoplasto está presente em ambas às formas morfológicas, sendo uma região que apresenta o DNA mitocondrial altamente condensado em uma região perpendicular a base do flagelo, característico de sua ordem *Kinetoplastida* (de Souza, 2008).

Figura 2 - Formas promastigotas e amastigotas de parasitos do gênero *Leishmania*.

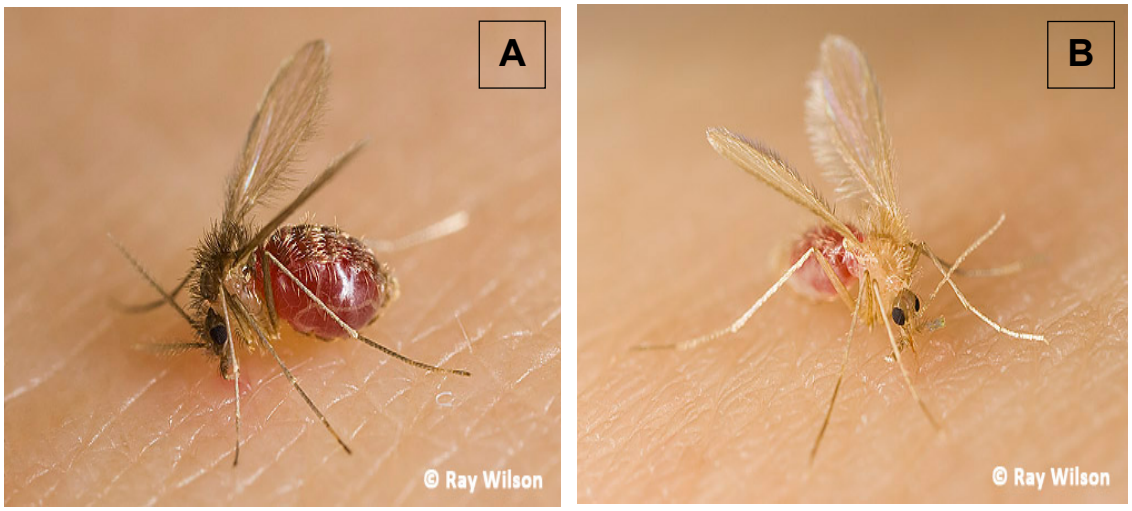


Fonte: Laboratório de Leishmanioses. Departamento de Biologia Molecular. Universidade Federal da Paraíba. (**A**) Cultura de promastigotas de *L. chagasi.* (**B**) Fotomicrografia de macrófago infectado com formas amastigotas de *Leishmania*. Coloração hematológica panótico rápido. Aumento: 1000x.

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos principalmente através do repasto sanguíneo realizado pelos insetos infectados da ordem *Diptera*, pertencentes à subfamília *Phlebotominae*, chamados de flebotomíneos (**Figura 3**)

(KATO et al., 2010). Apenas as fêmeas dos flebótomos são hematófogas, pois as mesmas se alimentam de sangue para a maturação e postura dos seus ovos. Dois gêneros possuem importância clínica na transmissão da leishmaniose; o *Phlebotomus* para os continentes europeu, asiático e africano; e o gênero *Lutzomyia* no continete americano (STEVERDING, 2017).

Figura 3 - Insetos vetores fêmeas das leishmanioses



Fonte: http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html. (**A**): *Lutzomia longipalpus*; (**B**): *Phlebotomus papatasi*.

As formas promastigotas são encontradas parasitando as mais de 90 espécies identificadas como insetos vetores desses parasitos (WHO, 2017a SHIMABUKURO; GALATI, 2011), sendo as mais importantes descritas no Brasil, a *L. longipalpis*, *L. flaviscutelleta* e *L. wellcomei* (KAYE; SCOTT, 2011). Enquanto que a forma amastigota de *Leishmania* possui como principais reservatórios na área urbana as diversas espécies de mamíferos, como os cães e humanos, e no ambiente silvestre as raposas, roedores, endentados, marsupiais e canídeos silvestres (BRASIL, 2010; BRASIL, 2006).

A transmissão da leishmaniose pode ocorrer de forma zoonótica, quando ocorre de animal para vetor para humano, ou antroponótica, quando ocorre de humano para vetor para humano (FREITAS et al., 2016). A transmissão depende das características das espécies dos parasitos, características ecológicas dos locais de transmissão, exposição atual e exposição anterior da população humana ao parasito e do comportamento humano. Cerca de 70 espécies de animais, incluindo

seres humanos, já foram encontradas como reservatórios naturais desses parasitos (WHO, 2017a).

2.2 Ciclo biológico

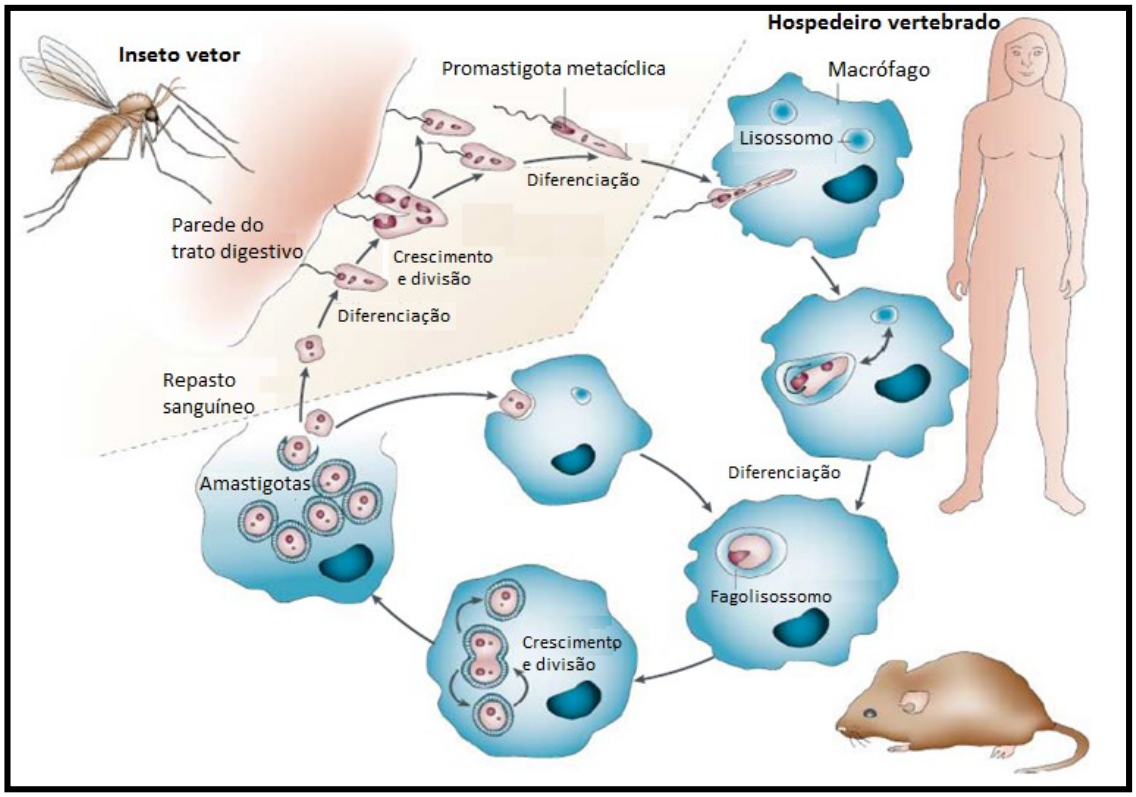
O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* é do tipo heteroxênico (**Figura 4**) (PEREIRA; BRANDÃO, 2013), iniciando no hospedeiro invertebrado, quando esses insetos vetores fêmeas realizam o repasto sanguíneo, sendo ingerido o sangue contaminado com formas amastigotas livres ou presentes no interior de macrófagos de um hospedeiro mamífero. No intestino médio do inseto, as amastigotas são libertadas dos macrófagos digeridos no qual são envolvidas pela matriz peritrófica, uma membrana quitinosa secretada pelo epitélio do intestino do inseto vetor, a qual confere proteção contra o ataque das enzimas digestivas. Na porção posterior do trato digestivo do inseto vetor, as formas amastigotas se transformam em promastigotas, devido à diminuição da temperatura e aumento do pH, em comparação ao ambiente encontrado no hospedeiro mamífero. Essas promastigotas são avirulentas, chamadas de procíclicas e se replicam intensamente (KAMHAWI, 2006; BATES, 2007).

As promastigotas procíclicas se diferenciam em nectomonadas, com a função primordial de deslocamento da parte posterior para a anterior do trato digestivo do inseto vetor. Em seguida, se diferenciam na forma de leptomonadas, as quais se multiplicam intensamente resultando em um aumento da infecção no intestino anterior do inseto e dando origem às formas promastigotas metacíclicas, que são as formas consideradas infectivas. Quando o inseto vetor fizer um novo repasto sanguíneo, dará continuidade ao ciclo de vida desses parasitos, transmitindo as formas promastigotas metacíclicas a um hospedeiro mamífero susceptível (KAMHAWI, 2006).

O processo de diferenciação da forma promastigota procíclica até a forma promastigota metacíclica dentro do trato digestivo do inseto vetor é denominado de metaciclogênese, em que ocorrem nesses parasitos várias alterações na expressão gênica, levando a modificações morfológicas e bioquímicas (SOARES et al., 2005). O tempo necessário para os parasitos completarem seu desenvolvimento e migração da porção posterior para a anterior do trato digestivo do inseto vetor, depende da espécie do parasito, variando aproximadamente entre 6 e 9 dias

(KAMHAWI, 2006). As modificações morfológicas são do corpo celular do parasito que fica mais afilado e com flagelo mais alongado, melhorando a locomoção; e as modificações bioquímicas são as alterações nas moléculas de lipofosfoglicano e da glicoproteína *gp63* presentes na superfície do parasito (DA SILVA et al., 2015). A maior expressão da glicoproteína *gp63* nas formas metacíclicas também confere proteção aos parasitas contra o sistema imune inato do mamífero, além de facilitar sua internalização pelos macrófagos via receptores que não o ativam, sendo outro importante fator de virulência desses protozoários (OLIVIER et al., 2012)

Figura 4 – Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*



Fonte: modificado de SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002. Ciclo biológico do parasito do gênero *Leishmania*, demonstrando o desenvolvimento da forma morfológica promastigota no hospedeiro invertebrado e da foma amastigota no hospedeiro vertebrado, caracterizando um ciclo heteroxênico.

Quando o flebótomo fêmea infectado for fazer um novo repasto sanguíneo, regurgitará na derme do hospedeiro vertebrado, formas infectantes do parasito (promastigotas metacíclicas), presente na saliva do inseto, a qual tem função direta na hemostasia, respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro mamífero (ANDRADE et al., 2007). A saliva do vetor auxilia na lise do tecido e aumenta o fluxo de células sanguíneas para o local da picada, uma vez que apresenta substâncias

imunorreguladoras (KATO et al., 2010). Estas formas promastigotas são inicialmente internalizadas principalmente por neutrófilos e posteriormente por macrófagos, que são as células hospedeiras definitivas no hospedeiro mamífero (CHARMOY et al., 2010). Dentro do fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo do macrófago, os parasitos se transformam rapidamente em formas amastigotas, pelo ambiente ácido e rico em hidrolases, conseguindo sobreviver e se multiplicar por divisão binária até a lise da célula hospedeira e a infecção de novas células do sistema monocítico fagocitário (BURCHMORE; BARRETT, 2001).

Vários processos humorais e celulares ocorrem no estabelecimento de uma resposta imunológica quando o organismo sofre uma infecção pelo protozoário do gênero *Leishmania* (GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014). O tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro mamífero ao interagir com o parasito, determinará a estabilização e manifestação das formas clínicas da leishmaniose (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Contudo, a resposta imune celular é aquela que está mais associada à cura das leishmanioses, principalmente pela ativação macrofágica, que leva a eliminação do parasito (WANDERLEY et al., 2012; TRIPATHI et al., 2007).

2.3 Epidemiologia

As leishmanioses são um complexo de doenças inseridas no grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas, devido aos poucos recursos aplicados em diagnóstico, tratamento e controle, como também por estarem associadas à pobreza, desnutrição, deslocamento populacional e condições precárias de habitação (WHO, 2017c; BERN et al., 2008). Têm como agente etiológico os parasitos do gênero *Leishmania*, as quais são endêmicas em 98 países e territórios da América do Sul, Europa, América Central, África, Oriente Médio e Sul da Ásia (CONTEH et al., 2010). Estima-se que anualmente cerca de 700 mil a 1 milhão de novos casos sejam notificados da doença no mundo, com uma mortalidade anual entre 20 mil e 30 mil pessoas (WHO, 2017a; PIGOTT et al., 2014; ALVAR et al., 2012).

A leishmaniose tegumentar (LT) é a forma clínica mais comum de leishmaniose, sendo uma importante doença infecciosa, devido apresentar um alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades nos indivíduos que

desenvolvem essa patologia (GOTIJO e CARVALHO, 2003). Acometem cerca de 600 mil a 1 milhão de pessoas em todo o mundo anualmente, sendo 95% dos casos nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central (**Figura 5A**) (WHO, 2017a; WHO, 2017b).

A leishmaniose visceral (LV) varia de uma infecção assintomática a forma mais grave da doença, com risco de vida e associada a 95% dos casos de óbito em pacientes não tratados. Estima-se que surjam entre 50 mil e 90 mil novos casos de LV por ano no mundo, de modo que foram notificados à OMS em 2015 mais de 90% dos novos casos nos países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (**Figura 5B**) (WHO, 2017a).

O Brasil é o país que tem o maior número de casos de leishmaniose registrados no continente americano, com cerca de 3.000 novos casos humanos de leishmaniose visceral e 22.000 novos casos de leishmaniose tegumentar anualmente. A região Nordeste é a mais afetada por indivíduos que desenvolvem essa patologia. Do total de casos em humanos registrados no país, essa região apresenta 47% dos casos de LV e 35,16% dos casos de LT (CARVALHO et al., 2015).

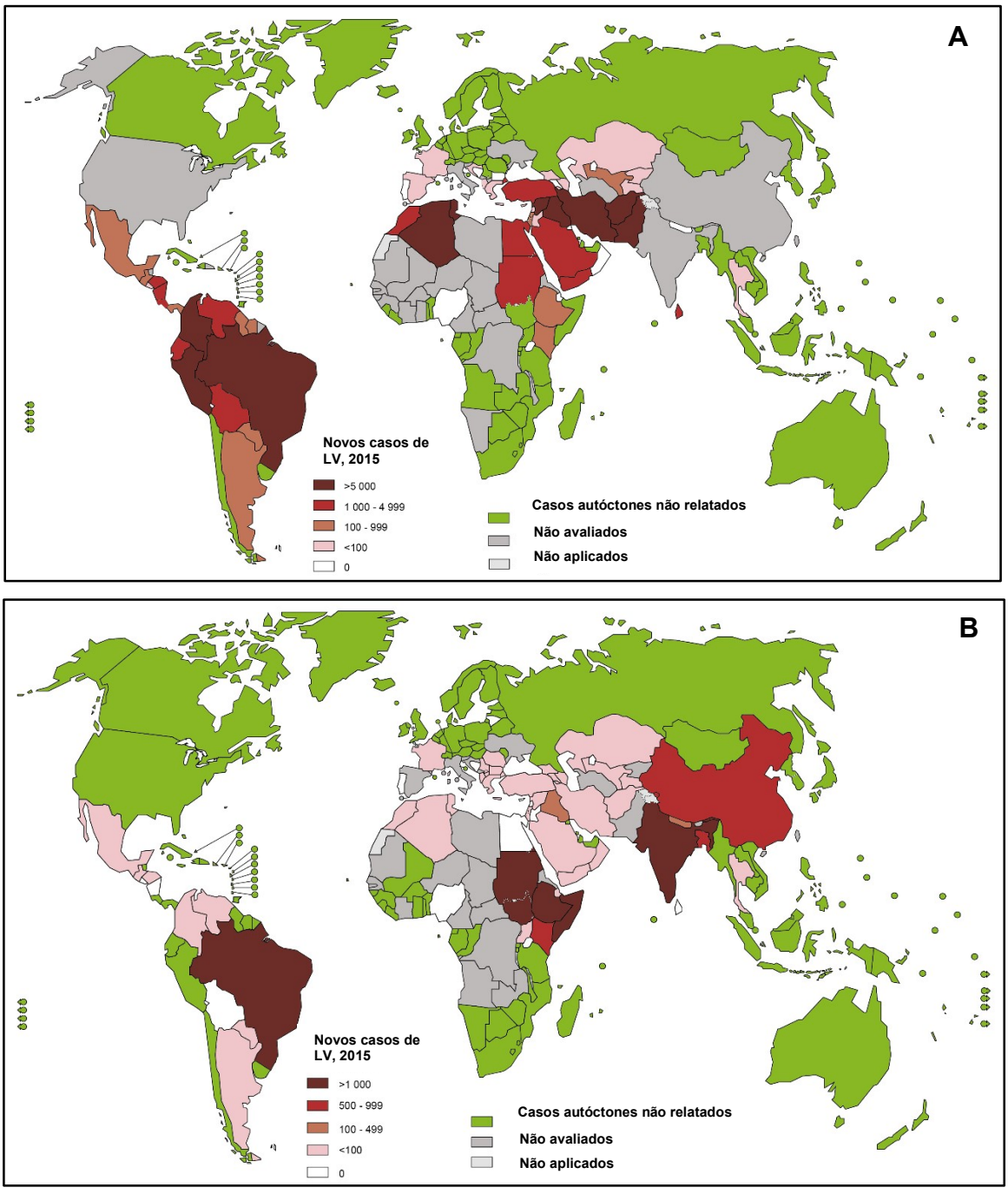
A LT apresenta ampla distribuição no Brasil, com registro de casos em todas as regiões brasileiras, destacando-se as regiões Norte e Nordeste (FRANCO, 2014). Em 2015, foi notificada no Brasil a ocorrência de 19.395 novos casos de LT, com 73% sendo indivíduos do sexo masculino (PAHO, 2017). O Estado da Paraíba notificou 110 casos de LT em 2012, principalmente nos municípios de Areia e João Pessoa, tendo 56% do total de casos do Estado (BRASIL, 2013).

A forma visceral é endêmica no Brasil, sendo observada em todas as regiões do país, apesar da região Nordeste concentrar o maior número de casos de pessoas com essa doença (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Em 2015, foi reportado nas Américas um total de 3.456 novos casos de LV, com 95,1% deles ocorrendo no Brasil (PAHO, 2017). No estado da Paraíba, entre os anos de 2007 a 2015, foram registrados 348 novos casos de LV; os quais a capital João Pessoa notificou a maior quantidade de casos, 133 (38,21% do total), seguido por Campina Grande com 85 notificações (24,42% do total) (REIS et al., 2017).

O perfil epidemiológico das pessoas com leishmaniose, apresentado pelos órgãos de saúde do mundo, não retrata fielmente a realidade, devido à subestimação desses dados, com a existência de subnotificação da doença.

Acredita-se que esses números sejam ainda maiores do que aqueles registrados, principalmente pela leishmaniose ser uma das doenças mais negligenciadas pelos órgãos públicos (BERGER et al., 2017).

Figura 5 – Distribuição geográfica das leishmanioses no mundo em 2015



Fonte: Modificado de WHO, 2017b. (**A**) Distribuição da leishmaniose tegumentar em 2015; (**B**) Distribuição da leishmaniose visceral em 2015.

2.4 Manifestações clínicas

As diferentes respostas imunológicas do hospedeiro mamífero se correlacionam com as diferentes manifestações clínicas desenvolvidas pelos mesmos (REITHINGE et al., 2007; DAVID; CRAFT, 2009). A espécie do parasito envolvida na infecção, associada a fatores genéticos do hospedeiro e a capacidade do indivíduo em montar uma resposta imunológica capaz de controlar a infecção são variáveis para os diversos quadros clínicos desenvolvidos de leishmaniose em humanos (KAYE; SCOTT, 2011; MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

As leishmanioses compreendem manifestações clínicas sob as formas tegumentar e visceral (**Figura 6**). A leishmaniose tegumentar é caracterizada pela infecção do parasito na derme, e pode ser subdividida em quatro subtipos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC). A leishmaniose visceral apresenta tropismo pelas vísceras do hospedeiro mamífero, principalmente para os órgãos como baço e do fígado (SILVEIRA et al., 2009; REITHINGE et al., 2007).

As formas clínicas de leishmaniose abrangem uma ampla variedade de sinais, sintomas e graus de gravidade (GONZÁLEZ et al., 2009), também relacionadas a espécie do parasito envolvida. A leishmaniose tegumentar é causada por várias espécies distribuídas nas Américas e nos continentes europeu, asiático e africano, como a *L. amazonensis* e *L. braziliensis*; já a leishmaniose visceral é causada pela espécie *L. donovani* no Velho Mundo e pela *L. infantum*/*chagasi* no Novo Mundo (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

A LCL (**Figura 6A**) causa uma única lesão ou lesões ulceradas na pele, com bordas elevadas e fundo granuloso; sendo a de ocorrência mais comum entre os subtipos de leishmaniose tegumentar (DAVID; CRAFT, 2009; REITHINGE et al., 2007). No Brasil, ela é causada principalmente pela espécie *L. brasiliensis* (BRASIL, 2010), que quando tratada, apresenta uma boa resposta à terapêutica. Em indivíduos imunocompetentes, essa forma clínica tende à cura espontânea dentro de 2 a 15 meses (GOTO; LINDOSO, 2012; REITHINGE et al., 2007).

A LD (**Figura 6B**) é uma forma relativamente rara, que evolui progressivamente com múltiplas lesões na forma de pápulas, com pequenas ulcerações, as quais se localizam no corpo do hospedeiro em duas ou mais regiões

não próximas (GOTO; LINDOSO, 2012). Nesse quadro clínico, os pacientes costumam responder satisfatoriamente ao tratamento. Os agentes etiológicos comumente associados à leishmaniose cutânea disseminada são as espécies *L. braziliensis e L. amazonensis* (BRASIL, 2010; SILVEIRA et al., 2008), embora outras espécies também possam estar associadas a essa forma tegumentar (GOTO; LINDOSO, 2012).

Figura 6 - Formas clínicas das leishmanioses



Fonte: BRASIL, 2006; BRASIL, 2010. Manifestações clínicas das leishmanioses. (**A**) cutânea localizada; (**B**) cutânea disseminada; (**C**) cutânea difusa; (**D**) mucocutânea (**E**) visceral.

A LCD (**Figura 6C**) apresenta lesões não ulceradas, na forma de nódulos distribuídos por todo o corpo. Esta é uma manifestação clínica também rara, a qual acomete principalmente pacientes com algum comprometido imunológico. As espécies frequentemente associadas a este quadro clínico são a *L. aethiopica* no Velho Mundo e a *L. amazonensis* no Novo Mundo (GOTO; LINDOSO, 2012; SILVEIRA et al., 2008).

A LMC (**Figura 6D**) é uma doença considerada mutilante, caracterizada pela concentração das lesões na mucosa oral e nasal. As lesões da mucosa oral geralmente produzem sintomas que variam de um simples desconforto e dor leve para uma odinofagia a caquexia em casos extremos; o último é observado somente nos casos em que a lesão envolve a totalidade da faringe, laringe e esôfago (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Os pacientes acometidos da LMC não respondem com sucesso ao tratamento; e comumente, são pessoas que já tiveram a manifestação da forma cutânea (DAVID; CRAFT, 2009; REITHINGE et al., 2007). A espécie *L*. *braziliensis* está frequentemente associada a indivíduos acometidos por esse quadro clínico no Novo Mundo e a *L. aethiopica* no Velho Mundo (GOTO; LINDOSO, 2012).

A leishmaniose visceral (**Figura 6E**), também conhecida como calazar, é uma manifestação clínica sistêmica, marcada pelo desenvolvimento de sintomas como febre alta irregular, anemia e hepatoesplenomegalia, com imunossupressão e discrasias sanguíneas devido à infecção dos órgãos hematopoéicos (BERGER et al., 2017). É uma forma clínica grave, a qual leva ao óbito casos de pacientes não tratados (ZIJLSTRA et al., 2003). No continente amerciano, esse quadro clínico é causado principalmente pela espécie *Leishmania chagasi* (sinonímia *Leishmania infantum*) (FREITAS et al., 2016).

Durante a LV ou após a sua cura aparente, alguns pacientes podem desenvolver a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), principalmente em indivíduos de áreas endêmicas que tenham o sistema imunológico imunossuprimido, como nos países africanos (LINDOSO et al., 2012). A LDPC é caracterizada por apresentar máculas hipopigmentadas, pápulas, erupções cutâneas, tendo uma condição cutânea crônica e desfigurante, associada a considerável morbidade e estigma social, além de provavelmente contribuir para a transmissão do parasito (FREITAS et al., 2016). Tem uma incidência maior no Velho Mundo pela infecção pela espécie *Leishmania (Leishmania) donovani* (LINDOSO et al., 2012).

2.5 Terapêutica das leishmanioses

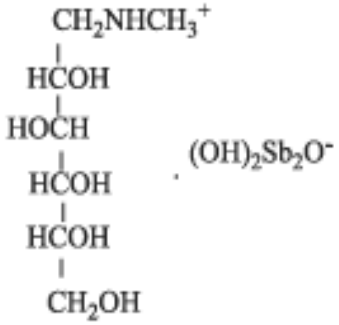
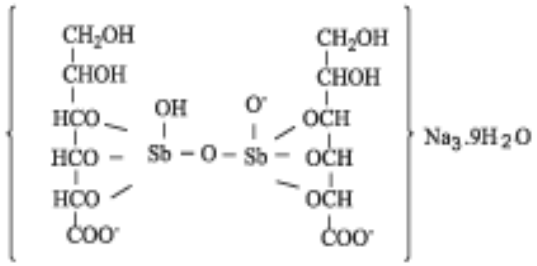
O tratamento das leishmanioses se baseia no uso principalmente dos medicamentos antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina [Glucantime®] e o estibogluconato de sódio [Pentostam®]), anfotericina B, pentamidina, paramomicina e miltefosina. Com a ausência de vacinas como medida profilática, a terapia farmacológica é a única opção de tratamento de um indíviduo parasitado. A terapia farmacológica atual é realizada por medicamentos com uma elevada toxicidade, inúmeros efeitos adversos, com longos períodos de tratamento, custos elevados e casos de resistência aos fármacos utilizados (**Quadro 1**) (SINGH, GARG, VAHAB et al., 2016).

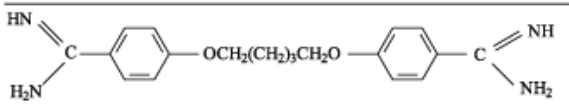
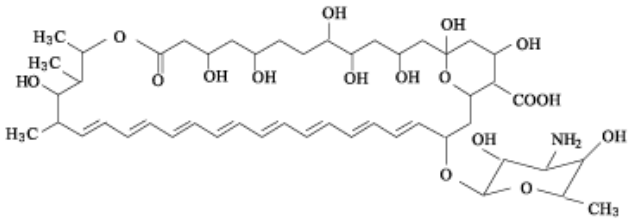
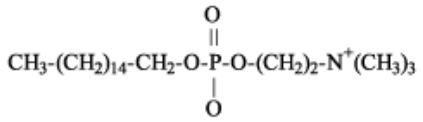
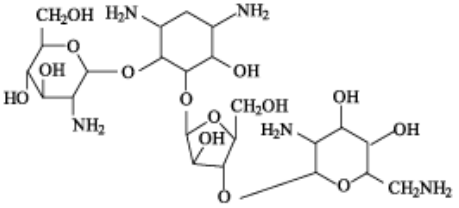
Os antimoniais pentavalentes (SB^V) são os medicamentos de primeira escolha, utilizados desde 1945 no tratamento de pacientes com leishmaniose. No Brasil, a droga de escolha é o antimoniato de meglumina (Glucantime®), usado para diversas manifestações clínicas com uma dose recomendada de 20 mg/kg/dia durante pelo menos 20 dias; sendo de administração parenteral obrigatória. Os pacientes apresentam a ocorrência de vários efeitos locais e sistêmicos, como dor no local da injeção, rigidez articular, fadiga, problemas gastrointestinais, pancreatite, cardiotoxicidade, insuficiência hepática e renal e hemólise (SINGH E SIVAKUMAR, 2004).

Embora o mecanismo de ação ainda não seja totalmente conhecido, os antimoniais pentavalentes apresentam a característica de pró-fármaco do SbV, sendo este metabolizado no interior de macrófagos e do parasito à forma trivalente ativa (FRÉZARD et al., 2013). Essa conversão também pode ocorrer por reações não enzimáticas, através da presença dos tióis glutationa e da tripanotiona; ou de forma enzimática, mediada pelas enzimas tiol dependente redutase 1 e a antimoniato redutase (SINGH, GARG, VAHAB et al., 2016).

Quando não há uma resposta adequada ao tratamento com os medicamentos de primeira escolha, as drogas de segunda escolha são utilizadas, como a anfotericina B®, a pentamidina, a paramomicina e a miltefosina. A anfotericina B é um antibiótico macrólideo polieno, utilizado como droga de referência para infecções fúngicas sistêmicas (OULELLETE et al., 2004).

Quadro 1 – Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses

Fórmula estrutural proposta	Nome químico Nome comercial
	Antimoniato de N-metilglucamina[14] Glucantime®; Antimoniato de meglumina
	Gluconato de antimônio (V) sódico [14,17] ou Estibogluconato de sódio Pentostam® Solustibosan®

Fórmula estrutural	Nome Químico/ Nome comercial
	Isetionato de pentamidina[18] Lomidina
	Anfotericina B[18] Fungizone
	Miltefosine[30]
	Paromomicina[18] Humatin

Fonte: RATH et al., 2003.

A anfotericina B possui ação leishmanicida, principalmente, no tratamento das lesões mucosas e é indicada como primeira opção no tratamento de pacientes gestantes com LC e/ou com coinfecção *Leishmania*/HIV (BRASIL, 2011b). A administração da anfotericina B é por via intravenosa a uma dose de 0,5-1,0 mg/kg diariamente ou em dias alternados, durante 8 semanas ou 3 mg/kg/dia durante 21 dias (PURKAIT et al., 2012; CROFT; SUNDAR; FAIRLAM, 2006).

O alvo de ação da anfotericina B são os esteróis localizados na membrana celular do parasito. A permeabilidade celular é alterada com a perda de potássio e outras pequenas moléculas pela célula, causando a morte do parasito (CROFT; SUNDAR; FAIRLAM, 2006; PURKAIT et al., 2012). No entanto, apesar dos seus reconhecidos efeitos terapêuticos, a maioria dos pacientes apresentam efeitos adversos como febre, náuseas, vômitos, cefaleia, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas (SINGH, GARG, VAHAB et al., 2016). Uma nova formulação foi aprovada em 1997 para o tratamento da LV, a anfotericina lipossomal. É um medicamento menos tóxico e que causa menos efeitos colaterais, porém mais caro do que a anfotericina B (FREITAS, et al., 2016; SINGH, GARG, VAHAB et al., 2016).

A pentamidina é um fármaco de segunda escolha, principalmente para o tratamento da LV; embora apresente efeitos adversos significativos e administração parenteral (OULLETE et al., 2004). O mecanismo de ação está relacionado com a ligação e desintegração do DNA e inibição da topoisomerase I, associada à replicação do DNA mitocondrial (COELHO et al., 2008; JEAN-MORENO et al., 2006). É uma diamina aromática que apresenta efeitos adversos como mialgias, dor no local da injeção, náusea, dor de cabeça, e em maior extensão, hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade; com a administração em baixas doses e em um curto período de tratamento. Há relatos de morte repentina pela alta toxicidade desta droga, sendo isso um fator limitante para o seu emprego terapêutico (SINGH, GARG, VAHAB et al., 2016).

A paromomicina é um aminoglicosídeo, com mecanismo de ação caracterizado pela inibição da síntese proteica, além de interferir na fluidez da membrana, metabolismo lipídico e potencial de membrana mitocondrial da *Leishmania* (RAJASEKARAN e CHEN, 2015). Esta droga é administrada por via endovenosa, na dose de 16-20 mg/kg diariamente durante 21 dias, ou 12-20 mg/kg/dia em combinação com antimoniais. Efeitos tóxicos, como nefrotoxicidade,

hepatotoxicidade e ototoxicidade são associados com excessos de doses recomendadas e o uso concomitante de outros agentes com toxicidades similares (SINGH, GARG, VAHAB et al., 2016). Casos de resistência foram relatados em isolados de promastigotas de *L. aethiopica* e *L. donovani* associada com a absorção diminuída da droga (SOARES et al., 2002).

A miltefosina foi desenvolvida para o tratamento do câncer, tendo sua atividade anti-*Leishmania* descoberta pela década de 1980. Esta droga é uma alquilfosfocolina, com mecanismo de ação ainda não totalmente esclarecido. Sua atuação em *Leishmania* deve ser da mesma forma que a atuação dessa droga em células cancerígenas, com indução da apoptose e alteração das vias de sinalização celular mediada por lipídeos (SUNDAR; OLLIARO, 2007). A administração é por via oral de 50-200 mg/kg durante 28 dias, tendo como efeitos adversos distúrbios gastrintestinais, transaminases hepáticas elevadas e os níveis de creatinina sérica, teratogenicidade e hemólise (SUNDAR; OLLIARO, 2007; CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006).

A elevada toxicidade desses medicamentos e o surgimento de resistência às drogas justifica a busca de novas alternativas para o tratamento adequado das leishmanioses. Apesar da pesquisa envolvida para a descoberta de terapias eficazes anti-*Leishmania* ser uma preocupação mundial, o progresso nesse campo tem sido muito lento e pouco expressivo. A vacinação aparece, então, como uma possível maneira de se controlar a leishmaniose, contudo, até agora, poucas foram as estratégias de imunização para humanos. Portanto, todos os fármacos atualmente em uso para o tratamento das leishmanioses apresentam restrições, como toxicidade, graves efeitos colaterais, custo elevado, administração parenteral ou teratogenicidade (BRASIL, 2011a). Desta forma, se faz necessário o desenvolvimento de fármacos que promovam tratamentos mais eficazes, seletivos, seguros e menos tóxicos do que às drogas convencionais. Dessa forma, estudos com produtos naturais ou sintéticos representam uma perspectiva na busca de novas drogas com atividade anti-*Leishmania*.

2.6 Adutos de Morita-Baylis-Hillman

Na perspectiva do estudo de compostos naturais ou sintéticos, com melhores características farmacocinéticas e farmacodinâmicas para o uso no tratamento das

leishmanioses; os compostos sintéticos oriundos da reação química de Morita-Baylis-Hillman se apresentam como candidatos promissores nesse estudo de atividade biológica anti-*Leishmania*.

Essa reação foi patenteada em 1972, por Baylis e Hillman, em que se referiam a uma reação de acoplamento entre alcenos ativos (ou alcinos) e aldeídos, sendo catalisada por aminas terciárias, produzindo uma variedade de moléculas sintéticas. Essa reação envolve inicialmente a síntese do aceptor de Michael (alceno ativado), seguido da reação de Morita-Baylis-Hillman, empregando aldeídos aromáticos como eletrófilos. Diante das grandes variações de parâmetros, essa reação nos fornece um enorme reservatório de moléculas de classes diversas, densamente funcionalizadas. Existem inúmeros aceptores de Michael que podem se ligar a qualquer carbono eletrofílico (deficiente de elétrons), justificando a obtenção a partir dessa reação de bilhões de moléculas (BASAVAIAH E VEERARAGHAVAIAH, 2012).

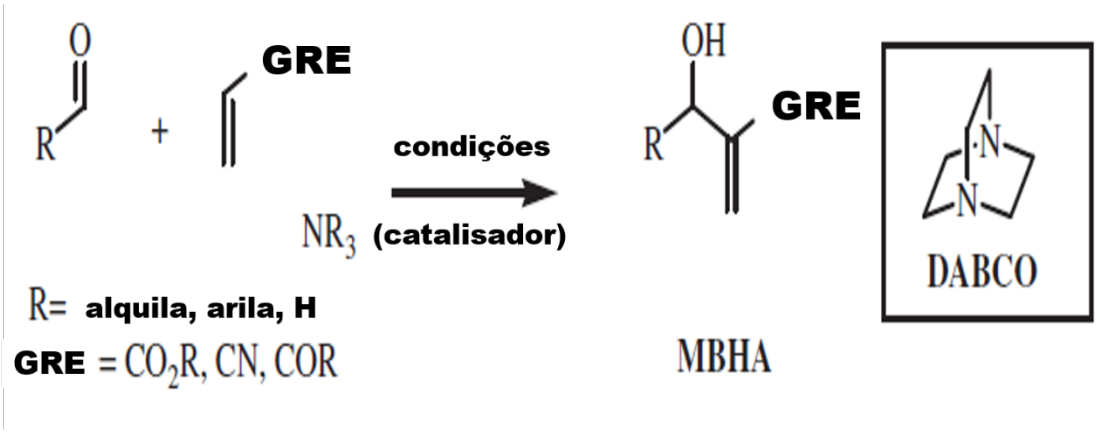
A reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH) (**Figura 7**) ocorre com a formação da ligação carbono-carbono (C-C), que ocorre entre um carbono sp^2 eletrofílico (por exemplo, aldeídos, cetonas ou iminas) e a posição alfa de um alceno (ou alcino) ativado, ou seja, que contém um grupo retirador de elétrons (GRE) na sua molécula. Essa reação ocorre sob a catálise nucleofílica de aminas terciárias, das quais o mais utilizado é a 1,4-diazabiciclo[2.2.2]octano (DABCO), gerando os adutos de Morita-Baylis-Hillman (MBH-A) (XAVIER, et al., 2014; JUNIOR, et al., 2010).

Nenhum grupo de moléculas se comporta de forma uniforme nas sínteses, além das alterações de alguns parâmetros para melhor obtenção (temperatura, solvente, catalisadores), buscando maior pureza e menores tempos de reação. Poucos grupos de estudos atuam na utilização dos compostos sintéticos oriundos da reação de MBH com aplicação biológica. Além disso, a infinidade de possibilidade de criação de novas moléculas torna cada novo composto químico sintetizado uma inovação dentro do campo de estudo.

Baseadas em estratégias da Química Medicinal, foram utilizadas técnicas químicas tradicionais junto com a reação de Morita-Baylis-Hillman. As moléculas usadas nesse trabalho são oriundas das estratégias de hibridação molecular e de “twin drugs” ou “drogas gêmeas”, sendo o nosso grupo de pesquisa o primeiro a trabalhar nesse campo de síntese e com atividade biológica desses compostos com o parasito do gênero *Leishmania*. As moléculas avaliadas são substâncias

estruturalmente relacionadas uma à outra e sintetizadas pela mesma rota sintética. Contudo, a reação final para obtenção dos adutos seja a mesma (reação de MBH), as etapas anteriores são diferentes, dependendo da série estudada (hibridação ou "twins drugs") (BARREIRO e FRAGA 2001).

Figura 7 – Reação de Morita-Baylis-Hillman



Fonte: modificado de BARBOSA et al. 2011. R – radical. GRE – grupo retirador de elétrons.

Outras substâncias oriundas da reação química de MBH já foram avaliadas e apresentaram várias atividades biológicas como atividade antifúngica e antibacteriana (NARENDER et al., 2006), efeito anti-inflamatório (FAHEINA-MARTINS et al., 2017) e atividade contra diversas doenças negligenciadas como a leishmaniose (XAVIER et al., 2016; SILVA et al., 2011; JUNIOR et al., 2010; BARBOSA et al., 2011; LIMA-JUNIOR et al. 2009; SOUZA et al., 2007), a esquistossomose (VASCONCELLOS et al., 2006), a malária (NARENDER et al., 2005) e a doença de Chagas (SANDES et al., 2014; SANDES et al., 2010). Observando o potencial biológico dessas moléculas avaliadas anteriormente, justifica-se que novos compostos oriundos da reação de MBH se apresentem como candidatos promissores nesse estudo de atividade biológica.

A atividade anti-*Leishmania* de compostos sintéticos oriundos da reação MBH foi evidenciada em testes com adutos aromáticos (JUNIOR et al., 2010), como também com adutos derivados do salicilato de metila por hibridação molecular (BARBOSA et al., 2011), sob as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, as quais são espécies associadas à leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral, respectivamente. Contudo, ainda não se tem conhecimento sobre o mecanismo biológico dessas moléculas sintéticas.

Um aduto, oriundo da estratégia química de hibridação molecular entre o salicilato de metila e um aduto derivado do orto-nitro-benzaldeído, mostrou atividade anti-*Leishmania* sob as formas promastigotas de isolados clínicos de *L. braziliensis*, como também eficaz na redução da taxa de infecção desses parasitos em macrófagos murinos. Sugere-se a atuação destes compostos na regulação das moléculas que modulam a ativação dos macrófagos ou atuação no processo de estresse oxidativo. Os estudos mostraram a diminuição na síntese de certas citocinas responsáveis por inibir a ativação de macrófagos, como IL-6 e IL-10. Dessa forma, a redução na produção de IL-6 e IL-10 pode facilitar a ativação destes macrófagos e, levar assim a contenção da infecção por *Leishmania* (AMORIM et al., 2013).

Xavier e colaboradores (2014) fizeram a primeira avaliação da atividade de adutos de Morita-Baylis-Hillman racêmicos e enantiômeros puros. O composto racêmico apresentou melhor atividade biológica sobre formas promastigotas de *L. braziliensis*, como também baixa citotoxicidade para macrófagos murinos, em comparação com os compostos enantiomêricos.

Devido às atividades biológicas dos adutos Morita-Baylis-Hillman e a gama de efeitos destes sobre algumas espécies de *Leishmania,* esses compostos são uma fonte rica de candidatos em potencial a medicamentos contra a leishmaniose. O mecanismo de ação pode variar de acordo com a estrutura química da molécula, portanto, acredita-se que não há um único mecanismo biológico de ação para todos os adutos Morita-Baylis-Hillman. Devido à versatilidade das estruturas destes compostos, cada série de adutos pode ter diferentes mecanismos de ação, bem como diferentes rotas metabólicas, que amplia ainda mais o desafio de buscar o caminho que cada molécula dessa pode atuar.

Dessa forma, justifica-se o estudo com novos compostos oriundos da estratégia química hibridação molecular, como também a avaliação biológica dos compostos “twins drugs” contra as formas promastigotas e amastigotas de algumas espécies de *Leishmania*; citotoxicidade dessas moléculas sobre células de mamíferos e possíveis mecanismos de ação responsáveis pela atividade anti-*Leishmania*. As informações adquiridas pela realização deste trabalho ampliam os conhecimentos na área das leishmanioses e levam ao desenvolvimento de novos estudos que possam beneficiar diretamente a população de indivíduos infectados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar a atividade biológica dos compostos sintéticos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman sobre os parasitos do gênero *Leishmania*.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos compostos sintéticos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman sobre as formas promastigotas de *L. donovani*;

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* de MBH-A12 e MBH-A13 sobre as formas promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*;

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos compostos sintéticos adutos Morita-Baylis-Hillman MBH-A12 e MBH-A13 sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* e *L. amazonensis*;

- Investigar o efeito citotóxico dos compostos MBH-A12 e MBH-A13 sobre as células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis e sobre os eritrócitos humanos;

- Determinar o índice de seletividade dos adutos de Morita-Baylis-Hillman;

- Avaliar a ação dos compostos MBH-A12 e MBH-A13 na taxa de infecção de monócitos humanos por parasitos da espécie *L. infantum* e *L. amazonensis*, além da avaliação na indução da síntese de óxido nítrico;

- Analisar se os compostos sintéticos MBH-A12 e MBH-A13 induzem morte por apoptose/necrose em formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LABIDIC), do Departamento de Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB),como também, no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Biologia Molecular (DBM) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da UFPB.

4.2 Parasitos e manutenção das culturas *in vitro*

As cepas de referência de *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* (MHOM/ET/1967/HU3), *Leishmania* (*Leishmania*) infantum (MHOM/BR/2008/RN-05), *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram obtidas da Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), localizada no Rio de Janeiro – RJ. As espécies de *Leishmania* foram enviadas com o certificado de autenticação (**ANEXO A, B e C**) para o Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas da Universidade Federal da Paraíba.

As formas promastigotas dessas espécies de *Leishmania* foram mantidas *in vitro* em meio Schneider com pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, São Paulo, BRA), 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL - Gibco, BR) e 1% de urina masculina humana, denominado neste trabalho de meio Schneider suplementado. As culturas foram mantidas a uma temperatura de 26 ± 1 ºC em estufa de demanda biológica de oxigênio (DBO) e repicadas semanalmente.

As culturas de formas promastigotas em início de fase estacionária, de 4 a 6 dias dependendo da espécie, foram criopreservadas em 12% de glicerol estéril (Amresco, Ohio, EUA) sob agitação constante por 15 minutos e então armazenadas em freezer a -80 ºC para futuras utilizações. Com a mesma finalidade, as formas promastigotas foram criopreservadas em 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO)

(Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, São Paulo, BRA) e 70% do meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) (Cultilab, São Paulo, Brazil), sendo armazenadas em freezer a -80 ºC. O DMSO e o glicerol, como criopreservantes, penetram na membrana celular dos microorganismos, sendo o DMSO de rápida difusão e o glicerol de lenta penetração. Para algumas espécies de microorganismos, o DMSO é um melhor criopreservante do que o glicerol. As céulas que serão criopreservadas em DMSO devem ser mantidas em baixas temperaturas antes do congelamento, já que de 0 a 5 ºC, esse criopreservante é menos tóxico para as células (ÇAVUS, et al. 2017; MIYAKE, KARANIS, UGA, 2004). De acordo com a necessidade, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e alíquotas de 100 µL foram colocadas em 5 mL de meio Schneider suplementado e mantidas em estufa de DBO à 26 ± 1ºC.

4.2.1 Obtenção das formas amastigotas axênicas de *L. infantum* e *L. amazonensis*

As formas promatigotas de *L. infantum* foram diferenciadas em formas amastigotas axênicas conforme o protocolo de DEBRABANT et al., 2003. As formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas até atingirem a fase estacionária em meio Schneider suplementado durante 5 dias, à 26 ± 1 ºC. Após esse período, as culturas foram centrifugadas durante 10 minutos a 112 x g (centrífuga PARSEC CT0603)], desprezado o sobrenadante e ressuspendidas em meio Schneider suplementado, com pH 7, suplementado com 20% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL). As células foram então incubadas a 37 ºC em estufa a 5% de CO_2 por 24 horas para diferenciação em formas amastigotas. A morfologia característica de amastigota foi analisada sob microscopia óptica antes de cada experimento.

A partir da diferenciação das formas promastigotas de *L. amazonensis* foram obtidas as formas amastigotas axênicas, conforme modificações nos protocolos de UEDA-NAKAMURA et al., 2006 e HODGKINSON et al., 1996. As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas até atingirem a fase estacionária em meio Schneider suplementado durante 5 dias, à 26 ± 1 ºC. Após esse período,

as culturas foram centrifugadas durante 10 minutos a 112 x g (centrífuga PARSEC CT0603), desprezado o sobrenadante e ressuspendidas em meio Schneider, com pH 5,5, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL). As células foram então incubadas a 32 ºC em estufa a 5% de CO_2 por três dias para diferenciação em formas amastigotas, sendo diariamente agitadas. A morfologia característica de amastigota foi analisada sobre microscopia óptica antes de cada experimento.

4.3 Compostos químicos avaliados

4.3.1 Fármacos de referência

Os fármacos utilizados nos protocolos de atividade anti-*Leishmania* foram o antimoniato de meglumina (Glucantime® – Sanofi-Aventis Farmacêutica, São Paulo, BRA) e a anfotericina B (Anforicin B® – Cristália, São Paulo, Brazil), os quais são utilizados no tratamento de diferentes formas clínicas das leishmanioses, como medicamentos de primeira e segunda escolha respectivamente. O antimoniato de meglumina é apresentado em uma solução aquosa de 300 mg/mL, o qual foi diluído diretamente nos meios de cultura apropriados para cada teste. A anfotericina B, apresentada na forma de pó liófilo, foi solubilizada previamente em DMSO e assim produzido uma solução-estoque de 10 mg/mL. Posteriormente, essa solução foi diluída nos meios de cultura apropriados até atingir as concentrações finais desejadas de cada teste, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO, para não ser tóxica ao parasito.

4.3.2 Compostos sintéticos adutos de Morita-Baylis-Hillman

As amostras dos compostos sintéticos oriundos da reação de Morita-Bayllis-Hillman foram sintetizadas e cedidas pelo Laboratório de Síntese Orgânica e Medicinal da Paraíba (LASOM - PB), coordenado pelos professores Dr. Mário Vasconcellos e Dr. Cláudio Gabriel, do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba.

Os compostos químicos estudados neste trabalho foram sintetizados conforme protocolos experimentais já publicados em trabalhos anteriores (LIMA-JUNIOR et al., 2016) e envolveram inicialmente a síntese do aceptor de Michael, seguido da reação de Morita-Baylis-Hillman, empregando aldeídos aromáticos como eletrófilos.

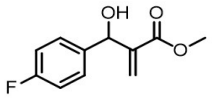
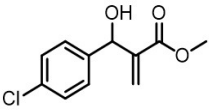
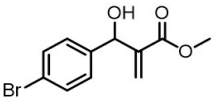
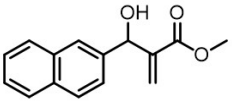
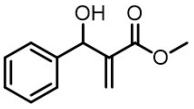
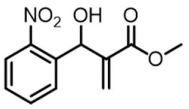
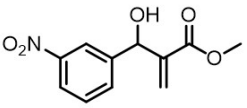
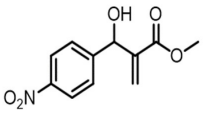
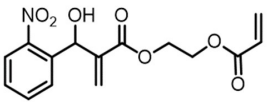
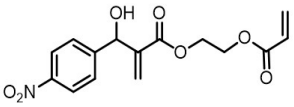
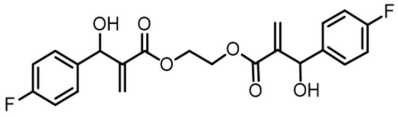
Para a obtenção das moléculas testadas foi utilizada a técnica de hibridação molecular, a qual se investigou se as duas porções unidas possuíam atividades semelhantes ou não aos fragmentos testados separadamente. Como também foi utilizados compostos homodímeros, usando a estratégia química denominada pelos químicos medicinais como “twin drugs” ou “drogas gêmeas”.

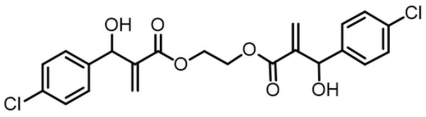
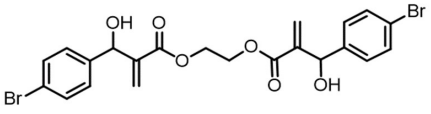
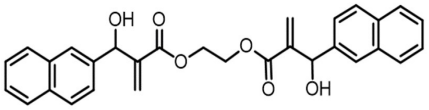
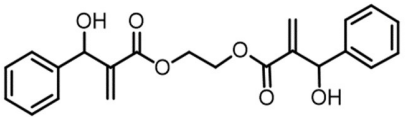
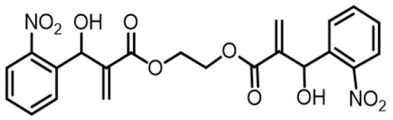
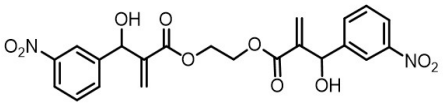
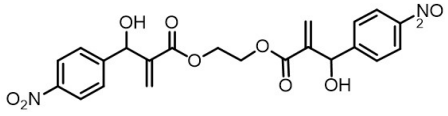
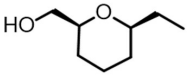
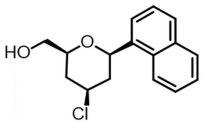
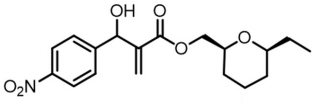
A reação final para a obtenção dessas moléculas avaliadas é a MBH, contudo as etapas anteriores são diferentes, dependendo da série estudada (hibridação ou “twins drugs”) (BARREIRO e FRAGA 2001). Para a série de hibridação, houve um número maior de etapas, sendo as moléculas oriundas via reações de Barbier e posterior ciclização de Prins. Em seguida, foi preparado o aceptor de Michael via reação de esterificação, para então gerar os produtos híbridos via reação de MBH. Na série dos homodímeros, primeiro ocorreu a preparação do aceptor de Michael (alceno ativado) e posterior reação de MBH.

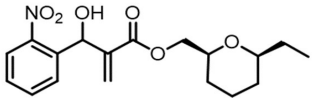
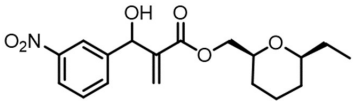
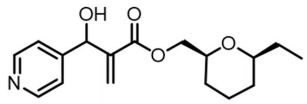
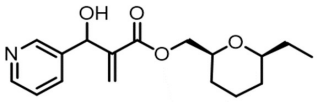
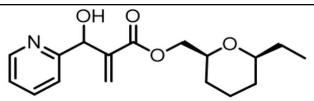
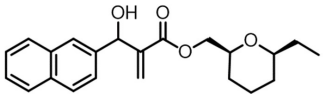
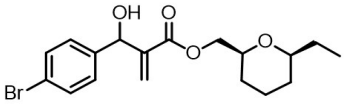
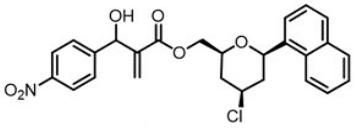
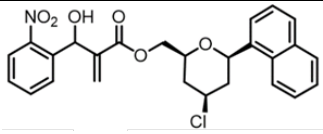
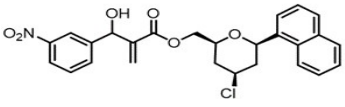
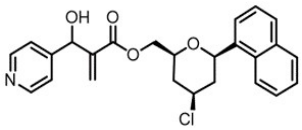
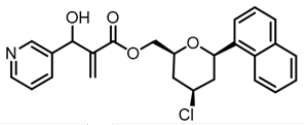
É importante salientar que cada molécula tem sua particularidade em relação à via de síntese, obtenção, rendimento e tempo de reação. Pequenas variações na estrutura das moléculas iniciais (matérias-prima), já ocasionam alterações em relação ao rendimento, por exemplo. A infinidade de possibilidades de criação de novas moléculas oriundas da reação de MBH gera expectativa na avaliação da atividade biológica de cada novo composto sintetizado.

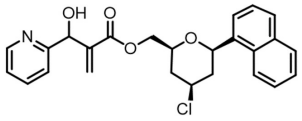
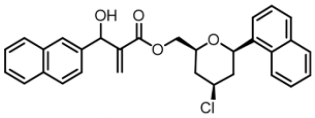
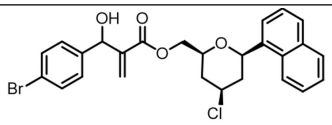
Inicialmente, foram testadas trinta e seis moléculas oriundas da reação de Morita-Baylis-Hillman, as quais apresentam solubilidade em DMSO ou CH_2Cl_2 (diclorometano), à 25 ºC e 1 atm. Para os testes *in vitro* as substâncias foram solubilizadas em DMSO a fim de se obter soluções-estoque de 20 mg/mL. Em cada protocolo, as soluções-estoque foram diluídas nos meios de cultura apropriados até atingirem as concentrações desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO, para que não sejam tóxicas para o parasito *Leishmania*. Essa mesma concentração de DMSO (< 0,5%) é utilizada como controle negativo nos testes realizados. A **Tabela 1** demonstra a massa molecular e a estrutura química das substâncias testadas.

Tabela 1 - Massa molecular e estrutura química dos compostos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman

Código das Amostras	Massa Molecular (g/mol)	Estrutura Química
MBH-01	210,1	
MBH-02	226,0	
MBH-03	270,0	
MBH-04	242,1	
MBH-05	172,10	
MBH-06	237,1	
MBH-07	237,1	
MBH-08	237,1	
MBH-09	321,1	
MBH-10	321,1	
MBH-11	418,1	

Código das Amostras	Massa Molecular (g/mol)	Estrutura Química
MBH-12	450,1	
MBH-13	538,0	
MBH-14	456,2	
MBH-15	382,1	
MBH-16	472,1	
MBH-17	472,1	
MBH-18	472,1	
MBH-19	144,1	
MBH-20	276,1	
MBH-21	349,38	

Código das Amostras	Massa Molecular (g/mol)	Estrutura Química
MBH-22	349,38	
MBH-23	349,38	
MBH-24	365,37	
MBH-25	365,37	
MBH-26	365,37	
MBH-27	354,44	
MBH-28	383,28	
MBH-29	481,13	
MBH-30	481,13	
MBH-31	481,13	
MBH-32	437,14	
MBH-33	437,14	

Código das Amostras	Massa Molecular (g/mol)	Estrutura Química
MBH-34	437,14	
MBH-35	486,16	
MBH-36	514,05	

Fonte: Elaboração própria.

4.4 Atividade anti-*Leishmania* dos compostos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman sobre formas promastigotas de *L. donovani*

A atividade anti-*Leishmania* dos 36 compostos sintéticos adutos de Morita-Baylis-Hillman foi avaliada utilizando o teste colorimétrico do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT - Amresco, Ohio, EUA) sobre as formas promastigotas da espécie *L. donovani*. Em placas de cultivo de 96 poços, foram adicionados 1 x 10^6 promastigotas/poço contendo 100 µL de meio Schneider suplementado, e em seguida as soluções estoques dos adutos de Morita-Baylis-Hillman e fármacos de referência foram adicionadas às placas, em triplicata, atingindo concentrações seriadas de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,12 e 3,12 µg/mL para os compostos testes; de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 e 0,04 µg/mL para a Anfotericina B e de 150; 75; 37,5; 18,75; 9,38; 4,69; 2,34 e 1,17 mg/mL do antimoniato de meglumina. Essas concentrações foram ajustadas quando necessário, devido à atividade biológica das moléculas. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa de DBO à 26 ºC. Ao final da incubação, foi adicionado 10 µL de MTT diluído em PBS (salina fosfatada tamponada) a uma concentração final de 5 mg/mL e incubadas por mais 4 horas em estufa DBO à 26 ºC. Em seguida foram adicionados 50 µL de dodecil sulfato de sódio (DSS) a 10%. A placa foi incubada overnight para dissolução completa do formazan e por último, foi realizado a leitura em espectrofotômetro 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800) (RODRIGUES et al., 2015). Os resultados foram expressos em porcentagem de

inibição e em valores de concentração inibitória mínima, onde foi inibido 50% do crescimento de formas promastigotas (CI_{50}), sendo o controle negativo realizado em meio Schneider suplementado a 0,5% de DMSO e considerado como 0% de inibição do crescimento dos parasitos.

4.5 Seleção dos adutos de Morita-Baylis-Hillman e avaliação da atividade anti-*Leishmania* sobre formas promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

Após o screening inicial de atividade anti-*Leishmania* sobre as formas promastigotas de *L. donovani* (item 4.4) com os 36 compostos sintéticos, foram selecionados 2 compostos sintéticos adutos derivados da reação Morita-Baylis-Hillman para continuar as avaliações biológicas. Esses compostos se mostraram mais potentes, de acordo com os valores de concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI_{50}), como também foram escolhidos por serem do mesmo processo de obtenção sintética ("twin drugs"). Após a seleção, esses dois compostos foram avaliados quanto à atividade anti-*Leishmania* sobre as formas promastigotas das espécies *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* pelo teste colorimétrico do MTT, seguindo o mesmo protocolo da atividade *anti-Leishmania* sobre as formas promastigotas de *L. donovani* (item 4.4).

4.6 Atividade anti-*Leishmania* dos compostos MBH-A12 e MBH-A13 sobre formas amastigotas axênicas de *L. infantum*

A atividade anti-*Leishmania* sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* foi avaliada utilizando o teste colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT – Amresco, Ohio, EUA). Em placas de 96 poços, foram adicionadas as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* obtidas conforme o item 4.2.1, ajustadas na quantidade de 1 x 10^6 leishmanias/poço, contendo 100 µL de meio Schneider, pH 7 suplementado a 20% de SFB e diferentes concentrações seriadas de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,12 e 3,12 µg/mL para as moléculas testes; de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 e 0,04 µg/mL para a Anfotericina B e de 150; 75; 37,5; 18,75; 9,38; 4,69; 2,34 e 1,17 mg/mL do

antimoniato de meglumina. Essas concentrações foram ajustadas quando necessário, devido à atividade biológica das moléculas. As placas foram incubadas em estufa de CO_2 a 5% à 37 ºC por 24 h. Após a incubação foram adicionados 10 µL de MTT diluído em PBS, atingindo uma concentração final de 5 mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4 h e em seguida, foram adicionados 50 µL de uma solução de PBS a 10% de DSS. A placa ficou overnight para dissolução completa do formazan e então foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800) (UEDA-NAKAMURA et al., 2006). O controle negativo foi realizado com meio Schneider, pH 5,5 e 5% de SFB a 0,5% de DMSO, considerado como 100% de viabilidade dos parasitos. Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade e em valores de concentração efetiva sobre 50% de amastigotas (CE_{50}).

4.7 Atividade anti-*Leishmania* dos compostos MBH-A12 e MBH-A13 sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

A atividade anti-*Leishmania* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* foi avaliada utilizando o teste colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT – Amresco, Ohio, EUA). Em placas de 96 poços, foram adicionadas as formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* obtidas conforme item 4.2.1, ajustadas na quantidade de 1 x 10^6 leishmanias/poço, contendo 100 µL de meio Schneider pH 5,5 suplementado a 5% de SFB e diferentes concentrações seriadas de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,12 e 3,12 µg/mL para os compostos testes; de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 e 0,04 µg/mL para a Anfotericina B e de 150; 75; 37,5; 18,75; 9,38; 4,69; 2,34 e 1,17 mg/mL do antimoniato de meglumina. Essas concentrações foram ajustadas quando necessário, devido à atividade biológica das moléculas. As placas foram incubadas em estufa de CO_2 a 5% à 32 ºC por 24 h. Após a incubação foram adicionados 10 µL de MTT diluído em PBS, atingindo uma concentração final de 5 mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4 h e em seguida, foram adicionados 50 µL de uma solução de PBS a 10% de DSS. A placa ficou overnight para dissolução completa do formazan e então foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800) (UEDA-NAKAMURA *et al*., 2006). O controle negativo foi realizado com meio Schneider pH 5,5 e 5% de SFB a 0,5% de DMSO,

considerado como 100% de viabilidade dos parasitos. Os resultados foram expressos em porcentagens de citotoxicidade e valores de concentração efetiva sobre 50% de amastigotas (CE_{50}).

4.8 Obtenção de células sanguíneas humanas

Amostras de sangue foram coletadas de voluntários saudáveis (n = 9), em tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para os ensaios com eritrócitos; ou com anticoagulante heparina para obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSP). Todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste trabalho participaram voluntariamente da pesquisa, sendo selecionados através da aplicação de um questionário (**ANEXO D**) e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**ANEXO E**). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) – CEP/HULW (Número do Parecer 2.560.097 e CAAE: 82944118.5.0000.5188 (**ANEXO F**)).

4.8.1 Obtenção e citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano pelo teste do MTT

Para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico foi coletado sangue humano de voluntários saudáveis (n = 9) em tubos com heparina, o qual foi diluído no mesmo volume em PBS. Montou-se o gradiente para a centrifugação utilizando o Ficoll, vertendo o sangue, bem devagar, em um tubo Falcon de 50 mL contendo o Ficoll na mesma quantidade de sangue. Centrifugou-se a 200 x g, por 40 minutos à temperatura ambiente. As células vermelhas e os granulócitos têm uma densidade maior do que o Ficoll, posicionam-se abaixo da camada de Ficoll, enquanto que as células mononucleares e as plaquetas foram coletadas no topo da camada de Ficoll por apresentarem uma baixa densidade. O anel de CMSP foi coletado e transferido para um tubo Falcon de 50 mL estéril, completando o volume para 45 mL com PBS estéril para lavar as células, sendo realizado outra centrifugação a 200 x g por 10 minutos a 4 ºC. As plaquetas foram separadas do CMSP por subsequentes lavagens. O sobrenadante foi desprezado e o processo de lavagem das células foi repetido por duas vezes, sendo no final as células

ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI. Uma alíquota das células foi diluída em corante Azul de Trypan 0,4% (190 µL de célula + 10 µL de azul de Trypan) para contagem em câmera de Neubauer e determinação do número de células viáveis na suspensão celular (MACIEL et al., 2014).

Em placa de 96 poços foram ajustadas as CMSP em uma quantidade de 2,5 x 10^5 por poço, sendo incubadas com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13, antimoniato de meglumina e anfotericina B nas concentrações de 1x e 4x os valores de CI_{50}, completando o volume de 200 µL com meio RPMI. A placa ficou incubada durante 24 horas em uma estufa a temperatura de 37 ºC com 5% de CO_2. Ao final da incubação, foi adicionado 10 µL de MTT diluído em PBS a uma concentração final de 5 mg/mL. A placa foi incubada por mais 4 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37 ºC, e em seguida foi adicionado 50 µL de DSS a 10%. A placa permaneceu em overnight para dissolução do formazan e por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800). O controle negativo foi realizado com meio RPMI suplementado a 0,5% de DMSO, considerado como 100% de viabilidade dos parasitos e os resultados foram expressos em valores de concentração citotóxica para 50% das CMSP (CC_{50}).

4.8.2 Citotoxicidade frente a eritrócitos humanos

Na avaliação da atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos humanos com tipo sanguíneo O^+, coletado com anticoagulante EDTA de voluntários saudáveis (n = 9). Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida, foram adicionadas as substâncias a serem analisadas em concentrações seriadas de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,12 e 3,12 µg/mL para os compostos sintéticos MBH-A12 e MBH-A13; de 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,63 mg/mL para o antimoniato de meglumina, e de 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL para a Anfotericina B, diluídos num volume de 20 µL de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 hora a 37 ºC e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 112 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e transferido para placas de 96 poços, sendo submetido à espectrofotometria com comprimento de onda de 550 nm para quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo)

foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. O experimento foi feito em duplicata, em três experimentos independentes e os resultados foram expressos em concentração hemolítica média (CH_{50}), considerando o controle positivo como 100% de hemólise (JAIN et al., 2015).

4.9 Determinação do índice de seletividade do MBH-A12 e do MBH-A13

O índice de seletividade (IS) é o valor que indica quantas vezes uma substância é mais seletiva para o parasito *Leishmania spp.* do que para a célula mamífera (CMSP ou eritrócitos), calculado a partir dos resultados de CI_{50}, CE_{50}, CC_{50}, CH_{50}. Dessa forma o cálculo do IS é determinado pela razão da CI_{50} ou CE_{50} por cada CC_{50} e CH_{50}.

4.10 Atividade dos compostos sintéticos MBH-A12 e MBH-A13 sobre a taxa de infecção de monócitos humanos por *L. infantum* e *L. amazonensis*

As formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* e *L. amazonensis* (4 x 10^7 parasitos/mL) foram marcadas com CFSE (CellTrace ™ CFSE Cell Proliferation Kit). A solução de CFSE foi adicionada aos parasitos em uma concentração final de 5 mM. A suspensão foi incubada por 15 minutos em estufa a 5% de CO_2, 37 ^oC e lavadas 3 vezes em tampão PBS para retirada do excesso de CFSE não fixado aos parasitos. Paralelamente, foram coletadas as células sanguíneas de voluntários saudáveis (n = 9), em tubos com anticoagulante heparina, que seguiram todos os passos do protocolo, onde se avaliou diferentes condições, células em cultura sem infecção e com infecção por *L. infantum* e *L. amazonensis*. As células mononucleares de sangue periférico humano foram obtidas através do gradiente de Ficoll (explicado anteriormente). A infecção das CMSP por *L. infantum* e *L. amazonensis* marcadas com CFSE (descrito anteriormente) ocorreu na proporção de 1 monócito : 10 *Leishmanias* no tempo de 3 horas. As células foram mantidas em estufa a 5% CO_2 e 37 ^oC. Após o tempo de infecção, as células foram lavadas três vezes com PBS suplementado com 10% de SFB. Após a infecção, as células foram plaqueadas em placa de 96 poços (2,5 x 10^5 células/poço), sendo incubadas com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e Anfotericina B nas concentrações de 1x

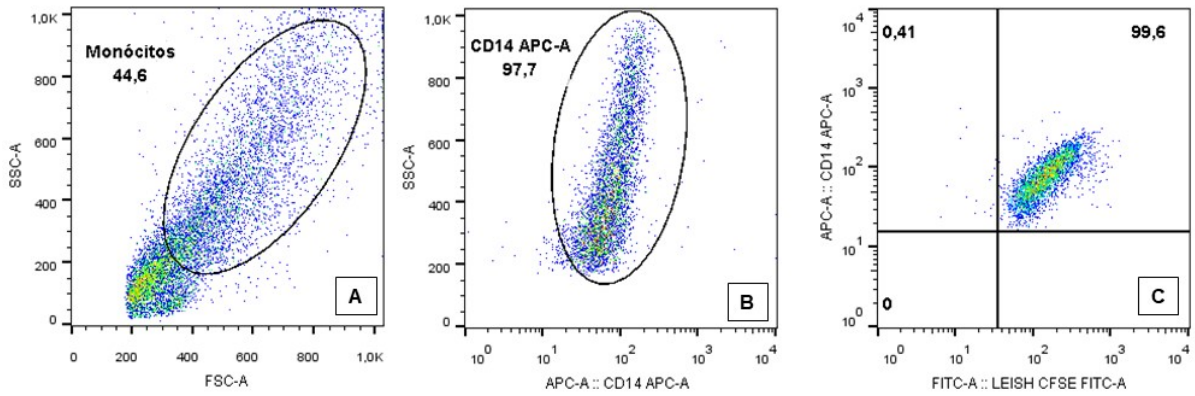
e 4x os valores da CI_{50} e o volume completado com meio de cultura RPMI suplementado com 1% de antibiótico, 10% de SFB. As condições experimentais foram de monócitos sem infecção e sem tratamento das substâncias testes, monócitos sem infecção e com o tratamento, monócitos com infecção e sem tratamento das substâncias avaliadas e monócitos com infecção e com tratamento dos compostos químicos. A placa foi incubada por 24 h em estufa de a 5% de CO_2 a 37 ºC. Após o tempo de incubação, a placa foi centrifugada a 200 g, por 8 min a 4 ºC. Para a marcação dos monócitos foi adicionado o anticorpo de superfície CD14 (APC – 650 a 670 nm – laser vermelho), já diluído, conforme titulação padronizada, em um volume final de 40 µL. Após a adição do anticorpo, a placa foi incubada a 4 ^{o}C por 15 minutos ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, foi realizada a lavagem das células adicionando 150 µL de tampão PBS gelado em cada poço. A placa foi novamente centrifugada, durante 10 minutos a 4 ^{o}C. Ao final da centrifugação, a placa foi vertida para retirar o sobrenadante e, em seguida, foi agitada a fim de suspender as células. Então, adicionou-se 100 µL de tampão PBS e 100 µL de solução de formaldeído 4%, para então realizar a leitura no citômetro de fluxo FACSCANTO II (BD FACSCanto® II - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) (MAGALHÃES et al., 2015).

4.11 Aquisição e análise dos dados de taxa de infecção por citometria de fluxo

As formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* foram marcadas com CFSE (CellTrace ™ CFSE Cell Proliferation Kit) e os monócitos marcados com o anticorpo de superfície CD14 (APC – 650 a 670 nm – laser vermelho), sendo assim adquiridos em citômetro de fluxo – FACSCANTO II (Becton & Dickinson). As amostras foram analisadas posteriormente no programa FlowJo 10.0.7 (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA).

Inicialmente, para a identificação da população celular de monócitos, utilizou-se o gráfico de perfil de tamanho versus granulosidade baseando-se em conhecimento prévio da localização dessas células (**Figura 8A**). Em seguida, essas células foram visualizadas no gráfico CD14 versus granulosidade (SSC) selecionando-se apenas a população de monócitos (**Figura 8B**). Por último, as células foram visualizadas no gráfico CFSE versus CD14, identificando assim os monócitos infectados pelo parasito *Leishmania* spp. (**Figura 8C**).

Figura 8 – Estratégia de análise por citometria de fluxo



Fonte: Elaboração própria. (**A**) As células foram visualizadas no gráfico tamanho vs. granulosidade (FSC vs. SSC) e foi realizado um gate amplo em torno da população de monócitos, excluindo a maioria dos debris e linfócitos. (**B**) Em seguida, essas células foram visualizadas no gráfico CD14 vs granulosidade (SSC) selecionando apenas a população de monócitos. (**C**) Por último, as células foram visualizadas no gráfico CFSE vs. CD14, identificando assim os monócitos infectados por *Leishmania* sp.

4.12 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico na infecção de monócitos humanos por *L. infantum* e *L. amazonensis* tratados com MBH-A12 e MBH-A13

A produção de NO foi avaliada indiretamente pela produção de nitrito pelo método de Griess (GREEN et al., 1982) no sobrenadante dos ensaios de avaliação da taxa de infecção de monócitos por *L. amazonensis* e *L. infantum* (item 4.10). Os sobrenadantes avaliados foram distribuídos em placa de 96 poços, assim como as concentrações seriadas (500 – 0,9750 µM) de nitrito de sódio ($NaNO_2$ – Vertec Química Fina, RJ, BRA) em meio RPMI completo para realização da curva-padrão. Em seguida, o reagente de Griess (1% Sulfanilamida em H_3PO_4 10% (v/v) em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1% naftilenodiamino em água Milli-Q®) foi adicionado à placa com o mesmo volume. Após a incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, a reação colorimétrica foi avaliada em espectrofotômetro a 545 nm. A concentração de nitrito foi estimada por interpolação da curva-padrão.

4.13 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* expostas ao MBH-A12 e ao MBH-A13

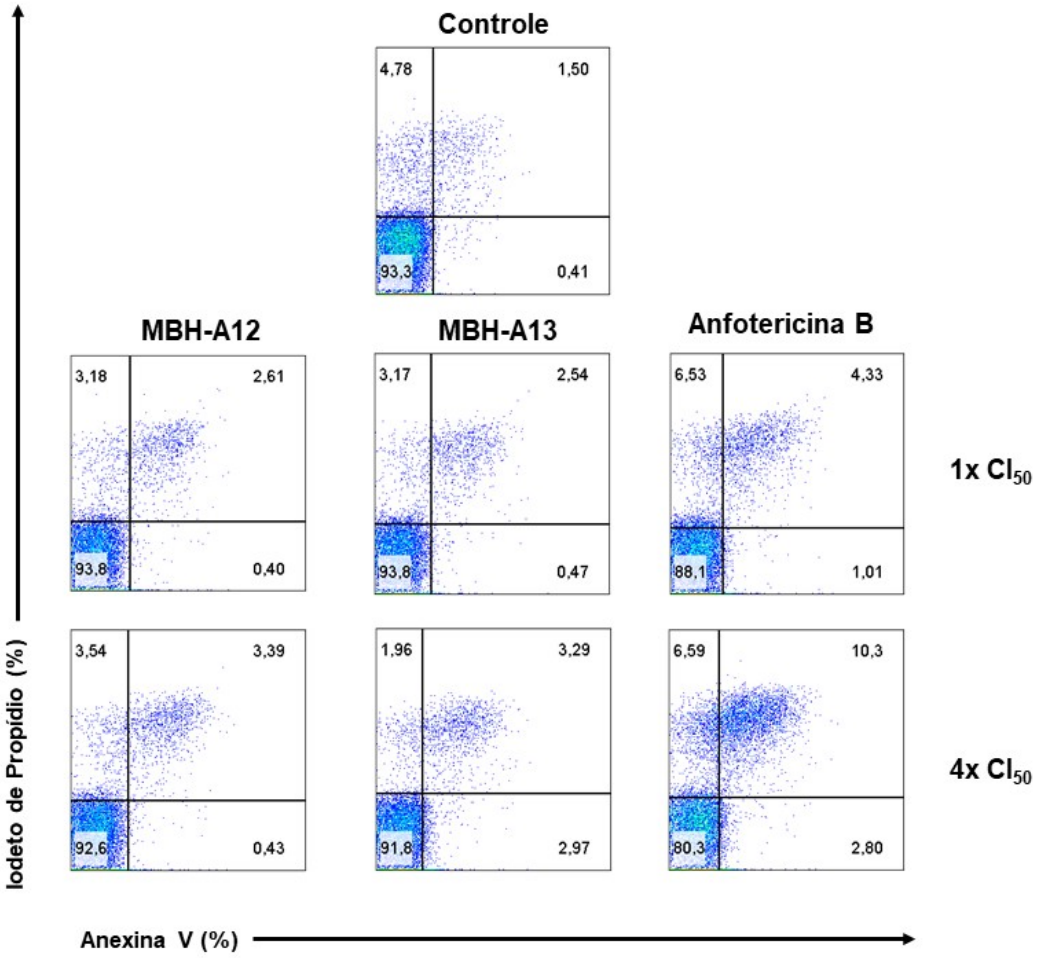
Utilizando a citometria de fluxo avaliou-se a dupla marcação por Anexina V-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) /Iodeto de Propídio (IP) (FITC Annexin V/Dead

Cell Apoptosis Kit - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), para a avaliação do perfil de morte celular das formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, seguindo as instruções do fabricante (MARINHO et al., 2014). Dessa forma, os compostos avaliados foram analisados quanto a sua toxicidade relacionada à apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. As formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* em fase logarítimica de crescimento (1×10^6 leishmania/poço) foram incubadas com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e anfotericina B, utilizada como controle positivo, nas concentrações de 1x e 4x os valores da CI_{50} correspondente a cada espécie, por 24 h a 26 ± 1ºC. Após o período de tratamento, as formas promastigotas foram lavadas três vezes em PBS gelado e ressuspendidas em 100 µL de tampão de ligação a anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, e 2.5 mM $CaCl_2$, pH 7.4). Em seguida adicionou-se 2,5 µL de anexina V-FITC e as células foram incubadas por 15 min no escuro à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram marcadas com IP (5 µg/mL) e adquiridas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto® II - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foram avaliados para cada amostra de células marcadas. Para análise dos dados foi utilizado o software FlowJo 10.0.7 (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA).

4.13.1 Estratégia de análise dos dados de perfil de morte celular de formas promastigotas de *L. infantum* expostas ao MBH-A12 e ao MBH-A13 por citometria de fluxo

O dot plot a seguir é representativo das frequências de promastigotas de *L. infantum* tratadas nas concentrações de 1x e 4x a CI_{50} das moléculas MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B, por 24 h e marcadas com anexina V-FITC/IP (**Figura 9**). No dot plot, o percentual celular é apresentado em cada quadrante, onde o quadrante 1 (Q1) representa o percentual de células viáveis (anexina−/IP−), Q2 – células em apoptose inicial com padrão de marcação anexina+/IP−, Q3 – células em apoptose final com padrão anexina+/IP+ e Q4 – células em necrose com padrão anexina−/IP+.

Figura 9 – Dot plots representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de promastigotas de *L. infantum* tratadas com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e Anfotericina B

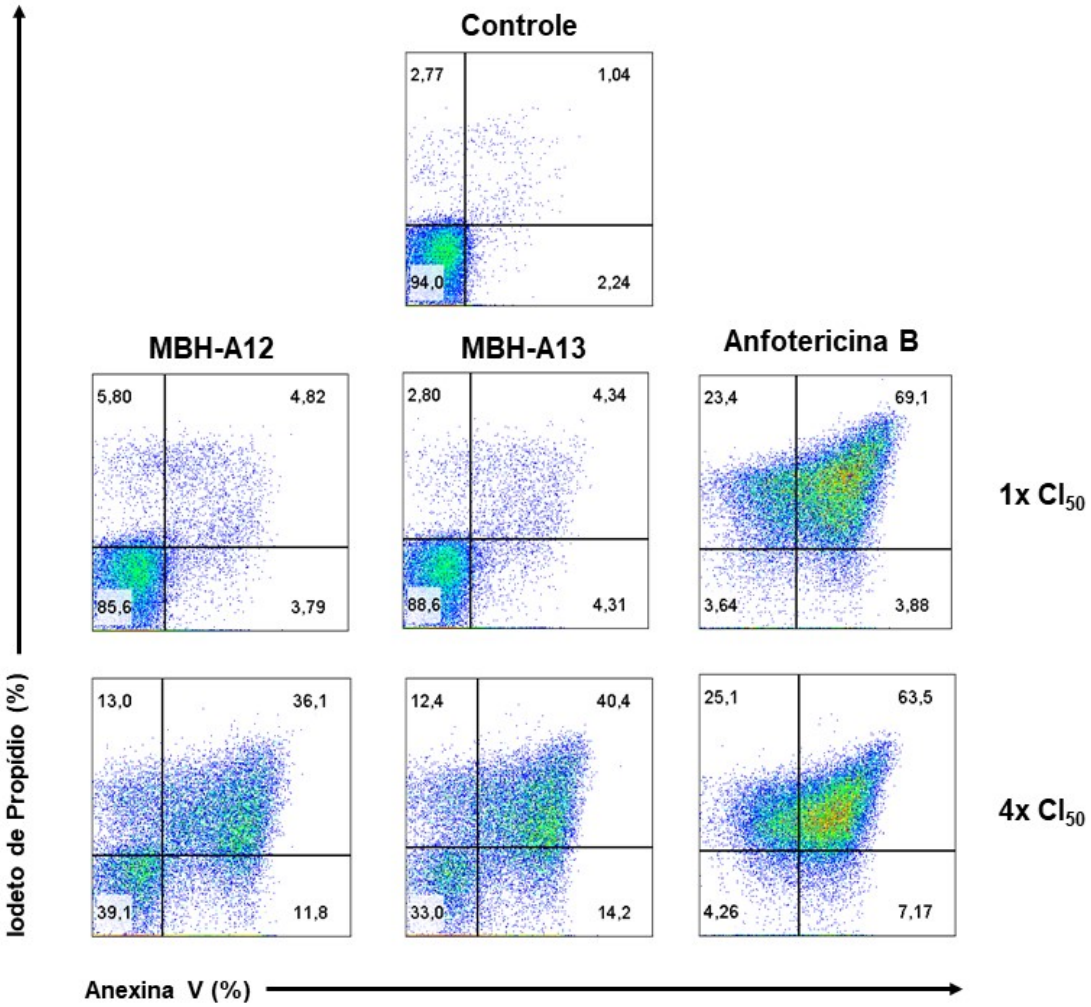


Fonte: Elaboração própria. Formas promastigotas de *Leishmania infantum* foram incubadas a 26 ºC por 24 h na ausência ou presença dos compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B, nas concentrações de 1x e 4x a CI_{50}. As células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídio e analisadas por citometria de fluxo. Dot plots são representativos de um dos três experimentos realizados em triplicata.

4.13.2 Estratégia de análise dos dados de perfil de morte celular de formas promastigotas de *L. amazonensis* expostas ao MBH-A12 e ao MBH-A13 por citometria de fluxo

Na **Figura 10** está o dot plot representativo das frequências de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas durante 24 h com o MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B, nas concentrações de 1x e 4x a CI_{50} e marcadas com anexina V-FITC/IP. O percentual celular é apresentado em cada quadrante do dot plot, como explicado anteriormente no item 4.13.1.

Figura 10 – Dot plots representativos da avaliação de morte celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e Anfotericina B



Fonte: Elaboração própria. Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram incubadas a 26 ºC por 24 h na ausência ou presença dos compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B, nas concentrações de 1x e 4x a CI_{50}. As células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídio e analisadas por citometria de fluxo. Dot plots são representativos de um dos três experimentos realizados em triplicata.

4.14 Análise Estatística

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata, em pelo menos três experimentos independentes. Foram utilizados os softwares FlowJo 10.0.7 (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA) e *GraphPad Prism* versão 6.0 (San Diego, CA) para aquisição e análise dos dados. O último foi utilizado para o cálculo da CI_{50}, CE_{50}, CC_{50} e CH_{50}, como também para as comparações entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Todas essas análises tiveram como nível máximo necessário para a significância estatística um valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* dos compostos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman sobre as formas promastigotas de *Leishmania donovani*

O perfil inibitório dos compostos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman foi avaliado em ensaios *in vitro* sobre as formas promastigotas de *Leishmania donovani*, sendo verificado que do total de 36 compostos sintéticos avaliados, 35 foram efetivos em inibir o crescimento do parasito nas concentrações avaliadas (400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 µg/mL) (**Tabela 2**), sendo possível avaliar a atividade biológica através do cálculo da CI_{50} desses adutos.

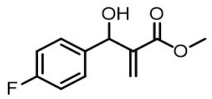
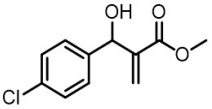
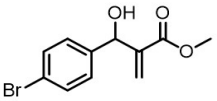
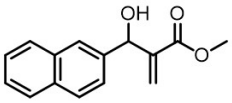
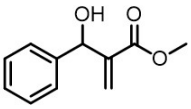
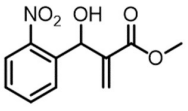
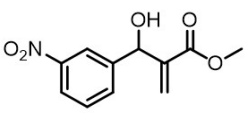
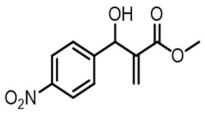
Dentro da perspectiva de avaliar se os homodímeros de MBH são mais potentes do que seus respectivos monômeros, ou se as moléculas oriundas da série de hibridação molecular são mais ativas do que os compostos isolados; observamos que as estratégias químicas utilizadas resultam em uma melhor atividade biológica dessas substâncias.

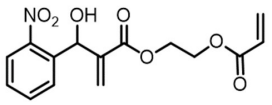
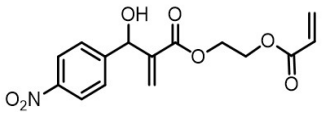
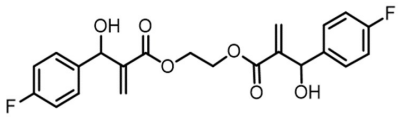
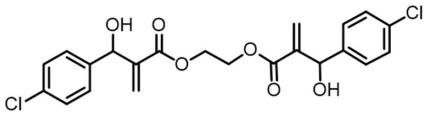
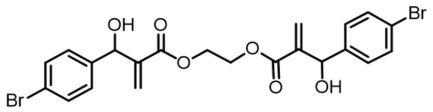
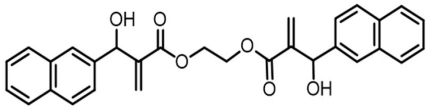
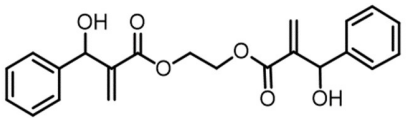
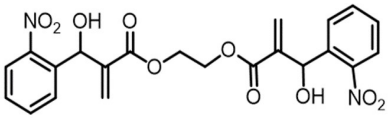
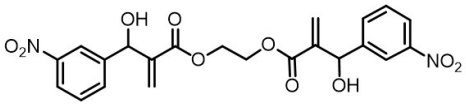
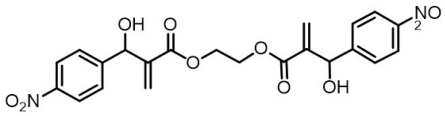
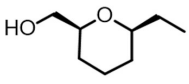
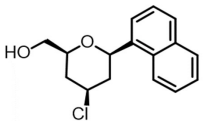
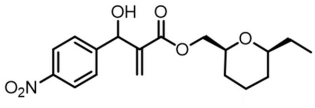
A junção de duas moléculas iguais gerando um homodímero contribuiu para o aumento da atividade anti-*Leishmania*, uma vez que esses compostos apresentaram uma CI_{50} (µg/mL) para o MBH-11 (17,71 ± 2,6), MBH-12 (4,71 ± 0,68), MBH-13 (0,27 ± 0,02), MBH-14 (18,79 ± 2,6), MBH-15 (48,21 ± 12,0), MBH-16 (11,69 ± 2,3), MBH-17 (20,30 ± 2,2) e MBH-18 (21,07 ± 3,9), sendo mais efetivos do que as suas respectivas moléculas individuais, MBH-01 (128,1 ± 8,3), MBH-02 (45,60 ± 3,9), MBH-03 (53,07 ± 4,5), MBH-04 (44,86 ± 4,4), MBH-05 (183,0 ± 18,3), MBH-06 (163,60 ± 46,2), MBH-07 (38,23 ± 3,6) e MBH-08 (39,19 ± 5,1).

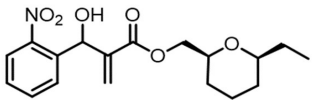
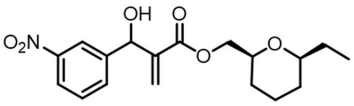
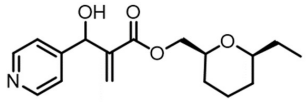
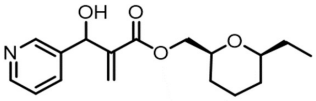
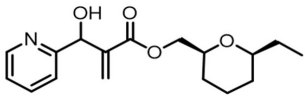
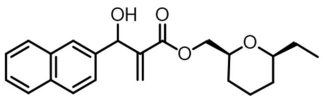
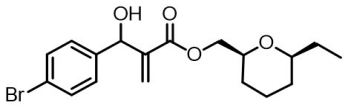
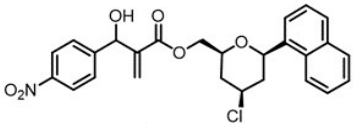
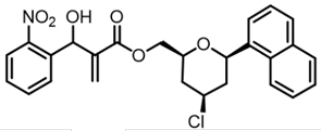
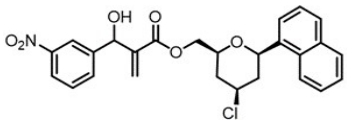
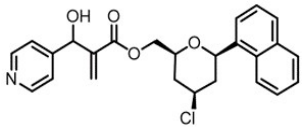
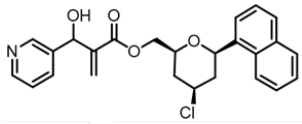
Além disso, os compostos isolados MBH-19 e MBH-20 apresentaram, respectivamente, uma CI_{50} de >400 e 47,54 ± 39,0 µg/mL, mas com o processo de hibridação molecular, a qual une moléculas com o intuito de produzir um novo composto híbrido com atividade biológica melhorada, observamos que as substâncias apresentaram uma melhor atividade biológica anti-*Leishmania* com valores da CI_{50} (µg/mL) para MBH-21 (5,64 ± 3,0), MBH-22 (13,75 ± 9,8), MBH-23 (7,03 ± 4,3), MBH-25 (17,68 ± 7,7), MBH-27 (9,73 ± 4,8), MBH-28 (2,21 ± 7,6), MBH-29 (7,09 ± 3,0), MBH-30 (8,76 ± 3,8), MBH-31(9,05 ± 3,3), MBH-33 (8,76 ± 4,0), MBH-34 (8,96 ± 4,5), MBH-35 (24,51 ± 7,5) e MBH-36 (17,17 ± 5,6).

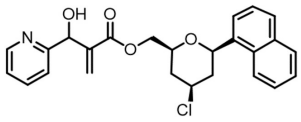
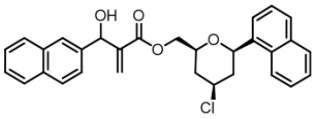
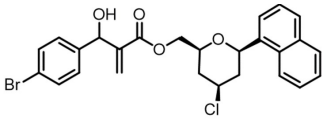
Os fármacos de referência utilizados foram o antimoniato de meglumina e a anfotericina B, por serem os medicamentos de primeira e segunda escolha, respectivamente, para o tratamento das leishmanioses; os quais estão com os resultados apresentados na **Tabela 2**. Para o antimoniato de meglumina foi observada uma atividade sobre as formas promastigotas de *L. donovani* com uma CI_{50} de 55,66 ± 1,7 mg/mL. Já para a anfotericina B, obtivemos uma CI_{50} de 0,35 ± 0,27 µg/mL, o que mostra uma atividade anti-*Leishmania* sobre as promastigotas dessa espécie do parasito.

Tabela 2 - Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI_{50}) de *Leishmania donovani* após 72 h de incubação com os compostos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman e fármacos de referência

Compostos	Estrutura Química	CI_{50} (µg/mL)
MBH-01		128,1 ± 8,3
MBH-02		45,60 ± 3,9
MBH-03		53,07 ± 4,5
MBH-04		44,86 ± 4,4
MBH-05		183,0 ± 18,3
MBH-06		163,60 ± 46,2
MBH-07		38,23 ± 3,6
MBH-08		39,19 ± 5,1

Compostos	Estrutura Química	CI_{50} (µg/mL)
MBH-09		10,04 ± 0,6
MBH-10		11,01 ± 1,2
MBH-11		17,71 ± 2,6
MBH-12		4,71 ± 0,68
MBH-13		0,27 ± 0,02
MBH-14		18,79 ± 2,6
MBH-15		48,21 ± 12,0
MBH-16		11,69 ± 2,3
MBH-17		20,30 ± 2,2
MBH-18		21,07 ± 3,9
MBH-19		> 400
MBH-20		47,54 ± 39,0
MBH-21		5,64 ± 3,0

Compostos	Estrutura Química	CI_{50} (µg/mL)
MBH-22		13,75 ± 9,8
MBH-23		7,03 ± 4,3
MBH-24		72,32 ± 26,0
MBH-25		17,68 ± 7,7
MBH-26		57,76 ± 20,0
MBH-27		9,73 ± 4,8
MBH-28		2,21 ± 7,6
MBH-29		7,09 ± 3,0
MBH-30		8,76 ± 3,8
MBH-31		9,05 ± 3,3
MBH-32		61,93 ± 18,0
MBH-33		8,76 ± 4,0

Compostos	Estrutura Química	CI_{50} (µg/mL)
MBH-34		8,96 ± 4,5
MBH-35		24,51 ± 7,5
MBH-36		17,17 ± 5,6
Antimoniato de meglumina	-	55,66 ± 1,7[a]
Anfotericina B	-	0,35 ± 0,27

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média da CI_{50} calculada ao menos em três experimentos independentes ± erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão linear com o programa *GraphPad Prism* 5.0.[a] Valores em mg/mL.

Diante dos resultados, foram escolhidas as moléculas MBH-12 e MBH-13 para darmos continuidade aos estudos, as quais são adutos da reação de Morita-Baylis-Hillman e serão identificadas a partir de agora como MBH-A12 e MBH-A13, respectivamente. Essas moléculas foram selecionadas, pois foi observado um dos menores valores de CI_{50} (4,71 ± 0,68 e 0,27 ± 0,02) para as formas promastigotas de *L. donovani* avaliados, como também por fazerem parte do mesmo processo de síntese (“twin drugs”) com formação de homodímeros, a partir da reação de Morita-Baylis-Hillman.

5.2 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* do MBH-A12 e do MBH-A13 sobre as formas promastigotas de *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*

Com o intuito de avaliar a atividade biológica anti-*Leishmania* das moléculas MBH-A12 e MBH-A13 frente a outras espécies do parasito do gênero *Leishmania*, os ensaios foram realizados *in vitro* contra as formas promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Os resultados evidenciaram que as substâncias

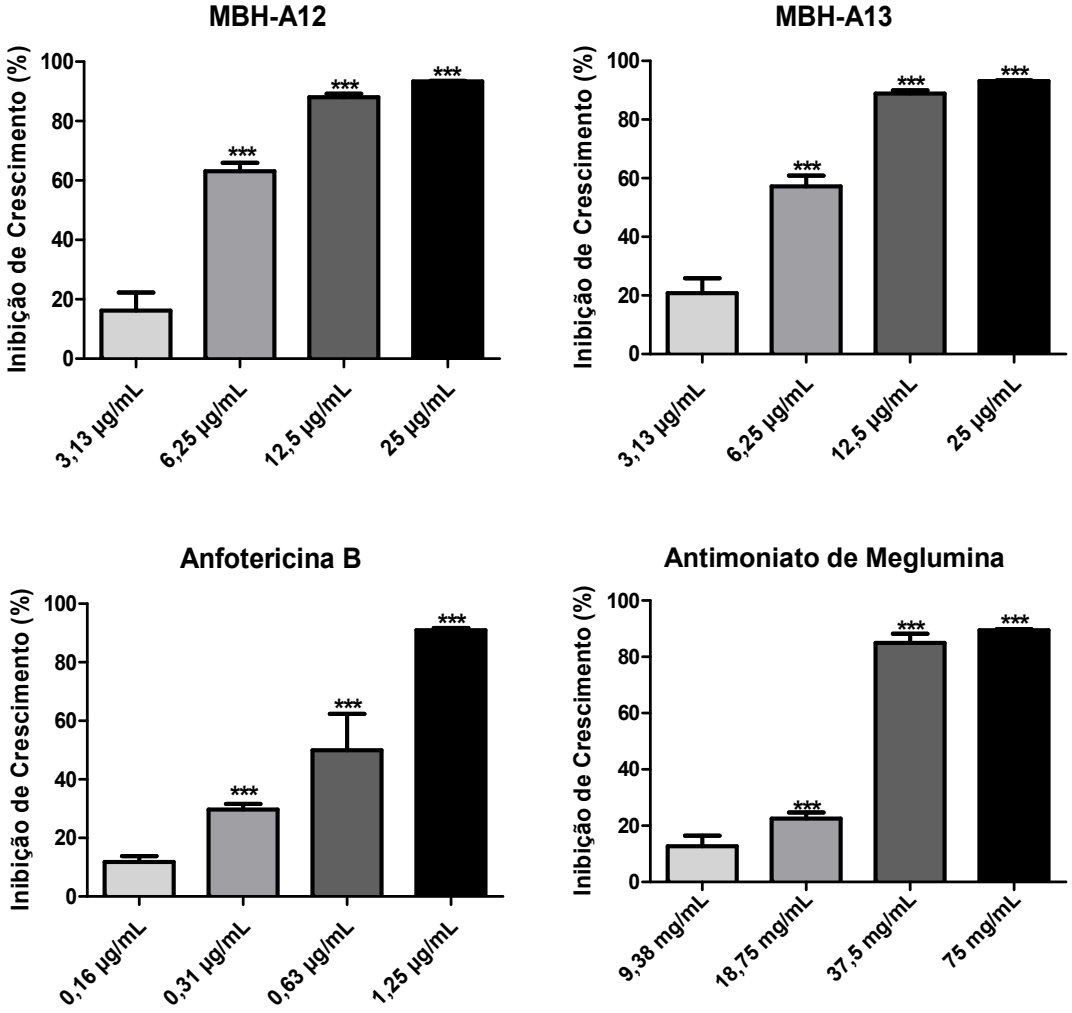
analisadas foram efetivas em inibir o crescimento dessas espécies do parasito após 72 h de tratamento com cada aduto e fármacos de referência.

A atividade biológica das moléculas escolhidas sobre as formas promastigotas de *L. infantum* foi analisada nas concentrações avaliadas, sendo observado uma inibição do crescimento do parasito, demonstrada no **Gráfico 1**. Dessa forma, para as concentrações de 25 e 12,5 µg/mL, obteve-se inibições de crescimento de 93,4 ± 0,12% e 88,07 ± 1,15%, respectivamente, para o MBH-A12 e de 93,13 ± 0,24% e 88,89 ± 1,10% para o MBH-A13, em relação ao controle (0% de inibição de crescimento). Assim, foi possível calcular para o MBH-A12 uma CI_{50} de 5,6 ± 1,5 µg/mL e para o MBH-A13 uma CI_{50} de 5,3 ± 1,1 µg/mL. Para os fármacos de referência, obteve-se uma CI_{50} de 0,372 ± 0,1 µg/mL para a anfotericina B e uma CI_{50} de 24,03 ± 5,0 mg/mL para o antimoniato de meglumina (**Tabela 3**).

Em relação à atividade sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, também foi observada uma inibição do crescimento do parasito nas concentrações avaliadas das moléculas, em relação ao controle (0% de inibição de crescimento). O MBH-A12 apresentou uma inibição de crescimento de 87,50 ± 1,76% para a concentração de 25 µg/mL, e de 20,80 ± 1,93% para a concentração de 12,5 µg/mL. O MBH-A13 apresentou uma inibição de crescimento de 86,0 ± 1,99% para a concentração de 25 µg/mL, e de 45,03 ± 11,46% para a concentração de 12,5 µg/mL. Dessa forma, foi possível calcular para o MBH-A12 uma CI_{50} de 13,2 ± 3,5 µg/mL e para o MBH-A13 uma CI_{50} de 13,4 ± 3,5 µg/mL. Os fármacos de referência obtiveram uma CI_{50} de 0,722 ± 0,6 µg/mL para a anfotericina B e uma CI_{50} de 9,916 ± 15,5 mg/mL para o antimoniato de meglumina. Esses dados estão demonstrados no **Gráfico 2** e na **Tabela 3**.

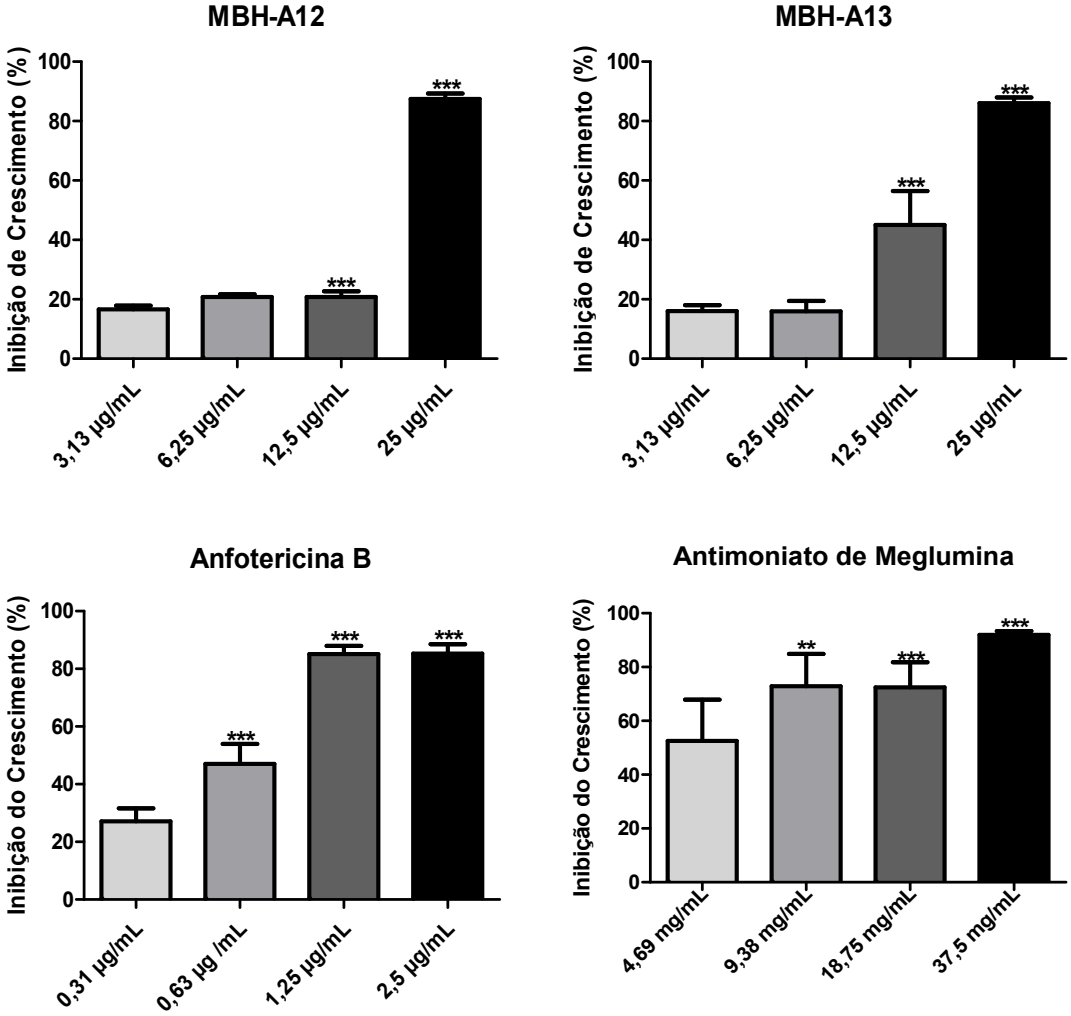
A atividade sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* está demonstrada no **Gráfico 3** e na **Tabela 3**, em que se observa nas concentrações das moléculas testadas, ocorreu uma inibição do crescimento do parasito, observado em relação ao controle (0% de inibição de crescimento). Para as concentrações de 50 e 25 µg/mL, obteve-se inibições de crescimento de 81,03 ± 0,64% e 79,28 ± 0,23%, respectivamente, para o MBH-A12; e de 78,65 ± 0,88% e 76,64 ± 0,56% para o MBH-A13. Dessa forma, foi possível calcular uma CI_{50} para o MBH-A12 de 16,32 ± 1,3 µg/mL e para o MBH-A13 uma CI_{50} de 19,09 ± 1,2 µg/mL. Para os fármacos de referência, obteve-se uma CI_{50} de 0,99 ± 0,1 µg/mL para a anfotericina B e uma CI_{50} de 21,27 ± 6,7 mg/mL para o antimoniato de meglumina.

Gráfico 1 – Efeito dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e os fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina sobre a inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* após 72 h de tratamento



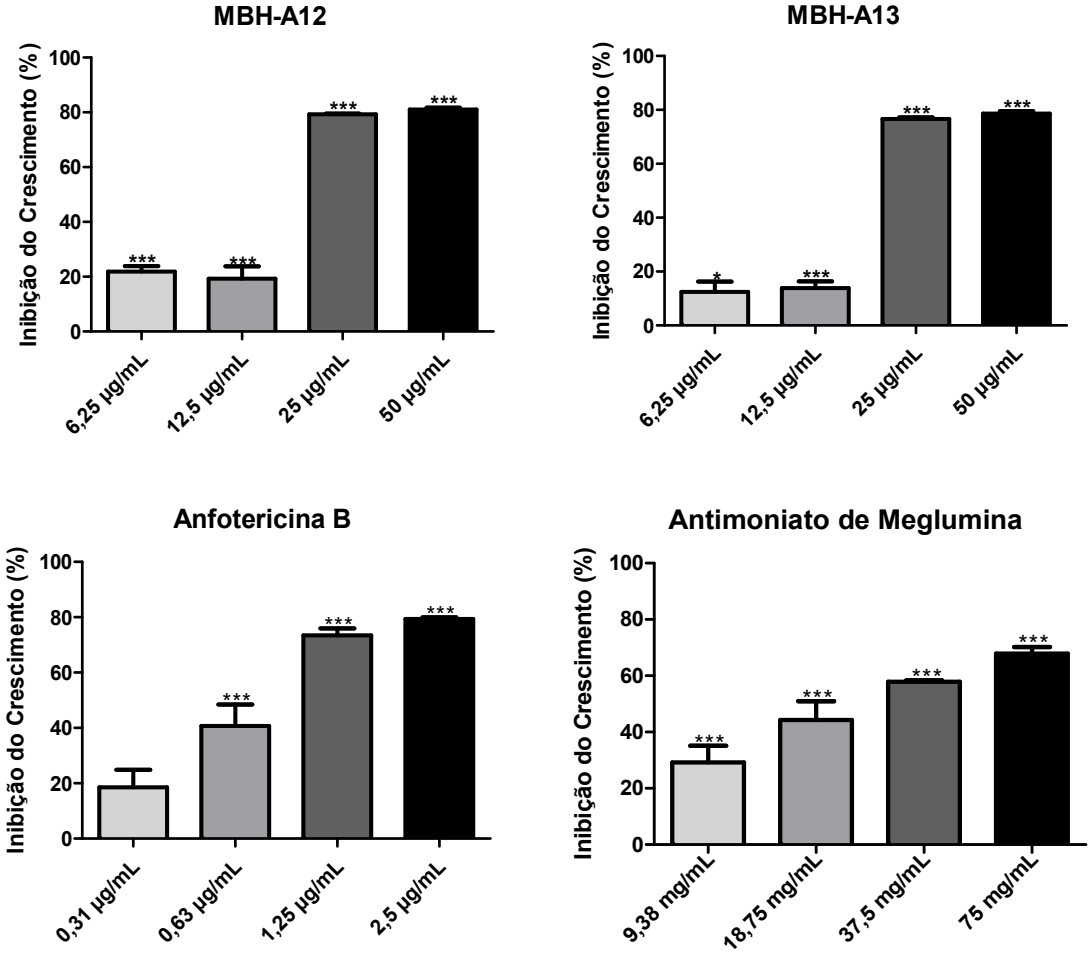
Fonte: Elaboração própria. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider suplementado e incubados na presença de diferentes concentrações dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência. A inibição do crescimento dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo após 72 h de tratamento. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle (DMSO 0,5%) como 0% de inibição. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo ***p<0,001 em comparação ao controle.

Gráfico 2 – Efeito dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e os fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina sobre a inibição de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* após 72 h de tratamento



Fonte: Elaboração própria. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider suplementado e incubados na presença de diferentes concentrações dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência. A inibição do crescimento dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT) após 72 h de tratamento. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle (DMSO 0,5% em meio Schneider completo) como 0% de inibição. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo **p<0,01 e ***p<0,001 em comparação ao controle.

Gráfico 3 – Efeito dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e os fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina sobre a inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis* após 72 h de tratamento



Fonte: Elaboração própria. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider suplementado e incubados na presença de diferentes concentrações dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência. A inibição do crescimento dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT) após 72 h de tratamento. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle (DMSO 0,5% em meio Schneider completo) como 0% de inibição. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo *p<0,05 e ***p<0,001 em comparação ao controle.

Os resultados da CI_{50} referente à atividade anti-*Leishmania* do MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência, anfotericina B e antimoniato de meglumina, contra as formas promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* estão demonstradas na **Tabela 3**. Diante dos resultados de atividade antipromastigota, da incidência das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* no Brasil, e por essas espécies levarem ao desenvolvimento de formas clínicas diferentes,

com manifestações viscerais e tegumentares respectivamente, fomos avaliar outras atividades biológicas dessas moléculas frente a essas duas espécies de *Leishmania*.

Tabela 3 - Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI_{50}) de *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, após 72 h de incubação, com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina

Espécie de *Leishmania*	**MBH-A12 CI_{50} (µg/mL)**	**MBH-A13 CI_{50} (µg/mL)**	**Anfotericina B CI_{50} (µg/mL)**	**Antimoniato de meglumina CI_{50} (mg/mL)**
L. donovani	4,71 ± 0,7	0,27 ± 0,02	0,35 ± 0,27	55,66 ± 1,7
L. infantum	5,6 ± 1,5	5,3 ± 1,1	0,372 ± 0,1	24,03 ± 5,0
L. amazonensis	13,2 ± 3,5	13,4 ± 3,5	0,722 ± 0,6	9,916 ± 15,5
L. braziliensis	16,32 ± 1,3	19,09 ± 1,2	0,99 ± 0,1	21,27 ± 6,7

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média da CI_{50} calculada em ao menos três experimentos independentes ± erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão linear com o programa *GraphPad Prism* 5.0.

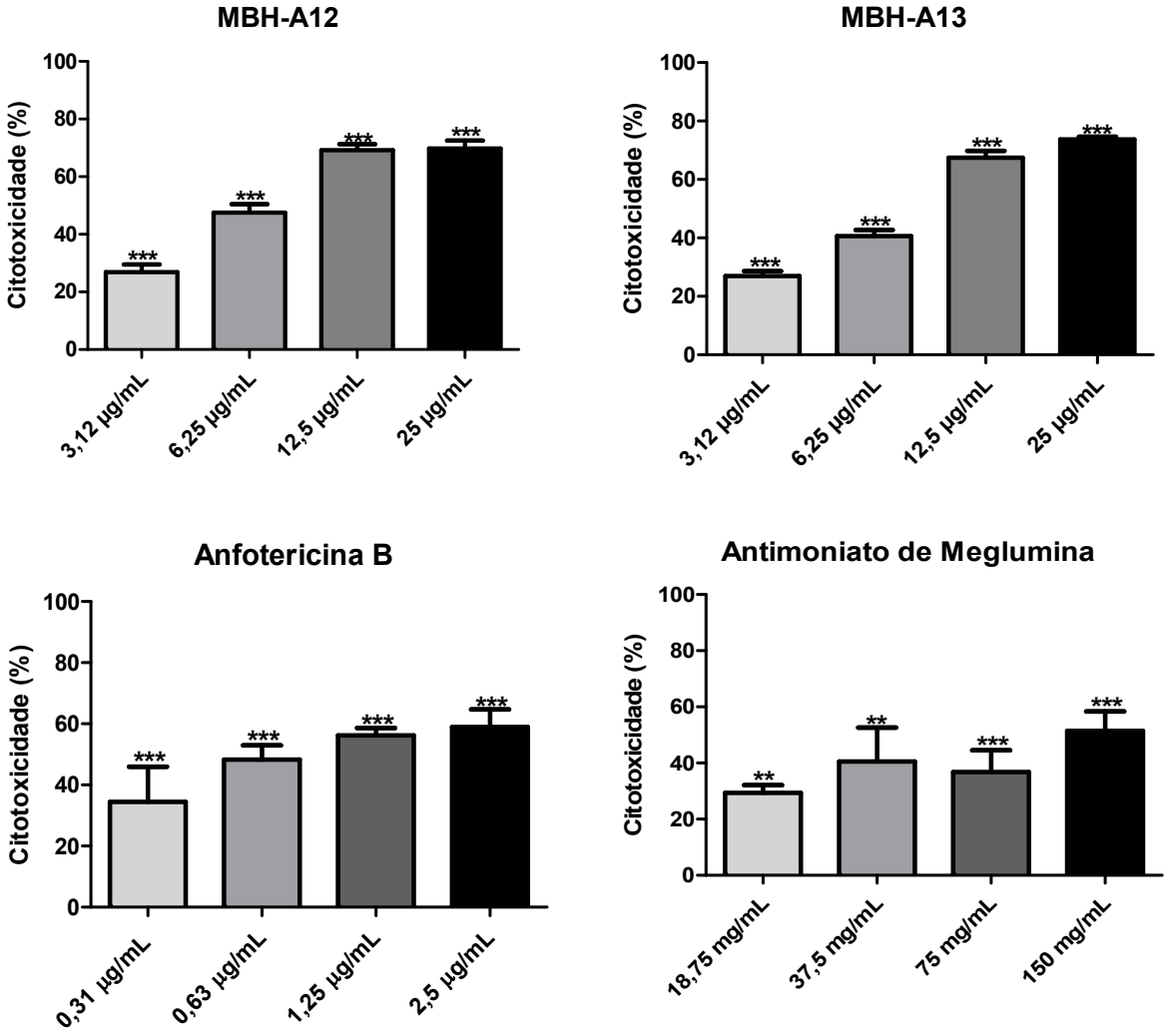
5.3 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* do MBH-A12 e do MBH-A13 sobre formas amastigotas axênicas de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*

Os compostos MBH-A12, MBH-A13 e fármacos de referência foram avaliados quanto a atividade anti-*Leishmania* sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* (**Gráfico 4**) e *L. amazonensis* (**Gráfico 5**), podendo ser observado que as duas moléculas apresentaram efeito citotóxico sobre essa forma intracelular para as duas espécies de *Leishmania* avaliadas. Da mesma forma que os adutos apresentaram perfil inibitório sobre as formas promastigotas, essas moléculas também apresentaram efeito citotóxico sobre as formas amastigotas axênicas.

Os resultados mostram que para as amastigotas axênicas de *L. infantum* (**Gráfico 4**), o MBH-A12 apresentou citotoxicidade nas concentrações analisadas, sendo essa morte celular de 26,90 ± 2,64; 47,56 ± 2,91; 69,17 ± 2,11 e 69,81 ± 2,74% para as concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL respectivamente, quando comparadas ao controle. Dessa forma, foi possível calcular uma CE_{50} de 9,08 ± 1,3 µg/mL para o MBH-A12. De maneira semelhante, o perfil de morte celular para o MBH-A13 foi de 26,98 ± 1,61; 40,58 ± 2,01; 67,48 ± 2,33 e 73,74 ± 0,92%

para as concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL respectivamente, quando comparadas com o controle. O MBH-A13 apresentou uma CE_{50} de 10,76 ± 1,1 µg/mL sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum*. Para os fármacos de referência, obteve-se uma CE_{50} de 1,6 ± 0,26 µg/mL para a anfotericina B e uma CI_{50} de 122,8 ± 12,02 mg/mL para o antimoniato de meglumina.

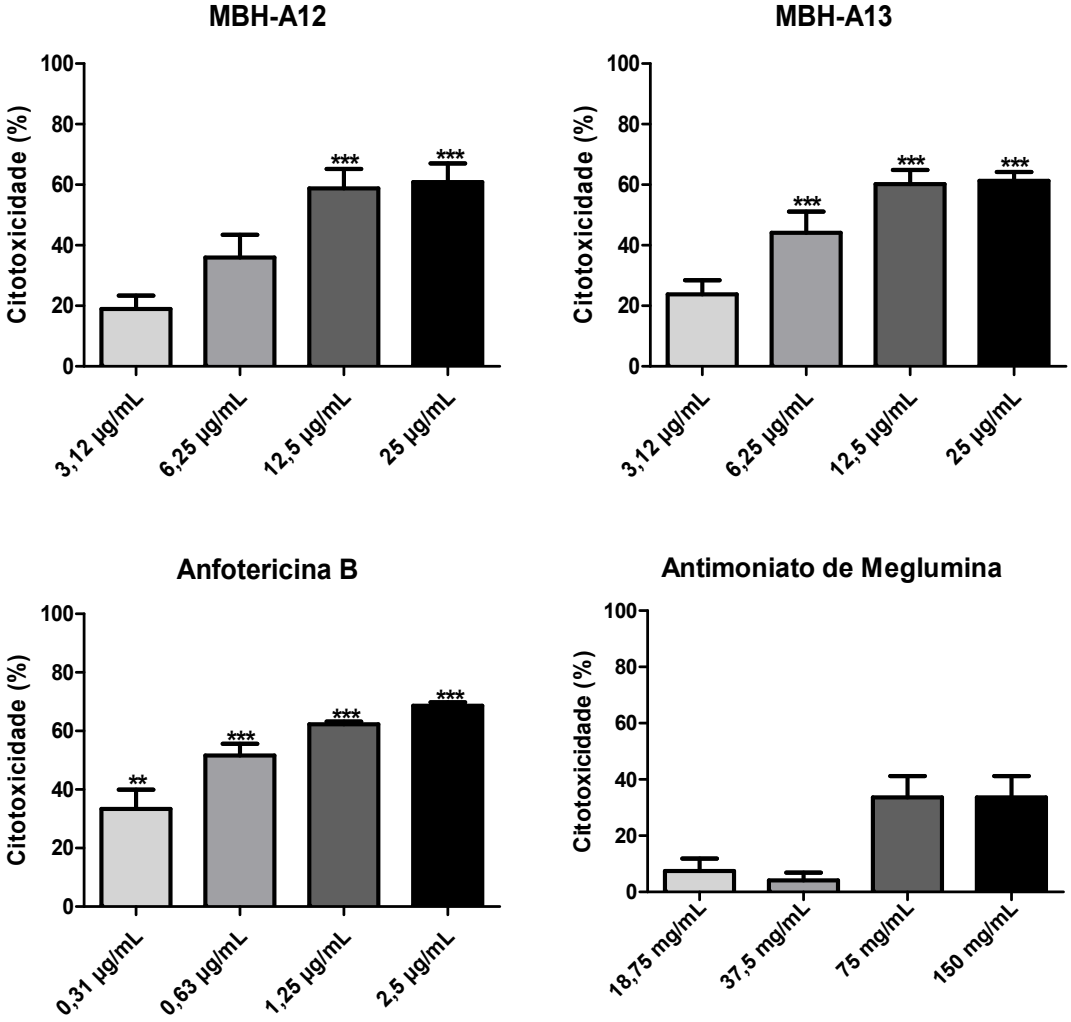
Gráfico 4 – Citotoxicidade em formas amastigotas axênicas de *L. infantum* na presença dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina após 24 h de tratamento



Fonte: Elaboração própria. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider pH 7 e 20% de SFB e incubados na presença de diferentes concentrações dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência a 37 ºC. A citotoxicidade dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium brometo (MTT) após 24 h de tratamento. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle (DMSO 0,5% em meio Schneider pH 7 e 20% de SFB) como 100% de viabilidade. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo **p<0,01 e ***p<0,001 em comparação ao controle.

Paras as formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* (**Gráfico 5**), os resultados mostram que o MBH-A12 apresentou citotoxicidade nas concentrações analisadas, sendo essa morte celular de 18,94 ± 4,45; 35,92 ± 7,55; 58,83 ± 6,35 e 60,91 ± 6,17% para as concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL respectivamente, quando comparadas ao controle (100% de viabilidade celular). Dessa forma, foi possível calcular uma CE_{50} de 13,4 ± 4,2 µg/mL para o MBH-A12. De maneira semelhante, o perfil de morte celular para o MBH-A13 foi de 23,76 ± 4,71; 44,09 ± 7,02; 60,25 ± 4,67 e 61,25 ± 2,97% para as concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL respectivamente, quando comparadas com 100% de viabilidade celular do controle. O MBH-A13 apresentou uma CE_{50} de 10,4 ± 3,2 µg/mL sobre as formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Para os fármacos de referência, obteve-se uma CE_{50} de 0,719 ± 0,1 µg/mL para a anfotericina B e uma CE_{50} de > 150 mg/mL para o antimoniato de meglumina.

Gráfico 5 – Citotoxicidade em formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* na presença dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina após 24 h de tratamento



Fonte: Elaboração própria. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider pH 5,5 e 5% de SFB e incubados na presença de diferentes concentrações dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência a 32 ºC. A citotoxicidade dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium brometo (MTT) após 24 h de tratamento. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle (DMSO 0,5% em meio Schneider pH 5,5 e 5% de SFB) como 100% de viabilidade. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo **p<0,01 e ***p<0,001 em comparação ao controle.

Os resultados dos CE_{50} para MBH-A12, MBH-A13, anfotericina B e antimoniato de meglumina sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* e *L. amazonensis* estão plotados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Concentração efetiva sobre 50% da população de formas amastigotas axênicas (CE_{50}) de *L. infantum* e *L. amazonensis*, após 24 h de incubação, com os compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e fármacos de referência anfotericina B e antimoniato de meglumina

Espécie de *Leishmania*	MBH-A12 CE_{50} µg/mL	MBH-A13 CE_{50} µg/mL	Anfotericina B CE_{50} µg/mL	Antimoniato de meglumina CE_{50} mg/mL
L. infantum	9,08 ± 1,3	10,76 ± 1,1	1,6 ± 0,26	122,8 ± 12,02
L. amazonensis	13,4 ± 4,2	10,4 ± 3,2	0,719 ± 0,1	> 150

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média da CE_{50} calculada em ao menos três experimentos independentes ± erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão linear com o programa *GraphPad Prism* 5.0.

5.4 Avaliação da citotoxicidade dos compostos MBH-A12 e MBH-A13 em células de mamíferos

5.4.1 Citotoxicidade frente a células mononucleares de sangue periférico humano

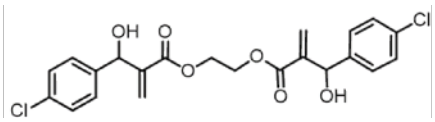
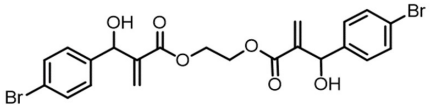
Na **Tabela 5** estão apresentados os resultados de citotoxicidade dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e dos fármacos de referência, antimoniato de meglumina e anfotericina B, sobre as células mononucleares de sangue periférico humano (CMSP). Os compostos foram avaliados nas concentrações de 1x e 4x a CI_{50} de cada substância, obtida com a atividade anti-*Leishmania* sobre a forma promastigota da espécie *L. infantum*, a qual causa a forma clínica visceral, que é uma das formas clínicas mais graves das leishmanioses.

Os adutos de Morita-Baylis-Hillman avaliados não apresentaram taxas de citotoxicidade significativas, ou seja, não alteraram a viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano, nem na maior concentração testada (4x a CI_{50}). Esses resultados são em relação ao controle negativo com 0,5% de DMSO em meio RPMI, o qual apresenta 0% de citotoxicidade e 100% de viabilidade celular.

Dessa forma, podemos inferir que a taxa de citotoxicidade para o MBH-A12 resulta em uma CC_{50} > 22,4 µg (4x a CI_{50} de 5,6 µg/mL) e uma CC_{50} > 21,2 µg/mL (4x a CI_{50} de 5,3 µg/mL) para o MBH-A13. Os fármacos de referência tiveram uma

CC_{50} > 1,48 µg/mL (4x a CI_{50} de 0,372 µg/mL) para a anfotericina B e uma CC_{50} > 96,12 mg/mL (4x a CI_{50} de 24,03 mg/mL) para o antimoniato de meglumina.

Tabela 5 - Concentração citotóxica para 50% das células mononucleares de sangue periférico humano (CC_{50}) dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e fármacos de referência após 24 h de incubação

Compostos	Estrutura	CC_{50} (µg/mL)
MBH-A12		> 22,4
MBH-A13		> 21,2
Antimoniato de meglumina	-	> 96,12[a]
Anfotericina B	-	> 1,48

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média da CC_{50} calculada em ao menos três experimentos independentes ± erro padrão da média. [a] Valores em mg/mL.

5.4.2 Citotoxicidade em eritrócitos humanos

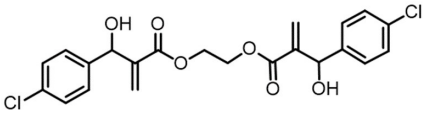
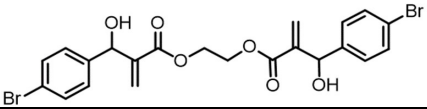
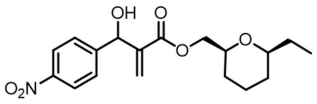
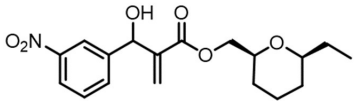
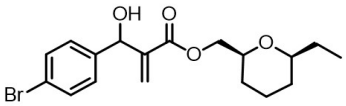
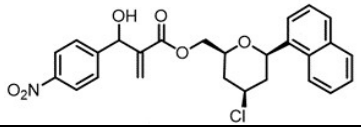
A citotoxicidade frente a eritrócitos humanos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman foi avaliada *in vitro* e os resultados estão plotados na **Tabela 6**. Os ensaios de atividade hemolítica demonstraram que as diferenças nas estruturas químicas dos adutos de MBH não contribuíram para a citotoxicidade frente aos eritrócitos. Os compostos sintéticos adutos avaliados (MBH-A12, MBH-A13, MBH-21, MBH-23, MBH-28 e MBH-29) não alteraram de forma significativa a viabilidade dessas células em nenhuma das concentrações testadas, tendo uma CH_{50} > 400 µg/mL, com o controle sendo considerado com 100% de viabilidade celular.

Os fármacos de referência avaliados apresentaram atividade hemolítica com uma CH_{50} de 429,5 ± 41,35 µg/mL para o antimoniato de meglumina e uma CH_{50} de 10,72 ± 0,7 µg/mL para a anfotericina B, ocorrendo assim uma diminuição na viabilidade dos eritrócitos pelo índice de toxicidade desses compostos (**Tabela 6**).

Diante desses resultados, em que os adutos MBH-A12 e MBH-A13 não foram tóxicos para CMSP e eritrócitos, podemos calcular o índice de seletividade desses compostos, que indicará o quanto essas moléculas são mais tóxicas para as formas

promastigota e amastigota axênica do parasito do que para as células sanguíneas humanas.

Tabela 6 – Concentração capaz de lisar 50% das hemácias (CH_{50}) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman e fármacos de referência após 1 h de incubação

Compostos	Estrutura	CH_{50} (µg/mL)
MBH-A12		> 400
MBH-A13		> 400
MBH-21		> 400
MBH-23		> 400
MBH-28		> 400
MBH-29		> 400
Antimoniato de meglumina	-	429,5 ± 41,35
Anfotericina B	-	10,72 ± 0,7

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média da CH_{50} calculada em ao menos três experimentos independentes ± erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão linear com o programa *GraphPad Prisma* 5.0.

5.5 Determinação dos índices de seletividade das substâncias em estudo

O índice de seletividade dos adutos de Morita-Baylis-Hillman e fármacos de referência estão demonstrados na **Tabela 7**. Em CMSP, os resultados mostram que os adutos (MBH-A12 e MBH-A13) apresentam maior toxicidade para as formas promastigotas do parasito (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*) do que para as células humanas, variando o índice de seletividade para

CMSP (IS_c) entre > 1,11 (MBH-A13 para *L. braziliensis*) a > 78,5 (MBH-A13 para *L. donovani*). Com relação às formas amastigotas axênicas do parasito (*L. infantum* e *L. amazonensis*), os resultados também afirmam uma maior toxicidade para o protozoário, variando o índice de seletividade para CMSP entre > 1,67 (MBH-A12 para *L. amazonensis*) e > 2,47 (MBH-A12 para *L. infantum*). Em relação aos fármacos de referência, a anfotericina B apresentou IS_c variando de > 1,50 a > 4,23 para as promastigotas, e obteve para as amastigotas axênicas valores de IS_c de > 0,93 para *L. infantum* e de > 2,06 para *L. amazonensis*. Para o fármaco, antimoniato de meglumina, o IS_c para as promastigotas variou de > 4 a > 64,9; e para as amastigotas axênicas os valores foram de > 0,64 para *L. amazonensis* e > 0,78 para *L. infantum*. Além disso, pode-se constatar que os MBH-A possuem um nível de segurança, em alguns casos, melhor do que o fármaco de referência, anfotericina B, como observado para as promastigotas de *L. donovani* e *L. infantum*. Por exemplo, comparando, o IS entre o composto MBH-A13 (mais seletivo) e a anfotericina B para as promastigotas, observou-se que o aduto foi 18 vezes mais seletivo para *L. donovani* do que esse fármaco de referência.

O nível de segurança dos adutos de MBH em relação à atividade hemolítica foram ainda maiores, tendo o índice de seletividade para eritrócitos (IS_e) variando entre > 20,95 (MBH-A13 para *L. braziliensis*) e > 1481,5 (MBH-A13 para *L. donovani*) para as formas promastigotas. Nesse caso, tivemos o IS_e para os compostos MBH-A12, MBH-A13, MBH-21, MBH-23, MBH-28 e MBH-29 em relação a *L. donovani*, e para os compostos MBH-A12 e MBH-A13 em relação a *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Em relação às formas amastigotas axênicas, o IS_e para MBH-A12 foi > 29,9 para a *L. amazonensis* e > 44,05 para *L. infantum*; já para MBH-A13 foi de > 38,5 para a *L. amazonensis* e de > 37,17 para *L. infantum*.

Em relação aos fármacos de referência, a anfotericina B apresentou IS_e variando de 10,83 a 30,62 para as formas promastigotas; e obteve para as amastigotas axênicas valores de IS_e de 6,7 para *L. infantum* e de 14,91 para *L. amazonensis*. Para o fármaco, antimoniato de meglumina, o IS_e para as promastigotas variou de 0,008 a 0,043; e para as amastigotas axênicas o valor do IS_e foi de 0,003 para as duas espécies avaliadas. Dessa forma, pode-se constatar que os MBH-A possuem um nível de segurança, em alguns casos, melhor do que o fármaco de referência, anfotericina B, como observado para as promastigotas de *L.*

donovani e *L. infantum*. Em relação ao antimoniato de meglumina, os adutos se mostram mais seletivos do que esse fármaco de primeira escolha para todas as espécies e formas do parasito avaliadas.

Os resultados apresentados mostram que os adutos de Morita-Baylis-Hillman são seletivos para continuidade no avanço de testes, por apresentarem uma toxicidade maior para o parasito do que para as células sanguíneas humanas, observados claramente pelo cálculo dos índices de seletividade; como também, considerando que os resultados são para as maiores concentrações usadas nos testes avaliados, podendo então ser obtido índices ainda maiores do que os já identificados.

Dessa forma, diante dos resultados do perfil de inibição de crescimento e cálculo da CI_{50} para as formas promastigotas, citotoxicidade e valores de CE_{50} para as formas amastigotas axênicas, observou-se que os adutos MBHA-12 e MBHA-13 apresentaram atividade biológica significativa para o parasito *Leishmania*. Assim, avaliamos alguns possíveis mecanismos de ação das substâncias testadas com o intuito de compararmos com as substâncias de referência já utilizadas no tratamento dessas doenças. Um dos perfis avaliados foi à influência dessas susbstâncias na taxa de infecção em monócitos e sua atividade imunomoduladora.

Tabela 7 – Atividade anti-*Leishmania*, efeitos citotóxicos contra células mononucleares de sangue periférico humano e eritrócitos humanos, e índice de seletividade dos adutos de Morita-Baylis-Hillman, antimoniato de meglumina e anfotericina B

Compostos				**MBH-A12**	**MBH-A13**	**Antimoniato de meglumina**	**Anfotericina B**
Citotoxicidade		**CMSP**	**CC_{50}**	> 22,4	> 21,2	> 96,12[a]	> 1,48
		Eritrócitos	**CH_{50}**	> 400	> 400	0,429[a]	10,72 ± 0,7
Atividade anti-*Leishmania*	**Promastigotas**	***L. donovani***	**CI_{50}**	4,71	0,27	55,66[a]	0,35
			IS_c	> 4,7	> 78,5	> 64,9	> 4,23
			IS_e	> 89,9	> 1481,5	0,008	30,62
		L. infantum	**CI_{50}**	5,6	5,3	24,03[a]	0,372
			IS_c	> 4	> 4	> 4	> 3,98
			IS_e	> 71,4	> 75,8	0,017	28,82
		L. amazonensis	**CI_{50}**	13,2	13,4	9,916[a]	0,722
			IS_c	> 1,69	> 1,6	> 9,69	> 2,05
			IS_e	> 30,3	> 29,8	0,043	14,85
		L. braziliensis	**CI_{50}**	16,32	19,09	21,27[a]	0,99
			IS_c	> 1,37	> 1,11	> 4,51	> 1,50
			IS_e	> 24,5	> 20,95	0,020	10,83
	Amastigotas axênicas	***L. infantum***	**CE_{50}**	9,08	10,76	122,8[a]	1,6
			IS_c	> 2,47	> 1,97	> 0,78	> 0,93
			IS_e	> 44,05	> 37,17	0,003	6,7
		L. amazonensis	**CE_{50}**	13,4	10,4	> 150[a]	0,719
			IS_c	> 1,67	> 2,04	> 0,64	> 2,06
			IS_e	> 29,9	> 38,5	> 0,003	14,91

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média para cada condição em µg/mL, calculada em ao menos três experimentos independentes. ISc (índice de seletividade com as células mononucleares de sangue periférico humano) = CC_{50}/CI_{50} ou CC_{50}/CE_{50}. ISe (índice de seletividade com eritrócitos) = CH_{50}/CI_{50}. [a] Valores em mg/mL.

5.6 Avaliação da atividade dos compostos sintéticos MBH-A12 e MBH-A13 sobre a taxa de infecção de monócitos humanos por *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*

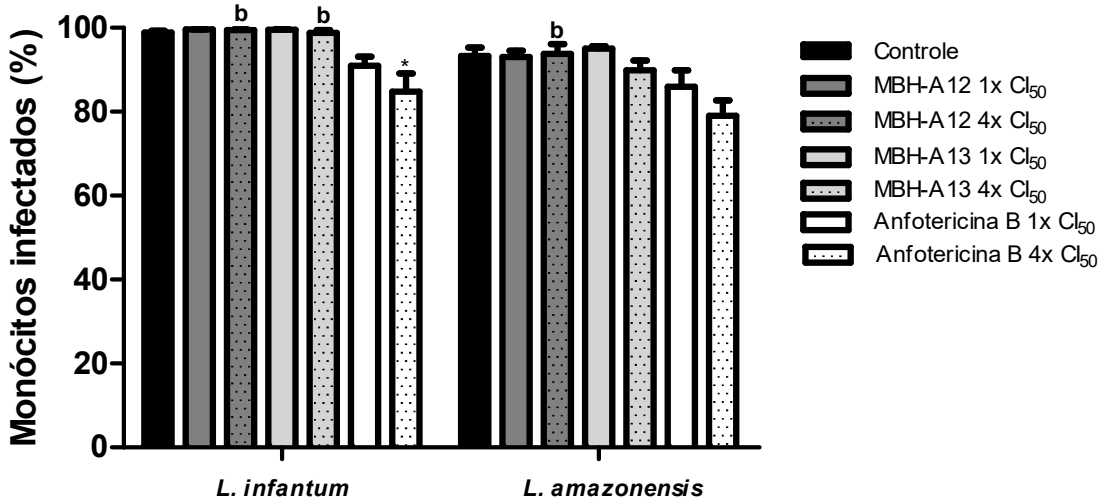
Após a avaliação dos níveis de toxicidade para células sanguíneas humanas e o cálculo dos respectivos índices de seletividade para as formas promastigotas e amastigotas axênicas, os adutos foram avaliados quanto à influência na taxa de infecção de monócitos humanos com as espécies *L. infantum* e de *L. amazonensis*.

No **Gráfico 6** estão os resultados da atividade das substâncias na taxa de infecção em monócitos humanos. Os resultados referentes ao tratamento dos monócitos humanos infectados com *L. infantum* ou *L. amazonensis* nos indica que as substâncias MBH-A12 e MBH-A13 não influenciam na taxa de infecção com 1x ou 4x a CI_{50} (referente a CI_{50} da atividade sobre a forma promastigota de cada espécie), após 24 horas de tratamento com essas moléculas.

Em relação ao tratamento com a anfotericina B, observou que os monócitos infectados com *L. infantum*, apresentaram uma diminuição na taxa de infecção com o tratamento de 4x a CI_{50}, em relação ao controle ($p < 0,05$) e em relação à concentração de 4x a CI_{50} do MBH-A12 e MBH-A13. Observou-se uma redução de 15,23% na porcentagem de monócitos infectados após o tratamento com 4x a CI_{50} da droga, em relação ao controle; de 14,66% em relação à 4x a CI_{50} do MBH-A12; e de 14,06% em relação à 4x a CI_{50} do MBH-A13.

Para os monócitos infectados com *L. amazonensis*, foi possível observar que a anfotericina B diminuiu a taxa de infecção com o tratamento de 4x a CI_{50} em relação ao tratamento com 4x a CI_{50} do aduto MBH-A12. Observou-se uma redução de 14,83% na porcentagem de monócitos infectados após o tratamento com 4x a CI_{50} da anfotericina B, em relação à mesma concentração do aduto MBH-A12.

Gráfico 6 - Efeito dos compostos químicos MBH-A12, MBH-A13 e anfotericina B sobre a taxa de infecção de monócitos por *Leishmania infantum* ou *Leishmania amazonensis* após 24 h de tratamento



Fonte: Elaboração própria. Formas promastigotas de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* foram incubadas com monócitos humanos a 37 ºC por 24 h na presença dos compostos sintéticos MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B, nas concentrações de 1x e 4x a CI_{50}. As formas promastigotas foram marcadas com CFSE (Éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína) e os monócitos com CD14 e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico representa a média ± erro padrão da média. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo ^{b} $p<0,05$ (em comparação a Anfotericina B 4x CI_{50}); * $p<0,05$ (em comparação ao controle).

Diante do resultado da não influência dos adutos MBH-A12 e MBH-A13 na taxa de infecção de monócitos com as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*, fomos verificar um dos mecanismos imunomoduladores nessas células infectadas, a partir da investigação da dosagem de óxido nítrico.

5.7 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico

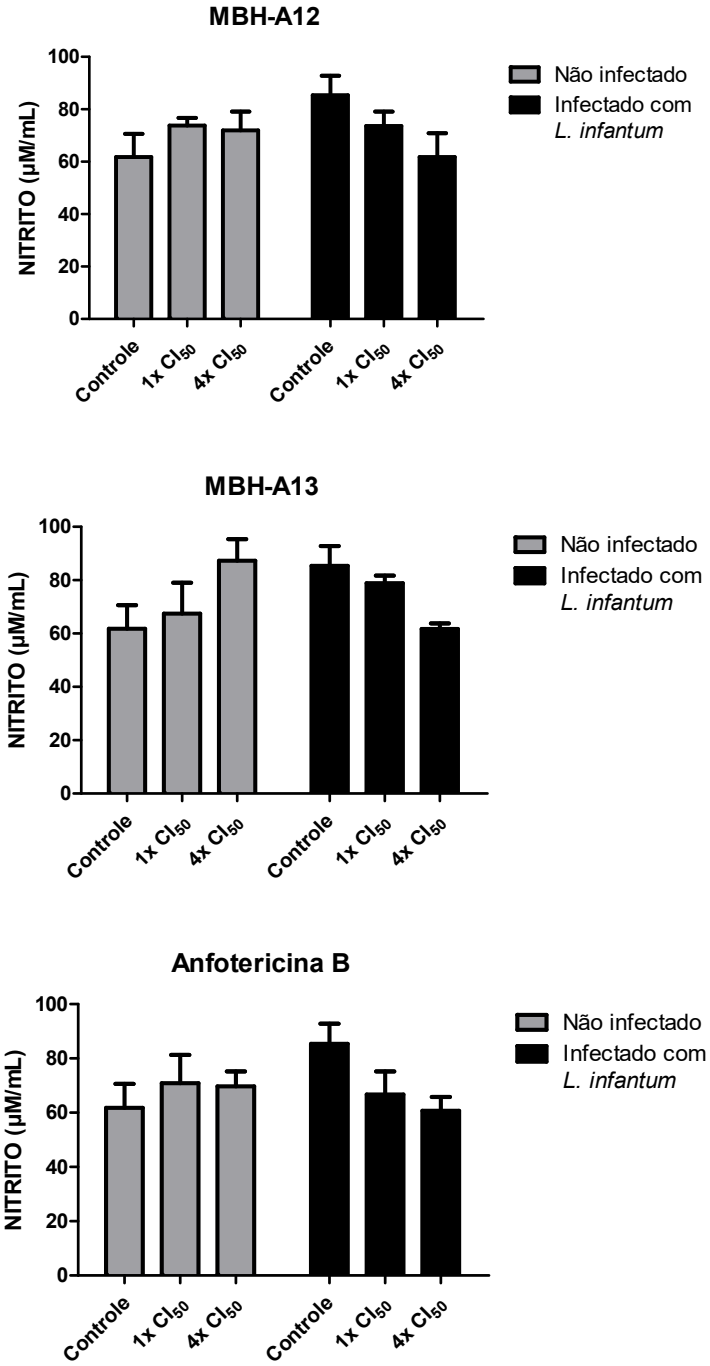
Os resultados referentes à indução da síntese de óxido nítrico em monócitos humanos infectados e não infectados, com *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*, tratados com o MBH-A12, MBH-A13 ou anfotericina B por um período de 24 horas estão presentes nos **Gráficos 7 e 8**.

Foi investigado se existia um aumento na indução da produção de NO em monócitos humanos apenas tratados com MBH-A12 e MBH-A13 nas concentrações de 1x e 4x o valor da CI_{50}, sem infecção por nenhum parasito, após um período de 24 horas de tratamento. A análise estatística dos dados demonstrou que não houve diferença nos níveis de NO produzidos pelos monócitos humanos tratados em relação ao controle (monócitos sem tratamento).

Além disso, foi avaliada a indução da síntese de NO por adutos de Morita-Baylis-Hillman em monócitos infectados por *L. infantum* e *L. amazonensis*. Os níveis de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas de monócitos humanos infectados com *L. infantum* (**Gráfico 7**) e *L. amazonensis* (**Gráfico 8**), expostos ao MBH-A12 e MBH-A13, revelaram que esses adutos não induzem ao aumento na produção dessa molécula, nos tratamentos de 1x e 4x a CI_{50} de cada substância para cada espécie do parasito com 24 horas de tratamento. De forma semelhante, não observamos nenhuma interferência do tratamento com 1x e 4x a CI_{50} da anfotericina B na produção de NO em monócitos não infectados e naqueles infectados com *L. infantum* e *L. amazonensis*.

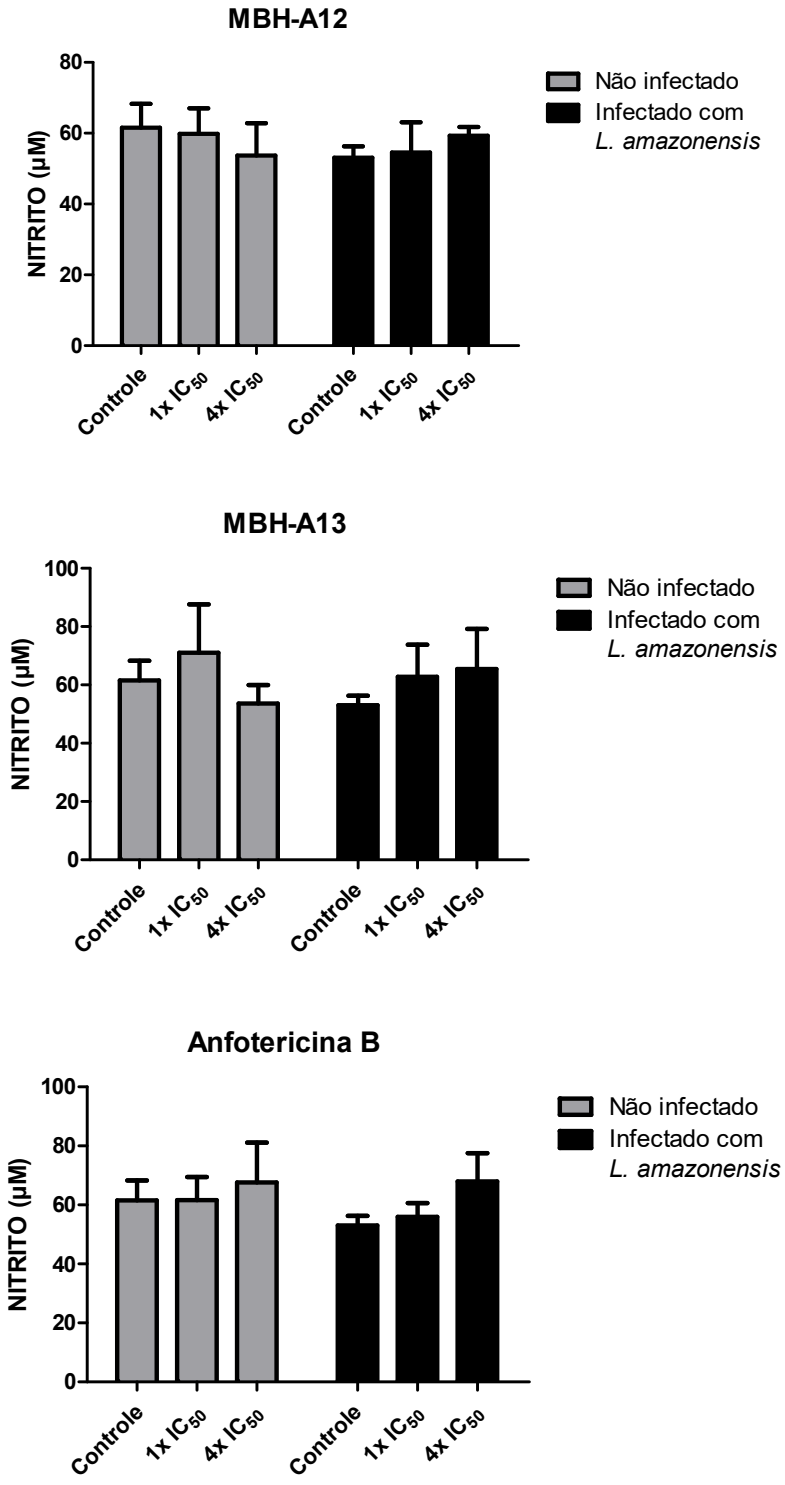
Dessa forma, nossos dados demonstram que a atividade biológica anti-*Leishmania* dos adutos de Morita-Baylis-Hillman investigados não influenciam na taxa de infecção de monócitos humanos, como também não ocorre a produção de óxido nítrico diante dos tratamentos testados. Dessa forma, fomos investigar outro possível mecanismo de ação dessas moléculas, através da avaliação da influência dessas substâncias sobre o perfil de morte celular sobre as formas promastigotas das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*.

Gráfico 7 – Níveis de nitrito produzidos por monócitos infectados com *Leishmania infantum* e tratados com os compostos MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B



Fonte: Elaboração própria. Os níveis de nitrito foram dosados pela reação de Griess, a partir dos sobrenadantes coletados do ensaio de taxa de infecção de monócitos com *L. infantum* no sangue periférico de indivíduos saudáveis. O gráfico representa a média ± erro padrão. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey foi realizado para comparar os grupos com o controle.

Gráfico 8 – Níveis de nitrito produzidos por monócitos infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados com os compostos MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B



Fonte: Elaboração própria. Os níveis de nitrito foram dosados pela reação de Griess, a partir dos sobrenadantes coletados do ensaio de taxa de infecção de monócitos com *L. amazonensis* no sangue periférico de indivíduos saudáveis. O gráfico representa a média ± erro padrão. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey foi realizado para comparar os grupos com o controle.

5.8 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* expostas aos compostos MBH-A12 e MBH-A13

Inicialmente, fomos observar os resultados frente às diferenças de perfil de morte celular na cultura de *L. infantum* sem e com tratamento dos compostos MBH-A12, MBH-A13 e anfotericina B (**Tabela 8**). Podemos observar que a cultura sem tratamento obteve uma taxa inicial de células em apoptose inicial (0,43 ± 0,02%), apoptose tardia (1,55 ± 0,05%) e em necrose (3,94 ± 0,85%), resultando em um total de morte celular de 5,92 ± 0,92%. Quando as células foram tratadas com 1x e 4x as concentrações das moléculas MBH-A12 e MBH-A13, não foi observado aumento do percentual de apoptose inicial (células positivas para anexina V e negativas para IP), quando comparados ao controle. Na avaliação do processo de apoptose tardia (parasitos corados positivamente para anexina e IP) foi observado um aumento do percentual de células no tratamento com MBH-A13 1x (5,11 ± 0,40%) e 4x (10,60 ± 0,30%) o valor da CI_{50}, comparado ao controle; resultado que não ocorreu para o tratamento com o MBH-A12. Em relação ao tipo de morte celular por necrose (células negativas para anexina V e positivas para IP), não foi observado aumento do percentual celular quando as células foram tratadas com 1x e 4x o valor da CI_{50} das concentrações das moléculas MBH-A12 e MBH-A13, em relação ao controle.

Um perfil semelhante à molécula MBH-A13 foi observado pela anfotericina B, a qual não aumentou os níveis de apoptose inicial, em comparação ao controle. No entanto, apresentou aumento significativo na apoptose tardia, com concentração de 4x o valor da CI_{50} (4,01 ± 0,72%) e não houve aumento de morte celular por necrose, quando comparados aos respectivos controles.

Posteriormente, foi feita a avaliação as diferenças de perfil de morte celular entre as moléculas de MBH-A12, MBH-A13 e a anfotericina B. Quando as células foram tratadas com 1x e 4x a CI_{50} dessas moléculas, não foi observado diferença do percentual de apoptose inicial entre elas. Na avaliação do processo de apoptose tardia foi observado um aumento do percentual de células no tratamento com MBH-A13 4x (10,60 ± 0,30%) em relação à 1x (5,11 ± 0,40%) o valor da sua CI_{50}, como também para a anfotericina B 4x (4,01 ± 0,72%) em relação à 1x (2,12 ± 0,37%) o valor da sua CI_{50}. Em relação aos dois adutos analisados, o MBH-A13 induziu um aumento da morte celular por apoptose tardia quando comparado com o MBH-A12

nas duas concentrações testadas (1x e 4x a CI_{50}). Para a morte celular por necrose não foi observado diferença do percentual celular quando as células foram tratadas com 1x e 4x o valor da CI_{50} das moléculas MBH-A12, MBH-A13 e anfotericina B.

Tabela 8 – Percentual de morte celular por apoptose/necrose de formas promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B

Compostos	% de Células		
	Apoptose Inicial (An+/PI-)	Apoptose Tardia (An+/PI+)	Necrose (An-/PI+)
Controle	0,4 ± 0,02	1,6 ± 0,05	3,9 ± 0,85
MBH-A12 1x CI_{50}	0,4 ± 0,04	2,8 ± 0,08[d,e]	3,3 ± 0,06
MBH-A12 4x CI_{50}	1,6 ± 0,75	3,0 ± 0,31	3,2 ± 0,85
MBH-A13 1x CI_{50}	0,3 ± 0,09	5,1 ± 0,40[b,c]	3,0 ± 0,35
MBH-A13 4x CI_{50}	2,6 ± 0,37	10,6 ± 0,30[b,d,e]	3,0 ± 1,04
Anfotericina B 1x CI_{50}	3,0 ± 1,12	2,1 ± 0,37[d]	8,0 ± 2,77
Anfotericina B 4x CI_{50}	1,8 ± 0,96	4,0 ± 0,72[a]	6,5 ± 0,14

Fonte: Elaboração própria. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey foi realizado para comparar os grupos com o controle, sendo [a] $p<0,01$; [b] $p<0,001$ em comparação ao controle; [c] $p<0,05$ (em comparação a Anfotericina B 1x CI_{50}); [d] $p<0,05$ (em comparação a Anfotericina B 4x CI_{50}); [e] $p<0,01$ (em comparação ao MBH-A13 1x CI_{50}); [f] $p<0,01$ (em comparação ao MBH-A13 1x CI_{50}). IP – iodeto de propídio.

Em seguida, fomos observar os resultados frente às diferenças de perfil de morte celular na cultura de *L. amazonensis* sem e com tratamento dos compostos MBH-A12, MBH-A13 e anfotericina B (**Tabela 9**). Na cultura sem tratamento foi possível observar uma taxa inicial de células em apoptose inicial (2,29 ± 0,14%), apoptose tardia (1,09 ± 0,09%) e em necrose (2,66 ± 0,16%), resultando em um total de morte celular de 6,04 ± 0,39%. Observou-se um aumento do percentual de apoptose inicial (células positivas para anexina V e negativas para IP) das células tratadas com 4x (12,57 ± 0,71%) o valor da CI_{50} da molécula MBH-A12, quando comparados ao controle, como também observado para a molécula MBH-A13 apenas para a concentração de 4x (12,17 ± 1,10%) o valor da CI_{50}. Na avaliação do processo de apoptose tardia (parasitos corados positivamente para anexina e IP) foi observado um aumento celular no tratamento com a MBH-A12 e MBH-A13 na concentração de 4x a CI_{50} (35,03 ± 0,67%; 37,17 ± 1,70%, respectivamente), quando comparados com valores obtidos no controle. Em relação ao tipo de morte celular

por necrose (células negativas para anexina V e positivas para IP), não foi observado aumento do percentual celular quando as células foram tratadas com 1x e 4x o valor da CI_{50} das concentrações das moléculas MBH-A12 e MBH-A13.

A Anfotericina B não aumentou os níveis de apoptose inicial, em comparação ao controle; no entanto ocorreu um aumento significativo na apoptose tardia, nas concentrações de 1x (74,03 ± 5,08%) e 4x o valor da CI_{50} (69,90 ± 3,30 %). Quando analisado o perfil de necrose, observou-se um aumento significativo apenas na concentração de 1x CI_{50} (18,22 ± 6,36%) em relação ao controle (2,66 ± 0,16%).

Quando foi realizada a avaliação entre as moléculas de MBH-A12, MBH-A13 e a anfotericina B, foi observado um aumento do percentual de células em apoptose inicial no tratamento com MBH-A12 4x (12,57 ± 0,71%) em relação à 1x (5,85 ± 1,07%) o valor da CI_{50}, como também para o MBH-A13 4x (12,17 ± 1,10%) em relação a 1x (3,54 ± 0,57%) o valor da CI_{50}. Além disso, o MBH-A13 induziu um aumento de morte celular na fase de apoptose inicial na concentração de 4x a CI_{50} em relação à mesma concentração de anfotericina B ($p < 0,05$). Posteriormente, foi avaliado o processo de apoptose tardia, sendo observado um aumento do percentual de células no tratamento com MBH-A12 4x (35,03 ± 0,67%) em relação a 1x (6,88 ± 1,82%) o valor da CI_{50}, como também para o MBH-A13 4x (37,17 ± 1,70%) em relação a 1x (3,90 ± 0,51%) o valor da CI_{50}. A anfotericina B induziu um aumento de percentual de morte celular nas concentrações de 1x e 4x a CI_{50}, em comparação com as mesmas concentrações das moléculas de MBH-A12 e MBH-A13. Para a morte celular por necrose, a anfotericina B induziu um aumento de percentual de morte celular na concentração de 1x a CI_{50}, em comparação com a mesma concentração das moléculas de MBH-A12 e MBH-A13 ($p < 0,05$).

Tabela 9 – Percentual de morte celular por apoptose/necrose de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com MBH-A12, MBH-A13 e o fármaco de referência anfotericina B

Compostos	% de Células		
	Apoptose Inicial (An+/PI-)	Apoptose Tardia (An+/PI+)	Necrose (An-/PI+)
Controle	2,3 ± 0,14	1,1 ± 0,09	2,7 ± 0,16
MBH-A12 1x CI_{50}	5,9 ± 1,07	6,9 ± 1,82[f]	5,0 ± 1,06
MBH-A12 4x CI_{50}	12,6 ± 0,71[b,c]	35,0 ± 0,67 [b,c,e]	11,5 ± 0,87
MBH-A13 1x CI_{50}	3,5 ± 0,57	3,9 ± 0,51	2,8 ± 0,06
MBH-A13 4x CI_{50}	12,2 ± 1,10 [b,d]	37,2 ± 1,70 [b,d,e,f]	12,8 ± 1,03
Anfotericina B 1x CI_{50}	4,6 ± 2,27	74,0 ± 5,08 [b]	18,2 ± 6,36 [a,c,d]
Anfotericina B 4x CI_{50}	6,0 ± 0,83[e]	69,9 ± 3,30 [b]	20,7 ± 2,67

Fonte: Elaboração própria. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey foi realizado para comparar os grupos com o controle, sendo [a] $p<0,01$; [b] $p<0,001$ em comparação ao controle; [c] $p<0,05$ (em comparação ao MBH-A12 1x CI_{50}); [d] $p<0,05$(em comparação ao MBH-A13 1x CI_{50}); [e] $p<0,05$ (em comparação a Anfotericina B 4x CI_{50}); [f] $p<0,05$ (em comparação a Anfotericina B 1x CI_{50}). IP – iodeto de propídio.

Esses resultados mostram que existe uma diferença de perfil de morte celular de acordo com a espécie de *Leishmania* testada (*L. infantum* e *L. amazonensis*), e que as moléculas MBH-A12 e MBH-A13, em alguns casos, induzem apoptose (morte programada da célula), mas não induzem necrose nas concentrações avaliadas, fato que ocorre com a anfotericina B em algumas situações.

Diante dos resultados, observamos que as moléculas MBH-A12 e MBH-A13 tem atividade biológica anti-*Leishmania* sobre as formas promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, como também sobre as formas amastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, além de não serem compostos tóxicos para as células sanguíneas humanas. Esses compostos não influenciam na taxa de infecção de monócitos pelas duas espécies avaliadas, assim como não ocorre variação nos níveis de óxido nítrico com esses tratamentos, os quais induzem um perfil de morte celular por apoptose.

6 DISCUSSÃO

A leishmaniose é um problema de saúde pública com impacto social e econômico, principalmente nas regiões tropicais do mundo, em que os recursos para o tratamento dessa parasitose são restritos (WHO, 2017c). A falta de uma vacina juntamente com a falta de medicamentos acessíveis, seguros e eficazes para a leishmaniose, está levando a busca por novos agentes anti-*Leishmania* (ANDREWS, FISHER, SKINNER-ADAMS, 2014). Neste contexto, a reação de Morita-Baylis-Hillman é um importante processo químico de transformação que possibilita a origem e aquisição de novas moléculas com consideráveis potenciais sintéticos, sendo polifuncionais e com promissores perfis biológicos (DA SILVA et al., 2016). Fármacos consumidos no nosso cotidiano, como o ácido acetilsalicílico e o paracetamol, são susbtâncias polifuncionais, mostrando a importância de se estudar moléculas com essas características.

Outros adutos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman já foram relatados na literatura com inúmeras atividades farmacológicas como atividade antifúngica e antibacteriana (NARENDER et al., 2006), efeito anti-inflamatório (FAHEINA-MARTINS et al., 2017) e atividade contra diversas doenças negligenciadas como a leishmaniose (XAVIER et al., 2016; SILVA et al., 2011; JUNIOR et al., 2010; BARBOSA et al., 2011; LIMA-JUNIOR et al. 2009; SOUZA et al., 2007), a esquistossomose (VASCONCELLOS et al., 2006), a malária (NARENDER et al., 2005) e a doença de Chagas (SANDES et al., 2014; SANDES et al., 2010). Esses artigos reforçam que moléculas oriundas da reação de MBH representam uma classe de substâncias bioativas, que podem fornecer novas moléculas com atividade anti-*Leishmania*, ou seja, moléculas promissoras para o tratamento das leishmanioses.

Os estudos biológicos com os adutos de Morita-Baylis-Hillman nesse trabalho se iniciaram com a avaliação do potencial dessas moléculas em inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. donovani*. Dos trinta e seis compostos avaliados, trinta e cinco apresentaram atividade inibitória contra as formas promastigotas dessa espécie do parasito, nas concentrações avaliadas. A triagem dos 36 compostos oriundos da reação de MBH se iniciou com a espécie *L. donovani*, devido ser uma espécie que causa uma das manifestações clínicas mais graves da leishmaniose que é a forma visceral, que sem o tratamento adequado pode levar ao óbito, além de

existir casos de pacientes que podem desenvolver a LDPC posteriormente (SINGH, CHATTERJEE, SUNDAR, 2014).

O processo de hibridação molecular contribuiu para o aumento da atividade anti-*Leishmania*, assim como a formação dos homodímeros, em que as substâncias apresentaram uma maior inibição do crescimento dos parasitos, resultando em baixos valores da CI_{50}. Todos os homodímeros avaliados foram mais potentes do que os correspondentes monómeros, como podemos evidenciar através do homodímero MBH-A13 que é quase 200 vezes mais ativo do que o correspondente monómero (MBH-03), e 2,1 vezes mais potente do que a droga de segunda linha, a anfotericina B.

Essa avaliação biológica mostra que essas estruturas químicas inéditas apresentaram uma excelente atividade anti-*Leishmania*. Essas substâncias não tinham sido bioavaliadas anteriormente, sendo utilizados métodos de síntese e estruturas diferentes das já publicadas. Embora as estratégias químicas de homodimerização e de hibridação usadas para formação dessas estruturas químicas sejam conhecidas na literatura, ainda não tinham sido realizadas com a reação de Morita-Baylis-Hillman, resultando em moléculas que são originais e carregam a inovação desse trabalho.

As três moléculas mais potentes sobre a espécie *L. donovani*, de acordo com os baixos valores de CI_{50}, foram a MBH-13, MBH-28 e MBH-12, com os respectivos valores de 0,27 ± 0,02; 2,21 ± 7,6 e 4,71 ± 0,68 µg/mL. Desses compostos foram escolhidos os adutos MBH-12 e MBH-13 (MBH-A12 e MBH-A13) para darmos continuidade aos testes, por terem um dos menores valores de CI_{50} e fazerem parte do mesmo processo de síntese, com obtenção da substância a partir da união de duas moléculas iguais, que levam a formação do homodímero.

Alguns estudos sugerem que a administração de homodímeros pode ser mais favorável do que quando comparado com administração de duas drogas separadas, apresentando propriedades de farmacocinética e farmacodinâmica próprias. A Piperaquina antiparasitária, bis-aminoacridina e o inibidor de acetilcolinesterase, bis-tacrina são alguns exemplos de drogas gêmeas (homodímeros) presentes na literatura (DA SILVA et al., 2016).

As propriedades farmacocinéticas e a mudança conformacional do homodímero em relação ao monómero podem indicar a diferença de bioatividade dessas moléculas. Além disso, foi relatada na literatura a importância da presença

dos halogênios em aumentar a atividade biológica, devido às conexões do cloro e do bromo em enzimas do ambiente (DA SILVA et al., 2016). Estudos recentes têm especulado como um possível mecanismo de ação para outros adutos nitrados, a possibilidade de biorredução do grupo nitro para hidroxilamina (PAIVA et al., 2014). Ocorreu a investigação dos potenciais de redução dos adutos de MBH contendo o grupo nitro nas posições orto, meta e para; e ao se relacionar com a atividade leishmanicida, foi observado que o aduto contendo o grupo nitro na posição orto possui potencial de redução mais negativo. Diante de vários indicativos, se fazem necessário mais estudos sobre os mecanismos de ação dessas novas moléculas sintéticas.

Os adutos MBH-A12 e MBH-A13 foram também avaliados contra as formas promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. A primeira espécie causa no continete americano a leishmaniose do tipo visceral, e as duas últimas são responsáveis por desenvolver a forma tegumentar da doença (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Os compostos avaliados apresentaram atividade biológica para as outras três espécies de *Leishmania* avaliadas, tendo para a *L. braziliensis* os maiores resultados de CI_{50}, sendo de 16,32 ± 1,3 e de 19,09 ± 1,2 µg/mL para MBH-A12 e MBH-A13, respectivamente. Esse resultado indica que mesmo para o mais alto valor de CI_{50}, o qual reflete a atividade biológica, tivemos um resultado promissor para esses adutos avaliados. Essas moléculas foram testadas para quatro espécies diferentes de *Leishmania*, as quais apresentam diversidade molecular que pode influenciar nessa atividade e levam ao desenvolvimento de manifestações clínicas variadas da doença.

Outros estudos, mostraram que outros adutos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman apresentaram atividade biológica sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* (XAVIER et al., 2016; SILVA et al., 2011; SOUZA et al., 2007), *L. chagasi* (LIMA-JUNIOR et al. 2009), como também para *L. amazonensis* e *L. chagasi* (BARBOSA et al., 2011; JUNIOR et al., 2010) e *L. braziliensis* (XAVIER, et al., 2014; AMORIM et al., 2013). Contudo, nenhuma molécula oriunda da reação de MBH tinha sido testada contra as formas promastigotas de *L. donovani*, nem nenhum aduto tinham sido avaliado quanto à atividade anti-*Leishmania* frente a quatro espécies diferentes desse parasito, como o presente trabalho avaliou e mostrou efetivos resultados.

Os estudos para a descoberta e o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das leishmanioses é dificultado por problemas como diferentes respostas a sensibilidade dos compostos em relação à diversidade de espécies de *Leishmania*, como também a diferença farmacocinética das moléculas voltadas para o tratamento de LV e LT (ANDREWS, FISHER, SKINNER-ADAMS, 2014). O resultado da atividade anti-*Leishmania* dos compostos MBH-A12 e MBH-A13 contra as formas promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* mostram diferentes valores de CI_{50}, indicando variações moleculares de interação dos compostos com essa forma do parasito, ou alterações na biologia do mesmo, que resulta em uma variação de resistência a essas drogas.

Em relação aos fármacos de referência, o antimoniato de meglumina apresentou atividade apenas com o uso em altas concentrações, demonstrando que os adutos foram mais eficazes sobre as formas promastigotas das quatro espécies avaliadas de *Leishmania* do que esse fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. O mecanismo de ação desse fármaco envolve principalmente a transformação da forma SBV em SBIII pelos macrófagos, já tendo sido relatado essa baixa atividade sobre as formas promastigotas (SINGH, CHATTERJEE, SUNDAR, 2014; OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004). Já a anfotericina B apresentou, na maioria dos resultados, menores valores de CI_{50} dentre as substâncias testadas. Contudo, esse fármaco apresenta diversos efeitos colaterais, o que limita o seu uso no tratamento das leishmanioses, sendo uma droga de segunda escolha (BARBOSA et al., 2011). Esses resultados reforçam o potencial anti-*Leishmania* dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sobre as diversas espécies de *Leishmania*.

Selecionamos a espécie *L. infantum* e *L. amazonensis* para seguir outras avaliações biológicas frente aos efeitos dos compostos MBH-A12 e MBH-A13, devido aos baixos valores de CI_{50}, por serem espécies que existem no Brasil e acometem indivíduos, como também por causarem manifestações clínicas diferentes, a forma visceral e tegumentar, respectivamente (GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014).

Ampliando o estudo da atividade anti-*Leishmania* dos adutos de MBH, fomos avaliar o efeito sobre as formas amastigotas axênicas. Essas formas são oriundas de métodos alternativos *in vitro*, para triagem de novas moléculas, devido essas serem o estágio de vida do parasito *Leishmania* responsável pelo desenvolvimento

das formas clínicas em humanos (RODRIGUES et al., 2015). De forma semelhante às formas promastigotas, o MBH-A12 e MBH-A13 apresentaram atividade anti-*Leishmania* sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, expresso em baixos valores de CE_{50}. Até o momento, não existe relatos sobre a atividade anti-*Leishmania* de adutos MBH sobre formas amastigotas axênicas, apenas atividade contra a forma amastigota, da espécie *L. braziliensis,* parasitando macrófagos murinos (AMORIM et al, 2013).

Em relação aos fármacos de referência, os adutos selecionados tiveram ação semelhante à atividade biológica contra as formas promastigotas, sendo mais efetivos contra as formas amastigotas axênicas do que o antimoniato de meglumina e menos efetivo do que a anfotericina B. Dessa forma, os adutos apresentaram-se mais efetivos tanto sobre as formas promastigotas quanto as amastigotas axênicas, quando comparados ao antimoniato de meglumina, droga de referência para o tratamento das leishmanioses no Brasil (BRASIL, 2007). Já a anfotericina B apresenta expressiva atividade anti-*Leishmania in vitro*, com baixíssimos valores de CI_{50} e CE_{50}, resultados bem relatados na literatura, contudo, um fator limitante para a sua utilização no tratamento das leishmanioses são os diversos efeitos colaterais apresentados pelos pacientes que fazem uso desse fármaco, como bastante exemplificado anteriormente (SINGH, GARG, VAHAB et al., 2016).

Diante da efetiva atividade anti-*Leishmania* contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, faz-se necessário investigar a atividade citotóxica dos compostos MBH-A12 e MBH-A13 sobre células sanguíneas humanas, na intenção de obtenção de moléculas que sejam mais seletivas para o parasito e menos tóxicas para as células do hospedeiro humano. Foram realizados ensaios de citotoxicidade para as células mononucleares de sangue periférico humano, pelo método colorimétrico utilizando o MTT, e para eritrócitos humanos, através da atividade hemolítica.

O MBH-A12 e MBH-A13 apresentaram valores de CC_{50} maiores do que 4x os valores dos seus respectivos CI_{50} para a forma promastigota de *L. infantum*. Esse resultado indica que os adutos avaliados apresentaram valores de CC_{50} maiores do que os respectivos valores de CI_{50} e CE_{50} para as formas promastigotas e amastigotas axênicas das espécies de *Leishmania* avaliadas, demonstrando a segurança dessas moléculas dentro desses parâmetros *in vitro* avaliados. Além de

que, os valores de CC_{50} podem ser bem maiores do que as concentrações avaliadas nesse teste, o que limita o real nível de não toxicidade para as CMSP.

Adutos de Morita-Baylis-Hillman ainda não tinham sido avaliados quanto à citotoxicidade frente à CMSP. Outro aduto de MBH foi avaliado quanto a sua citotoxicidade contra macrófagos peritoneais murinos, que apresentaram 3,6 vezes mais tóxico para as formas promastigotas de *L. braziliensis* do que para esses macrófagos (AMORIM et al., 2013). Outro estudo observou uma baixa citotoxicidade para macrófagos murinos, em relação às formas promastigotas de *L. braziliensis*, com o tratamento com outros adutos de Morita-Baylis-Hillman racêmicos e enantiômeros puros (XAVIER et al., 2014). Dentro dos estudos de atividade biológica anti-*Leishmania* é ideal avaliar a citotoxicidade envolvendo macrófagos/monócitos, devido eles ser as principais células parasitadas por *Leishmania* spp. no hospedeiro humano (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

Os fármacos de referência se apresentaram de forma diferente frente à toxicidade a CMSP. O antimoniato de meglumina teve uma CC_{50} > 96,12 mg/mL, sendo um valor maior do que todos os valores de CI_{50} apresentados para as quatro espécies de *Leishmania* avaliadas. Contudo, esse valor foi menor do que o seu CE_{50}, mostrando uma falta de seletividade desse composto. A anfotericina B não apresentou toxicidade para as CMSP até o valor de 1,48 µg/mL, a qual foi avaliada.

A segurança de uma substância também pode ser avaliada em outros diferentes ensaios citotóxicos frente a células de humanos. Um desses testes é a avaliação dessas moléculas sobre as células vermelhas do sangue, o qual permite observar a ação dessas substâncias sobre a estabilidade mecânica da membrana plasmática do eritrócito. As substâncias testadas podem gerar modificações na membrana, através de formação de poros ou ruptura total, levando a alterações de permeabilidade que podem levar à morte celular (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

A citotoxicidade do MBH-A12, MBH-A13, MBH-21, MBH-23, MBH-28 e MBH-29 foi avaliada sobre os eritrócitos humanos, revelando a segurança dessas moléculas com uma CH_{50} > 400 µg/mL. Esses valores podem ser ainda maiores, já que não foram avaliados além da concentração de 400 µg/mL, podendo ter resultados ainda mais promissores, que revelem um nível de CC_{50} para eritrócitos ainda maior. Até a realização do presente trabalho, não se tem estudos sobre a avaliação da citotoxicidade de adutos oriundos da reação de MBH sobre eritrócitos humanos, através da atividade hemolítica dos compostos avaliados.

O antimoniato de meglumina obteve toxicidade para os glóbulos vermelhos de 0,429 mg/mL e a anfotericina B apresentou toxicidade para eritrócitos com CH_{50} de 10,72 µg/mL. Esses fármacos, de primeira e segunda escolha para o tratamento das leishmanioses, provocam hemólise, as quais já foram relatadas em alguns estudos. Por isso, a importância da investigação desse efeito adverso na avaliação de fármacos promissores para o tratamento das leishmanioses (LÖFGREN et al., 2008).

Após ser determinada a atividade anti-*Leishmania* dos adutos sobre as formas promastigotas e amastigotas axênicas de algumas espécies desse parasito e os efeitos citotóxicos deles sobre CMSP e eritrócitos, foi possível calcular o IS dessas moléculas. O IS é um parâmetro que avalia se a molécula teste é mais seletiva para o parasito do que para a célula humana, revelando o nível de segurança *in vitro* desses compostos. Esse índice representa a razão dos parâmetros de citotoxicidade em células de mamíferos, CC_{50} (CMSP) ou CH_{50} (eritrócitos), sobre os parâmetros de atividade anti-*Leishmania*, CI_{50} (promastigota) ou CE_{50} (amastigota).

Em relação às CMSP, os resultados mostram que os homodímeros apresentam maior toxicidade para as formas promastigotas avaliadas (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*) do que para as células humanas. Resultado bastante promissor, o observado para o MBH-A13 que teve um valor de ISc > 78,5 em relação a espécie *L. donovani*. Com relação às formas amastigotas axênicas do parasito (*L. infantum* e *L. amazonensis*), os resultados também mostram um tropismo de ação para o protozoário. Comparando com os fármacos de referência, podemos constatar que os adutos possuem um nível de segurança, em alguns casos, melhor do que o fármaco de referência, anfotericina B, como observado para as promastigotas de *L. donovani* e *L. infantum*.

O nível de segurança dos adutos de MBH em relação aos glóbulos vermelhos foram ainda maiores, como observado pelo IS_e de > 1481,5 para o MBH-A13 em relação a forma promastigota da espécie *L. donovani*. Já para as formas amastigotas axênicas, o IS_e chegou a ser > 44,05 em relação a *L. infantum* com o MBH-A12. Esses resultados foram bastante satisfatórios quando comparados com os fármacos de referência, em que os adutos apresentaram índices de selevidade para os eritrócitos superiores aos índices encontrados para o antimoniato de

meglumina. Da mesma forma, em alguns resultados, o mesmo foi observado para a anfotericina B.

Os resultados apresentados indicam que os adutos de Morita-Baylis-Hillman são seguros *in vitro*, por apresentarem uma seletividade maior para o parasito do que para as células sanguíneas humanas. Essa segurança é expressa diante das concentrações utilizadas em cada teste, podendo ser ainda maiores, caso concentrações mais elevadas dessas moléculas sejam avaliadas. Isso representa um grande avanço na avaliação dessas substâncias como promissoras para o tratamento das leishmanioses, sendo esse o primeiro trabalho que mostra a aplicabilidade biológica de novos adutos de MBH. Diante disso, fomos avaliar possíveis mecanismos de ação sobre as formas promastigotas e amastigotas.

A descrição do mecanismo de ação anti-*Leishmania* de adutos derivados da reação de MBH ainda é bastante preliminar, tendo apenas algumas sugestões de acordo com estudos anteriores. Uma das propostas químicas para o entendimento dos nossos resultados são que as duas porções insaturadas α,β-carbonila presente nos homodímeros, façam pontes covalentes com proteases do parasito *Leishmania*. Isto é baseado sobre o fato que, MBH-A similares foram classificados como agentes que se ligam a grupos de tiol (-C-SH-) de forma covalente, grupos esses presentes em enzimas proteases (cisteína) expressas na *Leishmania*. Essa ligação leva a inibição de processos metabólicos, resultando na morte do parasito (DA SILVA et al., 2016). No entanto, essa proposta não justifica toda a bioatividade que encontramos nessas moléculas homodímeras, se fazendo necessário mais estudos sobre os mecanismos de ação dos MBH-A.

O mecanismo de ação dessas moléculas pode variar de acordo com a estrutura química de cada composto, portanto, acredita-se que não há um único mecanismo biológico de ação para todos os adutos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman. Devido à variação das estruturas destes compostos, cada série de adutos pode ter diferentes mecanismos terapêuticos, bem como diferentes rotas metabólicas, que amplia ainda mais o desafio de buscar respostas para o mecanismo biológico dessas moléclulas.

Um dos possíveis caminhos para encontrarmos um mecanismo de ação desses compostos sintéticos seria o estudo de Docking Molecular. Contudo, não temos conhecimento de possíveis alvos que essas moléculas atuam, sendo questionável a validade do estudo de ancoragem molecular. Dessa forma, se faz

necessário, outros estudos de atividade biológica, para direcionar os testes de *Docking* Molecular. Por isso, fomos investigar possíveis mecanismos de ação da atividade anti-*Leishmania* do MBH-A12 e MBH-A13, no qual foram realizados estudos *in vitro* quanto aos mecanismos de taxa de infecção em monócitos humanos, atividade imunomoduladora pela dosagem de NO e indução de morte celular (apoptose/necrose).

Além dos testes realizados diretamente com o parasito e as células sanguíneas humanas, também fomos investigar os efeitos dos adutos MBH-A12 e MBH-A13 em modelo de infecção *in vitro* de monócitos humanos com as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*. As amastigotas intracelulares são a forma morfológica do parasito nos hospedeiros mamíferos, sendo um importante modelo experimental relacionado à atividade anti-*Leishmania* de uma droga *in vitro* e *in vivo* (RUSSELL; TALAMAS-ROHANA, 1989).

O MBH-A12 e MBH-A13 não foram capazes de reduzir a porcentagem de monócitos infectados tanto pela espécie *L. infantum* quanto pela *L. amazonensis*, indicando uma não redução na taxa de infecção de monócitos humanos após o tratamento com essas moléculas. Diferentemente, a anfotericina B, para a infecção com *L. infantum*, resultou na diminuição da taxa de infecção com o tratamento de 4x o valor da CI_{50}. Estudos anteriores se correlacionam com esses resultados para o fármaco de segunda escolha, sendo observado ação biológica apenas com concentrações superiores a 2 µg/mL para monócitos humanos infectados com *L. donovani* (Mukherjee et al., 2010).

Em outro estudo, um aduto de MBH foi investigado quanto à infecção *in vitro* com *L. braziliensis* em macrófagos murinos, sendo observada uma diminuição significativa na taxa de infecção dessas células (AMORIM et al., 2013). Contudo, adutos de Morita-Baylis-Hillman ainda não tinham sido avaliados quanto à taxa de infecção em monócitos humanos, sendo esse o primeiro relato. Esse resultado poderá ser melhor investigado com o teste dessas moléculas em concentrações maiores, as quais não sejam tóxicas para as células sanguíneas humanas, já que a não influência na taxa de infecção, pode ser pelas baixas concentrações utilizadas das drogas testadas.

Apesar dos adutos testados não terem influenciado na taxa de infecção em monócitos humanos, utilizamos o sobrenadante coletado dessas amostras, para avaliarmos se essas drogas teriam induzido algum efeito imunomodulador do tipo

celular pela análise da produção de óxido nítrico. Nosso resultado indica que em nenhuma condição avaliada, ocorreu a indução de NO em monócitos humanos infectados ou não infectados. Diante disso, podemos observar que o tratamento com MBH-A12 e MBH-A13 sobre monócitos humanos não influenciou na taxa de infecção com *L. amazonensis* ou *L. infantum*, como também não foi observado envolvimento da produção de NO.

A avaliação da indução de NO é relevante, pois ele é a principal molécula efetora envolvida no controle de amastigotas intracelulares (UEDA-NAKAMURA et al., 2006). Em modelo humano, os níveis basais de NO em monócitos infectados ou não por *Leishmania* são superiores (> 100μM) aos níveis basais encontrados em modelo com animais (> 2 μM) (THOMAZELLI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2015). Em um estudo realizado com o efeito de outro aduto de MBH, que diminuiu a taxa de infecção de macrófagos murinos com *L. braziliensis*, foi observado que esse efeito foi independente da produção de óxido nítrico, contudo apresentou outras atividades imunomoduladoras (AMORIM et al., 2013). Dados esses que sugerem a investigação de outros efeitos imunomoduladores desses adutos em monócitos humanos infectados por *Leismania* spp.

Posteriormente, foi avaliado o mecanismo de morte celular induzida pelos compostos MBH-A12 e MBH-A13 em *L. infantum* e *L. amazonensis*, analisando o perfil apoptótico/necrótico usando a dupla marcação com anexina V-FITC/IP. A Anexina V, que é uma proteína de ligação com alta afinidade pela fosfatidilserina dependente da presença de Ca^{2+}, é geralmente utilizada para verificar a externalização desse fosfolipídeo de membrana, indicando que as células se encontram em estágio de apoptose. A distinção entre células apoptóticas e necróticas é realizada com uma dupla marcação com o IP, o qual é um intercalante de DNA que apenas atravessa membranas danificadas (MISRA et al., 2008).

Os resultados demonstraram que os adutos se comportam de forma diferente sobre as formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Para a *L. infantum*, foi possível averiguar que apenas o MBH-A13 induz um mecanismo de morte via apoptose, nas duas concentrações testadas. Já para a *L. amazonensis*, os dois adutos induzem o processo de apoptose. A anfotericina B, conhecida por provocar morte celular por apoptose em várias espécies de *Leishmania* (PARIS et al., 2004), foi utilizado nesse estudo como controle positivo, e apresentou um perfil de morte celular por apoptose e necrose. Além da anfotericina B, os antimoniais

pentavalentes também são conhecidos por induzir o efeito de apoptose em *Leishmania* spp. (KUMAR et al., 2010). Os resultados encontrados demonstraram que as moléculas em estudo atuam principalmente pelo mecanismo de apoptose, o qual é um processo fisiológico e ordenado. Diferentemente do que foi apresentado pela droga de referência, em que a anfotericina B mostrou um perfil de apoptose e necrose.

Os mecanismos envolvidos no processo apoptótico em *Leishmania* spp. ainda não estão totalmente claros como em células de mamíferos, devido os tripanosomatídeos não apresentarem algumas moléculas descritas durante a apoptose de organismos pluricelulares (caspases e genes da família Bcl-2). Contudo, apresentam outras moléculas que desencadeiam esse processo (genes homólogos ao da família Bcl-2 e proteases como GSK-3) (KACZANOWSKI; SAJID; REECE, 2011; SMIRLIS et al., 2010). A expressão na membrana plasmática de fosfatidilserina tem a função celular desse fosfolipídeo se tornar ligante de reconhecimento apoptótico para macrófagos, os quais passam a produzir elevados níveis de citocinas como TGF-β1 e IL-10 e diminuir a síntese de TNF-α, inibindo a produção de NO. Dessa forma, cria um ambiente favorável para o crescimento e disseminação do parasito (FRANÇA-COSTA et al., 2012).

A descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes para a leishmaniose são desafiadores, em virtude das diferentes manifestações clínicas da doença, farmacocinética das drogas, resistência a fármacos já existentes, entre outros fatores (ANDREWS, FISHER, SKINNER-ADAMS, 2014). As moléculas híbridas e homodímeras oriundas através da reação de MBH utilizadas nesse trabalho são inéditas, baseadas em estratégias da Química Medicinal. Associada a essa inovação química, temos resultados promissores da bioavaliação desses compostos frente aos parasitas do gênero *Leishmania*.

A busca por um alvo em que atua estes adutos de MBH ainda é um desafio, já que a Química Medicinal nos apresenta variáveis as quais precisam serem bastante avaliadas. Contudo, nosso estudo mostra um potencial biológico desses compostos na atividade *anti-Leishmania*. Outros estudos mostram possíveis alvos para drogas que estão sendo investigadas para essa finalidade, como as enzimas modificadoras de histona desacetilase e anidrase carbônica (ANDREWS, FISHER, SKINNER-ADAMS, 2014). Por isso, com os resultados que obtivemos, podemos inferir que os adutos de MBH possuem condições de avançar nos estudos, no

sentido da descoberta de um novo medicamento para o tratamento das leishmanioses.

Esse é o primeiro relato da ação de homodímeros adutos de Morita-Baylis-Hillman que investiga atividade biológica sobre diversas espécies do parasito *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*), sobre as duas formas morfológicas do protozoário (promastigota e amastigota axênica), toxicidade para células sanguíneas humanas (CMSP e eritrócitos), influência na taxa de infecção com atividade imunomoduladora (NO) e mecanismo de morte celular. De modo que esse trabalho contribui para o direcionamento de outros estudos a serem realizados, na expectativa da descoberta de outros efeitos e dos mecanismos de ação desses adutos, mostrando serem moléculas potencialmente ativas para o tratamento das leishmanioses.

7 CONCLUSÃO

Os compostos químicos sintéticos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman apresentaram significativa atividade anti-*Leishmania* sobre as formas promastigotas de *L. donovani*, sendo os compostos MBH-A12 e MBH-A13 mais efetivos, apresentando menores valores de CI_{50} diante dos compostos avaliados.

As moléculas MBH-A12 e MBH-A13 se mostraram potentes no efeito biológico sobre as formas promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*; como também sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* e *L. amazonensis*.

Esses adutos selecionados apresentaram níveis seletivos *in vitro* quanto à toxicidade para células mononucleares de sangue periférico humano e eritrócitos humanos dentro das concentrações avaliadas. As moléculas têm uma citotoxicidade maior para as formas morfológicas das espécies do parasito *Leishmania* do que para as células mamíferas, resultando assim em ótimos índices de seletividade.

Os compostos sintéticos MBH-A12 e MBH-A13 não possuem efeito sobre a taxa de infecção em monócitos humanos por *L. infantum* e *L. amazonensis*, como também não foi observado variações nos níveis de óxido nítrico.

Os adutos MBH-A12 e MBH-A13 apresentam um melhor perfil de morte celular do que a anfotericina B para as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*, promovendo morte celular por apoptose, enquanto que a anfotericina B promoveu morte por apoptose e necrose.

Dessa forma, observamos que os adutos de Morita-Baylis-Hillman possuem atividade anti-*Leishmania* efetiva sobre as formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania* spp. com efeitos diretos sobre o parasito e sem toxicidade paras células sanguíneas humanas nos teste avaliados. Sendo necessário que essas moléculas sejam investigadas para a descoberta de um possível mecanismo de ação e modulação imunológica, como possíveis fármacos a serem usados no tratamento das leishmanioses.

REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, p. e35671, 2012.

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTYPKA, J. MARTY, P. DELAUNAY, P. SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 10, p. e0004349, 2016.

AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K. S.; BARBOSA, T. P.; NÉRIS, P. L.; CALDAS, J. P.; SOUSA, S. C.; LEITE, J. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; VASCONCELOS, M. S.; OLIVEIRA, M. R. Morita-Baylis-Hillman adduct vitro activity against *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**, v.140, p. 29-38, 2013.

ANDRADE, B. B.; de OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL, A.; BARRALNETTO, M. Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2-3, p. 122–127,2007.

ANDREWS, K.T.; GILLIAN FISHER, T. S.; SKINNER-ADAMS. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, p. 95–111, 2014.

BARBOSA, T. P.; JUNIOR, C. G. L.; SILVA, F. L.; LOPES, H. M.; FIGUEIREDO, L. R. F.; SOUSA, S. C. O.; BATISTA, G. N.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Improved synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): Evaluation against Artemia salina Leach. and *Leishmania chagasi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p.1726-1730, 2009.

BARBOSA, T. P.; SOUSA, S. C.; AMORIM, M. F.; RODRIGUES, Y. K. S.; ASSIS, P. A. C.; CALDAS, J. P. A.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Design, synthesis and antileishmanial *in vitro* activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4250-4256, 2011.

BARREIRO, E. J.; FRAGA,C. A. M. Química Medicinal – as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre, editora Artmed, 2001.

BASAVAIAH, D.; VEERARAGHAVAIAH, G. The Baylis–Hillman reaction: a novel concept for creativity in chemistry. **Chem. Soc. Rev**, v. **41**, p. 68–78, 2012.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Jounal of Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

BERGER, B. A.; BARTLETT, A. H.; SARAVIA, N. G.; SEVILLA, N. G. Pathophysiology of Leishmania Infection during Pregnancy. **Trends in Parasitology**, p. 1-12, 2017.

BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, p. e313, 2008.

BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília. 1ª edição, p. 14 e 31, 2006.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília, 2ª edição, p. 180, 2007.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília. 2ª edição, p. 17-24, 2010.

BRASIL. Relatório de Situação: Paraíba. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde.** 5. ed., Brasília, DF, p. 35, 2011a.

BRASIL. Leishmaniose Visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília. 2011b.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília. 1ª edição, p. 120, 2013.

BURCHMORE, R. J. S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1311–1320, 2001.

CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; ALBUQUERQUE, G. R.; MUNHOZ, A. D.; GROSS, E.; CARNEIRO, P. L. S.; OLIVEIRA, H. C.; ROCHA, J. M.; SANTOS, L. A.; REZENDE, R. P. ***Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in dogs in Brazil: epidemiology, co-infection, and clinical aspects.** Genetics and Molecular Research, v. 14, p. 12062-12073, 2015.

ÇAVUS, I.; OCAK, F.; KAYA, T.; OZBILGIN, A. Manisa İlimizde Görülen Leishmaniasis Etkeni *Leishmania* Türlerinin Kriyoprezervasyonu. **Özgün Araştırma**, v. 41, p. 152-155, 2017.

CHARMOY, M.; AUDERSET, F.; ALLEBACH, C.; TACCHINI-COTTIER, F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p.1-8, 2010.

COELHO, A. C.; GENTIL, L.G.; SILVEIRA, J.F.; COTRIM P. C. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine**.** **Experimental Parasitology**, v. 120, p. 98–102, 2008.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v. 375, p. 239-247, 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S.; CUNHA, K. M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-234, 2002.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 399-410, 2006.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAM, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 111-126, 2006.

DA SILVA, I. A.; MORATO, C. I.; QUIXABEIRA, V. B. L.; PEREIRA, L. I. A.; DORTA, M. L.; OLIVEIRA, M. A. P.; HORTA, M. F.; RIBEIRO-DIAS, F. In vitro metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. **BioMed Research International**, p 1-15, 2015.

DA SILVA, WAGNER A.V.; RODRIGUES, DANIELE C.; DE OLIVEIRA, RAMON G.; MENDES, RHUAN K.S.; OLEGÁRIO, TAYNÁ R.; ROCHA, JULIANA C.; KEESEN, TATJANA S.L.; LIMA-JUNIOR, CLAUDIO G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Synthesis and activity of novel homodimers of Morita-Baylis-Hillman adducts against *Leishmania donovani*: A twin drug approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 4523-4526, 2016.

DAVID, C. V; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, p. 491-502, 2009.

DEBRABANT, A.; JOSHIB, M. B.; PIMENTAC, P. F. P.; DWYERB, D. M. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 205–217, 2004.

DE SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. ***Curr Pharm***, v. 14, n. 9, p. 822-838, 2008.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; LEITE, J. A.; DANTAS, B. B.; LIMA-JÚNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; ARAÚJO, D. A. M. Morita-Baylis-Hillman Adducts Display Anti-Inflammatory Effects by Modulating Inflammatory Mediator Expression in RAW264.7 Cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1-9, 2017.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, p. 179-200, 2010.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; DONCKER, S.; DUJARDIN, J.; AUWERA, G. V. Phylogeny of *Leishmania* species based on heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 238-245, 2010.

FRANÇA-COSTA, J.; WANDERLEY, J. L. M.; DEOLINDO, P.; ZARATTINI, J. B.; COSTA, J.; SOONG, L.; BARCINSKI, M. A.; BARRAL, A.; BORGES, V. M. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* Isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. **PLoS ONE**, v. 7, p. e36595, 2012.

FRANCO, C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana disseminada : revisão sistemática. [Monografia], Salvador, 36 fls., 2014.
FREITAS, E. O.; LEORATTI, F. M. S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT, A.; FEIJO, D. F. The Contribution of immune evasive Mechanisms to Parasite Persistence in visceral Leishmaniasis. **Front. Immunol**, v. 7, p. 1-7, 2016.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; KATO, K. C.; REIS, P. G., LIZARAZO-JAIMES, E. H. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Reviews in Inorganic Chemistry**, v. 33, p. 13-24, 2013.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. **Parasite Immunol**, v. 36, p. 367–376, 2014.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J. A. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. 1-152, 2009.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Infection Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 293-307, 2012.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

HODGKINSON, V. H.; SOONG, L.; DUBOISE, S. M.; MCMAHON-PRATT, D. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. **Experimental parasitology**, v. 83, p. 94-105, 1996.

JAIN, K.; VERMA, A. K.; MISHRA, P. R,; JAIN, N. K. Surface-engineered dendrimeric nanoconjugates for macrophage-targeted delivery of amphotericin B: formulation development, *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, p. 2479-87, 2015.

JEAN-MORENO, V.; ROJAS, R.; GOYENECHE, D.; COOMBS, G.H.; WALKER, J. *Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. **Experimental Parasitology**, v. 112, p. 21–30, 2006.

JUNIOR, C. G. L.; ASSIS, P. A. C.; SILVA, F. L. P.; SOUSA, S. C. O.; ANDRADE, N. G.; BARBOSA, T. P.; NÉRIS, P. L. N.; SEGUNDO, L. V. G.; ANJOS, I. C.; CARVALHO, G. A. U.; ROCHA, G. B.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Efficient synthesis of 16 aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. **Bioorg Chem**, v. 38, p. 279-284, 2010.

LIMA, E. B.; MOTTA, J. O. C.; PORTO, C.; SAMPAIO, R. M. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LIMA-JUNIOR, C,; VASCONCELLOS, M. Morita-Baylis-Hillman assucts: Biological and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. **Bioorganiic & Medicinal Chemistry**, v. 30, p. 3954-71, 2012.

LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; OLIVEIRA, M. R.; LOPES, H. M.; SILVA, F. P. L.; BATISTA, G. N. Improved Synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): evaluation against Artemia salina Leach. and *Leishmania chagasi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1726-1730, 2009.

LIMA-JUNIOR, C.; FAHEINA-MARTINS, G.; BOMFIM, C.; SILVA, E.; DE ARAÚJO, D.; FILHO, E.; VASCONCELLOS, M. Synthesis, cytotoxic activity on leukemia cell lines and quantitative structure-activity relationships (qsar) studies of Morita-Baylis-Hillman adducts. **Medicinal Chemistry (Hilversum)**, v. 12, p. 602-612, 2016.

LINDOSO, J. A.; COSTA, J. M.; QUEIROZ, I. T.; GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniases. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, p. 69-77, 2012.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected Tropical Diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

LÖFGREN, S. E.; MILETTI, L. C.; STEINDEL, M.; BACHÈRE, E.; BARRACCO, M. A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental parasitology**, v. 118, p. 197-202, 2008.

LUKES, Julius et al. Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

KACZANOWSKI, S.; SAJID, M.; REECE, S. E. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 28-44, 2011.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends Parasitol**, v. 22, p. 439-445, 2006.

KATO, H.; GOMEZ, E. A.; CÁCERES, A. G.; UEZATO, H. MIMORI, T.; HASHIGUCHI, Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 814-826, 2010.

KAYE, P.; SCOTT P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, p. 604-615, 2011.
KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world *Leishmania* infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, p. 579-593, 2015.

KUMAR, P.; LODGE, R.; TRUDEL, N.; OUELLET, M.; OUELLETTE, M.; TREMBLAY, M. J. Nelfinavir, an HIV-1 protease inhibitor, induces oxidative stress–mediated, caspase-independent apoptosis in *Leishmania* amastigotes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e642, 2010.

MACIEL, B. L. L.; VALVERDE, J. G.; RODRIGUES-NETO, J. F.; FREIRE-NETO, F.; KEESEN, T. S. L.; JERONIMO, S. M. B. Dual Immune modulatory effect of vitamin a in human visceral leishmaniasis. **Plos One**, v. 9, e107564, 2014.

MAGALHÃES, L.M.; VIANA, A.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W.O. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of Trypanosoma cruzi. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, e 0003816, 2015.

MARCILI, Arlei et al. Phylogenetic relationships of Leishmania species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of Leishmania (L.) infantum chagasi in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44-51, 2014.

MARINHO, F. A.; GONÇALVES, K. C. S.; OLIVEIRA, S. S. C.; GONÇALVES, D. S.; MATTEOLI, F. P.; SEABRA, S. H.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M.; OLIVEIRA, S. S.; SOUTO-PADRÓN, T.; D'AVILA-LEVY, C. M.; SANTOS, A. L.; BRANQUINHA, M. H. The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-12, 2014.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hole for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunology Reviews**, v. 201, p. 206-224, 2004.

MIYAKE, Y; KARANIS, P.; UGA, S. Cryopreservation of protozoan parasites. Cryobiology., v. 48, p. 1-7, 2004

MISRA, P.; Khaliq, T.; Dixit, A.; SenGupta, S.; Samant, M.; Kumari, S.; Kumar, A.; Kushawaha, P. K.; Majumder, H.K.; Saxena, A. K.; Narender, T.; Dube, A. Antileishmanial activity mediated by apoptosis and structure-based target study of peganine hydrochloride dihydrate: an approach for rational drug design. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 62, p. 998-1002, 2008.

MUKHERJEE, A. K.; GUPTA, G.; BHATTACHARJEE, S.; GUHA, S. K.; MAJUMDER, S.; ADHIKARIA, A.; BHATTACHRYA, P.; MAJUMDAR, S. B.; MAJUMDAR, S. Amphotericin B regulates the host immune response in visceral leishmaniasis: Reciprocal regulation of protein kinase C isoforms. **Journal of Infection**, v. 61, p. 173-184, 2010.

NARENDER, P.; GANGADASU, B.; BISWAS, S.; RAO, J. Anti-malarial activity of Baylis–Hillman adducts from substituted 2-chloronicotinaldehydes. **Bioorg. Med. Chem**, v. 15, p. 5378-81, 2005.

NARENDER, P.; SRINIVAS, U.; RAVINDER, M.; RAO, B.; RAMESH, C.; HARAKISHORE, K.; GAN-GADASU, B.; MURTHY, U. S. N.; RAO, V. J. Synthesis of multisubstituted quinolines from Baylis–Hillman adducts obtained from substituted 2-chloronicotinaldehydes and their antimicrobial activity. **Bioorg. Med. Chem**, v. 14, p. 4600-09, 2006.

PAHO (Organização Pan-Americana da Saúde). Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas. **Informe de Leishmanioses**, nº 5. 2017.

PAIVA, Y. G.; JÚNIOR, W. P.; SOUZA, A. A.; COSTA, C. O.; SILVA, F. P. L.; LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; GOULART, M. O. F. Electrochemical and computacional studies, in protic médium, of Morita-Baylis-Hillman adducts and correlation with leishmanicidal activity. Electrochimica acta, v. 140, p. 557-563, 2014.

OLIVIER, M.; ATAYDE, V. D.; ISNARD, A.; HASSANI, K.; SHIO, M. T. Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**. v. 14, pp. 1377- 89, 2012.

OULELLETE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug resistance update**, v. 7, n. 45, p. 257-266, 2004

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BR_EARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 852-859, 2004.

PEREIRA, L. O. R.; BRANDÃO, A. An analysis of trypanosomatids kDNA minicircle by absolute dinucleotide frequency. **Parasitology International**, v. 62, p. 397–403, 2013.

PIGOTT, D. M.; BHATT, S.; GOLDING, N.; DUDA, K. A.; BATTLE, K. E.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; BALARD, Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F.; BROWNSTEIN, J. S.; FREIFELD, C. C.; MEKARU, S. R.; GETHING, P. W.; GEORGE, D. B.; MYERS, M. F.; REITHINGER, R.; HAY, S. I. Global distribution maps of the leishmaniases. **eLife**, v. 3, p. 1-7, 2014.

PURKAIT, B.; KUMAR, A.; NANDI, N.; SARDAR, A. H.; DAS, S.; KUMAR, S.; PANDEY, K.; RAVIDAS, V.; KUMAR, M.; DE, T.; SINGH D.; DAS, P. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 1031-1141, 2012.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug Discovery Today**, v. 20, p. 958-968, 2015.

RATH, S. T. L.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS; M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento de leishmaniose; estado da arte. **Quimica Nova**, v. 26, p. 550-55, 2003.

RAVICHANDRAN, K. S.; LORENZ, U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. **Nature Review Immunology**, v. 7, p. 964-974, 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–96, 2007.

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J., GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-12, 2014.

REIS, A. B. N. S.; ARAÚJO, A. C. C. C. C.; CARVALHO, F. M. G.; GURGEL, G. C. L. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DA PARAÍBA NO PERÍODO DE 2007 A 2015. **II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde**, p 1-12, 2017.

RODRIGUES, K. A. F.; AMORIM, L. V.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A. *Syzygium cumini* (*L.*) skeels essential oil and its major constituent a-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro.* **J. Ethnopharmacol**, v. 160, p. 32-40, 2015.

RUSSELL, D. G.; TALAMAS-ROHANA, P. Leishmania and the macrophage: a marriage of inconvenience. **Immunol**. v. 10, p. 328-333, 1989.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 845-858, 2002.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat Immunol**, v. 3, p. 1041-47, 2002.

SANDES, J. M.; BORGES, A. R.; JUNIOR, C. G. L.; SILVA, F. L. P.; CARVALHO, G. A. U.; ROCHA, G. B.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; FIGUEIREDO, R. B. Q. 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitro-phenylpropanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of Trypanosoma cruzi. **Bioorg Chem**, v. 38, p. 190-95, 2010.

SANDES, J. M.; FONTES, A.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; DE CASTRO, M. C. A. B.; LIMA-JUNIOR, C. G.; SILVA, F. P. L.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Trypanosoma cruzi cell death induced by the Morita-Baylis-Hillman adduct 3-Hydroxy-2-Methylene-3-(4-Nitrophenylpropanenitrile). **Plos One**, v. 9, p. e93936, 2014.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 2-26, 2017.

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**, vol. 11, p. 685-704, 2011.

SILVA, F. P. L.; DE ASSIS, P. A. A. C.; JUNIOR, C. G. L.; DE ANDRADE, N. G.; DA CUNHA, S. M. D.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Synthesis, evaluation against *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity assays in macrophages of sixteen new congeners Morita Baylis Hillman adducts. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4295-4301, 2011.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; DE SOUZA, A. A. A.; LAISON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por L. (V.) braziliensis e L. (L.) amazonensis. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, p. 9-19, 2008.

SILVEIRA, F. T.; LAISON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* and *L.* (*L.*) *amazonensis* in american cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 423-431, 2009.

SINGH, K.; GARG, G.; VAHAB, A. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. **Current Drug Metabolism**, v.17, p. 1-23, 2016.

SINGH, N; CHATTERJEE, M.; SUNDAR, S. The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 596-607, 2014.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy,** v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SMIRLIS, D.; DUSZENKO, M.; RUIZ, A. J.; SCOULICA, E.; BASTIEN, P.; FASEL, N.; SOTERIADOU, K. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites & vectors**, v. 3, p. 1-15, 2010.

SOARES, R. P.; MACEDO, M. E.; ROPERT, C.; GONTIJO, N. F.; ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T.; PIMENTA, P. F.; TURCO, S. J. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Mol Biochem Parasitol,** v. 121, p. 213-224, 2002.

SOARES, R. P. P.; CRADOSO, T. L.; BARRON, T.; ARAÚJO, M. S. S.; PIMENTA, P. F. P.; TURCO, S. J. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **International Jounal of Parasitology**, v. 35, p. 245-253, 2005.

SOUZA, R. O.; PEREIRA, V. L. P.; MUZITANO, M. F.; FALCÃO, C. A. B.; ROSSI-BERGMANN, B.; FILHO, E. B. A.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl) propanenitrile and analogous compounds. **Eur. J. Med. Chem**, v. 42, p. 99-102, 2007.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors,** v. 10, n. 1, p. 82-92, 2017.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, p. 733-740, 2007.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229-242. 2007.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; KOREHISA MAZA, P.; PRADO DIAS FILHO, B.; APARÍCIO GARCIA CORTEZ, D.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S.; LOPES, A. H.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, p. 99-105, 2006.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 309-322, 2012.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 297-318, 2002.

VASCONCELLOS, M. L. A. A.; SILVA, T. S. M.; CAMARA, C. A.; MARTINS, R. M.; LACERDA, K. M.; LOPES, H. M.; PEREIRA, V. L. P.; SOUZA, R. O.; CRESPO, L. T. C. Baylis-Hillmanadducts with molluscicidal activity against Biomphalaria glabrata. **Pest. Man-age. Sci.**, v. 62, p. 288-92, 2006.

XAVIER, F. J. S. S; NETO, J.; NERIS, P. L. ; OLIVEIRA, M. R.; VALE, J. A.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Kinetic resolution of leishmanicidal meta and para (±)-2-[Hydroxy(nitrophenyl) methyl]acrylonitrile catalyzed by CALB: *in vitro* evaluations of separated meta (R), (S) and (R/S) adducts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 7-12, 2014.

XAVIER, F.; RODRIGUES, K.; DE OLIVEIRA, R.; LIMA JUNIOR, C.; ROCHA, J.; KEESEN, T.; DE OLIVEIRA, M.; SILVA, F.; VASCONCELLOS, M. Synthesis and in vitro anti-*Leishmania amazonensis* biological screening of Morita-Baylis-Hillman Adducts prepared from Eugenol, Thymol and Carvacrol. **Molecules**, v. 21, p. 1483-95, 2016.

WANDERLEY, J. L. M.; COSTA, J. F.; BORGES, V. M.; BARCINSKI, M. Subversion of immunity by *Leishmania amazonensis* parasites: possible role of phosphatidylserine as a main regulator. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2017a. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/. Acesso em: outubro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Access to essential antileishmanial medicines and treatment**. 2017b. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/. Acesso em: setembro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological situation**. 2017c. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/#. Acesso em: julho de 2017.

ZIJLSTRA, E. E.; MUSA, A. M.; KHALIL, E. A. G.; EL-HASSAN, I. M.; EL-HASSAN, A. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **The Lancet Infectious diseases**, v. 3, p. 87-98, 2003.

ANEXO A – CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO DE *LEISHMANIA* (*LEISHMANIA*) *DONOVANI*

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC – WDCM 731
Serviço de isolamento, cultivo, tipagem e doação de Leishmania

CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO

CA 038/2015

Solicitação nº: SC 017/2015

Solicitante: Tatjana Keesen de Souza Lima

Instituição: UFPB - Lab. de Imunologia das Doenças Infecciosas

Endereço completo: Centro de Biotecnologia – Campus I - João Pessoa - PB

Data da solicitação: 13/04/2015 Data liberação da amostra: 05/05/2015

IOC-L	0563
Referência Internacional	MHOM/ET/1967/HU3
Identificação	*L. (L.) donovani*
Método de caracterização	☑ Isoenzimas ☐ PCR
Arquivo de Ensaio Isoenzimático	040 (Nº) / 2013(ANO)
Lote	016/2015
Quantidade	2 mL
Meio de cultura utilizado	Schneider
Antibióticos usados	Penicilina-Estreptomicina
Temperatura de cultivo	25ºC
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	☐ Positiva ☑ Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2903; onde M = Mamalia (classe); HOM = Homo sapiens (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2903 = nome ou código da cepa.
(WHO Technical Report Series 949 – Control off Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010)

Importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras do CLIOC.

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de Leishmania doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar http://cloc.fiocruz.br, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou instituições que não o CLIOC.

Responsável UR/NTL/CLIOC

Ana Rosiane Maria Temporal
Tecnologista / Chefe Substituta
Lab. de Pesq. em Leishmanioses
SIAPE 1554155-1 - IOC/FIOCRUZ

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-360 – Brasil
Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar – salas 508,502, 1º andar – sala 110
Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8190 – Fax: (0055) (21) 3865-8193

ANEXO B – CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO DE *LEISHMANIA* (*LEISHMANIA*) *AMAZONENSIS*



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC - WDCM 731
Serviço de isolamento, cultivo, tipagem e doação de Leishmania

CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO

CA 040/2015

Solicitação nº: SC 017/2015

Solicitante: Tatjana Keesen de Souza Lima

Instituição: UFPB - Lab. de Imunologia das Doenças Infecciosas

Endereço completo: Centro de Biotecnologia – Campus I - João Pessoa - PB

Data da solicitação: 13/04/2015 Data liberação da amostra: 05/05/2015

IOC-L	0575
Referência Internacional	IFLA/BR/1967/PH8
Identificação	*L. (L.) amazonensis*
Método de caracterização	☑ Isoenzimas ☐ PCR
Arquivo de Ensaio Isoenzimático	040 (Nº) / 2013(ANO)
Lote	016/2015
Quantidade	2 mL
Meio de cultura utilizado	Schneider
Antibióticos usados	Penicilina-Estreptomicina
Temperatura de cultivo	25ºC
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	☐ Positiva ☑ Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2903; onde M = Mamífero (classe); HOM = Homo sapiens (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2903 = nome ou código da cepa.
(WHO Technical Report Series 949 – Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010)

Importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras da CLIOC.

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC" aos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de Leishmania doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar http://cloc.fiocruz.br, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou instituições que não a CLIOC.

Responsável LIRN/LCLIOC

Rosaura Maria Tomazini
Tecnologista / Chefe Substituta
Lab. de Pesq. em Leishmanioses
SIAPE 1554155-1 - IOC/FIOCRUZ

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-360 – Brasil
Pavilhão Lauro Travassos, 3º andar – salas 308,322, 1º andar – sala 116
Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8196 – Fax: (0055) (21) 3865-8193

[FORM-POP-LIRN/LCLIOC-020-002] Rev.04 Página 1 de 1

ANEXO C – CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO DE *LEISHMANIA* (*VIANNIA*) *BRAZILIENSIS*

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC – WDCM 731
Serviço de isolamento, cultivo, tipagem e doação de Leishmania

CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO

CA 039/2015

Solicitação nº: SC 017/2015

Solicitante: Tatjana Keesen de Souza Lima

Instituição: UFPB - Lab. de Imunologia das Doenças Infecciosas

Endereço completo: Centro de Biotecnologia - Campus I - João Pessoa - PB

Data da solicitação: 13/04/2015 Data liberação da amostra: 05/05/2015

IOC-L	0566
Referência Internacional	MHOM/BR/1975/M2903
Identificação	*L. (V.) braziliensis*
Método de caracterização	☑ Iso-enzimas ☐ PCR
Arquivo de Ensaio Isoenzimático	040 (Nº) / 2013 (ANO)
Lote	016/2015
Quantidade	2 mL
Meio de cultura utilizado	Schneider
Antibióticos usados	Penicilina-Estreptomicina
Temperatura de cultivo	25ºC
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	☐ Positiva ☑ Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2903; onde M = Mamalo (classe); HOM = Homo sapiens (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2903 = nome ou código da cepa.
(WHO Technical Report Series 949 – Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010)

Importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras da CLIOC.

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de Leishmania doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar http://clioc.fiocruz.br, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou instituições que não a CLIOC.

Responsável LIRNTL/CLIOC

Dra. Rossana Maria Temporal
Tecnologista / Chefe Substituta
Lab. de Pesq. em Leishmanioses
SIAPE 1684185-1 - IOC/FIOCRUZ

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-360 – Brasil
Pavilhão Leônidas Deane, 8º andar – salas 806,808; 1º andar – sala 116
Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 – Fax: (0055) (21) 3865-8193

ANEXO D – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS INDIVÍDUOS VOLUNTÁRIOS QUE PARTICIPARAM DA PESQUISA

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

PgPNSB

QUESTIONÁRIO

Projeto: Investigação da Atividade Biológica dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman sobre *Leishmania* spp.

Pesquisadora: Juliana da Câmara Rocha

IDENTIFICAÇÃO **DATA:___/___/___**

Nome:
Endereço: Bairro:
Cidade: Telefone:
Data de nascimento: Idade:
Sexo: Naturalidade:

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Tipo de residência:
Profissão:
Escolaridade:
Algum caso de leishmaniose na família:
Algum caso de leishmaniose na família:
Possui cães:
Algum caso de calazar em cães:
Algum caso de calazar no bairro:
Teve algum contato com pessoas com leishmaniose:

QUEIXAS

Febre: Anorexia: Fadiga: Palidez: Perda de Peso:
Vômito: Fraqueza: Icterícia: Diarreia: Sangramento:
Outros: _____

MEDICAMENTO

Uso de algum medicamento de uso crônico?

Quais: _____

DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Peso:

Altura:

Circunferência Abdominal:

OBSERVAÇÕES:

_____

Responsável pela coleta de dados

ANEXO E – TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIENCIAS DA SAUDE
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO
EM PRODUTOS NATURAIS E SINTETICOS BIOATIVOS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE DOUTORADO

Título do Projeto: Investigação da Atividade Biológica dos Adutos De Morita-Baylis-Hillman sobre *Leishmania* spp.

Pesquisador: Juliana da Câmara Rocha

I. Esclarecimentos

Estamos convidando você para participar como voluntário de uma pesquisa sobre leishmanioses. Com essa pesquisa nós queremos verificar a eficácia terapêutica de novas drogas visto que a terapêutica atual dessa doença traz sérios efeitos colaterais para os pacientes. Para isto, vamos avaliar o efeito dessas novas drogas diretamente sobre o parasito, *in vitro*, verificaremos também se essas drogas possuem eficácia na infecção de células sanguíneas, procedimento totalmente *in* vitro. Estudaremos também se essas drogas possuem algum tipo de toxicidade *in vitro* contra células humanas (hemácias e monócitos) para verificar se há segurança no uso dessas substâncias.

Caso você aceite em participar do estudo você fará uma consulta médica e deverá permitir a coleta de sangue. Você também deverá responder um questionário a respeito da sua saúde. Quando você estiver respondendo esse questionário se alguma pergunta lhe causar constrangimento você poderá deixar de respondê-la.

Vamos a seguir, explicar a você para que usaremos o sangue coletado e os riscos e desconforto que poderão existir.

Coleta de sangue- Serão coletados por uma pessoa treinada aproximadamente 10 ml de sangue, usando-se material estéril e descartável. Os riscos e desconfortos que você correrá nessa coleta são mínimos e poderá ser desmaio, sangramentos, manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta. Iremos minimizar este risco com cuidados na realização deste procedimento, que são a limpeza no local da coleta usando-se álcool 70% e pressionando o local de coleta por alguns minutos, depois da retirada da agulha. Com o sangue iremos isolar algumas células, infectá-las e averiguar se as drogas que trabalhamos são eficazes na eliminação do agente causador da leishmaniose e se são tóxicas para as células do sangue. Não há risco algum nesse procedimento, pois será feito apenas com seu sangue em laboratório, e em dia e local diferente da coleta.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa é que você será informado do resultado do teste para leishmaniose. Você também irá facilitar a busca pela melhoria dos estudos na pesquisa da leishmaniose, podendo no futuro contribuir com informações que poderão ser utilizadas na busca da melhoria no tratamento da doença e/ou da cura.

Garantimos que todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Caso você tenha interesse nos resultados da pesquisa basta solicitar ao pesquisador responsável.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, você não será pago por participar do estudo. No entanto, caso você tenha algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, e se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito à indenização.

Você ficará com uma cópia deste documento e toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá entrar em contato com o Me. Juliana da Câmara Rocha, no Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária- João Pessoa - PB - Brasil - CEP: 58051-900 Fone: (83) 999202656.

Dúvidas a respeito de questões éticas desta pesquisa poderão ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde/UFPB.

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será desenvolvida, os riscos e benefícios envolvidos, bem como os meus direitos, e concordo em participar voluntariamente do estudo "**Investigação da Atividade Biológica dos Adutos De Morita-Baylis-Hillman sobre *Leishmania* spp.**" autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

Participante da pesquisa:

_____**data** ____/____/____

Voluntário:

_____**data** ____/____/____

Pesquisador

ANEXO F - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN SOBRE LEISHMANIA spp.

Pesquisador: JULIANA DA CAMARA ROCHA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62944118.5.0000.5188

Instituição Proponente: Universidade Federal da Paraíba

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.560.097

Apresentação do Projeto:

O Projeto de Pesquisa INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLISHILLMAN
SOBRE LEISHMANIA spp./Pesquisador Responsável: JULIANA DA CAMARAROCHA/UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA/CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/PROGRAMA DEPÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS.Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima (Orientadora)

Desenho:

O projeto se desenvolverá com atividades experimentais in vitro, com testes dos compostos sintéticos avaiaidos com parasitos do gênero Leishmania e células sanguíneas humanas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a atividade anti- Leishmania dos compostos sintéticos adutos Morita-Baylis-Hillman e sua ação nas células do sistema imunológico in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos e desconfortos que poderá ocorrer na coleta são mínimos e poderá ser desmaio, sangramentos, manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta;

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** eticacesufpb@hotmail.com

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Continuação do Parecer: 2.590.097

Benefícios:

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa é que você será informado do resultado do teste para leishmaniose. Você também irá facilitar a busca pela melhoria dos estudos na pesquisa da leishmaniose, podendo no futuro contribuir com informações que poderão ser utilizadas na busca da melhoria no tratamento da doença e/ou da cura.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente Projeto de Pesquisa-INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ADUTOS DE MORITABAYLIS- HILLMAN SOBRE LEISHMANIA spp está descrito com as diversas etapas necessárias para que o mesmo seja desenvolvido incluindo: apresentação, desenho do estudo, resumo, introdução, objetivos, riscos/benefícios, metodologia, cronograma, orçamento e outros. Está escrito de forma clara e objetiva, de ótima leitura e compreensão.

A documentação exigida pela Resolução 466/2012/CNS/MS que regulamenta as pesquisas envolvendo seres humanos, está incluída como folha de rosto, TCLE e outros.

Metodologia Proposta:

-Avaliação dos compostos sintéticos sobre formas promastigotas de L. donovani, L. infantum, L. amazonensis e L. braziliensis através/ teste do MTT; Avaliação dos compostos sintéticos sobre a forma amastigota axênica de L. infantum e L. amazonensis/teste do MTT;Determinação da citotoxicidade nas formas promastigotas de L. infantum e L. amazonensis por citometria de fluxo;

-Coleta de sangue: ensaios de toxicidade- nove indivíduos/16 a 60 anos.

As correções foram realizadas: incluído o modelo de entrevista e modificado a faixa etária para 18-60 anos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação estão compatíveis com o tema abordado.Documentos anexados.

Foi incluído o modelo de Questionário e feito a correção da faixa etária para 18 a 60 anos.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não tem lista de pendências.

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** eticaccsufpb@hotmail.com

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Continuação do Parecer: 2.580.097

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1062298.pdf	25/02/2018 14:00:41		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_Resposta_ao_CEP.pdf	25/02/2018 13:59:15	JULIANA DA CAMARA ROCHA	Aceito
Outros	Questionario.pdf	25/02/2018 13:58:40	JULIANA DA CAMARA ROCHA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_para_o_Comite_de_Etica.pdf	25/02/2018 13:57:45	JULIANA DA CAMARA ROCHA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_da_PgPNSB.pdf	01/02/2018 11:05:06	JULIANA DA CAMARA ROCHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/02/2018 11:01:10	JULIANA DA CAMARA ROCHA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	01/02/2018 11:00:55	JULIANA DA CAMARA ROCHA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** eticaccsufpb@hotmail.com

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Continuação do Parecer: 2.590.097

JOAO PESSOA, 23 de Março de 2018

Assinado por:
Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador)

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-000
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** eticaccsufpb@hotmail.com

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo relacionado a tese, publicado na revista Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (Fator de impacto 2,454; Qualis – B1 Farmácia);

APÊNDICE B – Artigo relacionado à tese, publicado na revista Molecules (Fator de impacto 2,861; Qualis – B1 Farmácia);

APÊNDICE C – Artigo não relacionado à tese, publicado na revista Molecules (Fator de impacto 2,861; Qualis – B1 Farmácia);

APÊNDICE D – Artigo não relacionado à tese, publicado na revista European Journal of Medicinal Chemistry (Fator de impacto 4,519; Qualis – A1 Farmácia);

APÊNDICE E – Artigo não relacionado à tese, publicado na revista Current Pharmaceutical Design (Fator de impacto 2,611; Qualis – B1 Farmácia).

APÊNDICE F – Artigo não relacionado à tese, publicado na revista Criobiology (Fator de impacto 1,996; Qualis – B1 Farmácia).

APÊNDICE A

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters
journal homepage: www.elsevier.com

Synthesis and activity of novel homodimers of Morita-Baylis-Hillman adducts against *Leishmania donovani*: a twin drug approach

Wagner A. V. da Silva[a], Claudio G. Lima-Junior [a], Daniele da Cunha Rodrigues [a], Ramon G. de Oliveira, [a] Rhuan K. S. Mendes [a], Tayná R. Olegário[a], Juliana da Câmara Rocha[b], Tatjana S. L. Keesen [b], and Mário L. A. A. Vasconcellos [a,*]

[a] *Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58059-900 João Pessoa, PB, Brazil.*
[b] *Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58059-900 João Pessoa, PB, Brazil.*

ARTICLE INFO

Article history:
Received
Revised
Accepted
Available online

Keywords:
Morita-Baylis-Hillman adducts
Homodimers
Twin drugs
Leishmania donovani

ABSTRACT

It is reported here the synthesis of novel Homodimers **12-19** of Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA) from one-pot Morita-Baylis-Hillman Reaction (MBHR) between aromatic aldehydes as eletrophiles and ethylene glycol diacrylate as Michael acceptor (35-94% yields) using cheap and *green* conditions. The bioactivities were evaluated against promastigote form of *Leishmania donovani*. All homodimers showed to be more potent than corresponding monomers. It is worth highlighting that the halogenated homodimers **17** and **18** (0.27 μg/mL) is almost 200 times more active than the corresponding monomer **10** and 2.1 times more potent than the second-line drug amphotericin B (0.57μg/mL). Moreover, the selectivity index to **18** is very high (SI_{fb} >734.48) far better than amphotericin B (SI_{fb}=18.61). This is the first report of twin drugs strategy applied on Morita-Baylis-Hillman adducts.

2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoan *Leishmania*, and affects millions worldwide. As this parasite infection leads to an immunological imbalance outcome. Deeper studies on the new treatments and mechanisms involved in intracellular pathogen control are essential. Infection with the protozoa parasite *Leishmania* can cause several clinical forms of disease such as tegumentary or visceral forms,[1,2] this last one is the severe form and the major cause of mortality.[3] This clinical form is caused by *Leishmania donovani* [2] and the development of new drugs and treatments is a necessity due to the resistance and cytotoxicity of commercial drugs used in treatment of human visceral leishmaniasis (HVL). In this context, the Morita-Baylis-Hillman reaction (MBHR) is an important chemical transformation which allows not only access to poly-functionalized molecules with considerable synthetic potential as also promising biological profiles.[4,5] Several Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA) have been reported as bioactive compounds against neglected diseases such as leishmaniasis, schistosomiasis, malaria and Chagas disease.[6]

In connection with our continuum interest in synthesis of new Morita-Baylis-Hillman adducts with potent antiparasitic activity [6-8] herein we report the synthesis of homodimers of Morita-Baylis-Hillman adducts based on twin drug approach.

This approach is supported by an association of two identical pharmacophoric entities generating an "identical twin drug" which is equivalent to a homodimer derivative.[9-11] Some authors have been suggested that administration of twin drugs can be favorable when compared with two separated drugs presenting own pharmacokinetic and pharmacodynamics proprieties.[10-12] The antiparasitic Piperaquine (**1**), bis-aminoacridine (**2**) and potent acetylcholinesterase inhibitor bis-tacrine (**3**) are some examples of twin drugs (homodimers) present in literature (Figure. 1).[12,13]

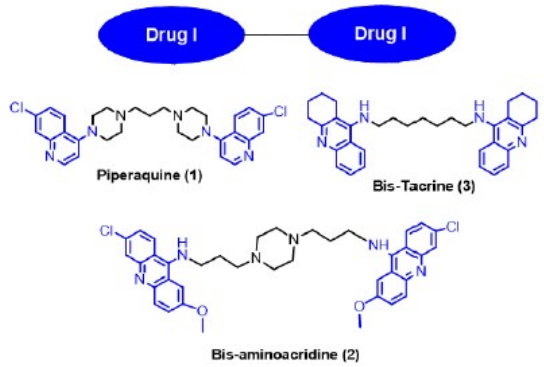


Figure 1. Synthetic bioactive homodimers as twin drugs.

The design of new homodimers of Morita-Baylis-Hillman adducts was based on compounds **4-11** presented in Figure 2. Except **9**, all Morita-Baylis-Hillman adducts already presented activity against promastigote and amastigote forms of

Leishmania amazonensis and *Leishmania chagasi*.[7,15] The structure of eight new homodimers synthesized in this work are presented in Figure 3.

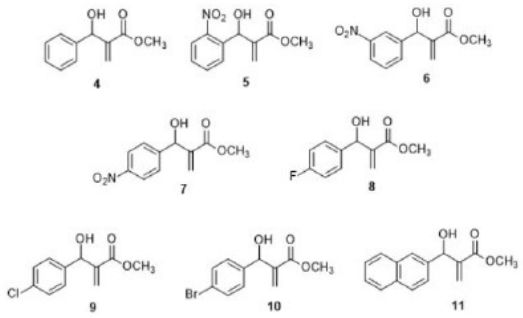


Figure 2. Antileishmanial MBHA previously described by us (**4-8**, **10**, **11**) and described here (**9**).

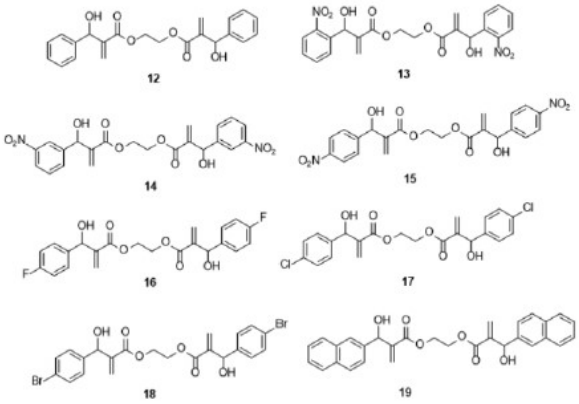
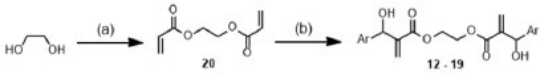


Figure 3. New Homodimers (**12-19**) of MBHA synthesized and biologically evaluated in this article.

We began our experimental work preparing ethylene glycol diacrylate **20** (Scheme 1). This compound was synthetized by reaction between acrylic acid, ethylene glycol under *p*-toluene sulfonic acid catalysis at 110 °C. The diacrylate **20** was obtained in 86% after 6 hours of reflux.[16] ^{1}H NMR and ^{13}C NMR analysis confirmed the structure **20** (see supplementary data).

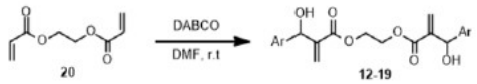


Scheme 1. (a) Acrylic acid (2 equiv.), TsOH (10%mol), hydroquinone, cyclohexane, Dean-stark, 110 °C, 6h (86%); (b) 1 equiv. DABCO, Aldehydes (2 equiv.), optimized conditions in Table 3 (35-94%).

Due to higher reactivity of 2-nitrobenzaldehyde and bioactivity against leishmaniasis of MBHA derivatives of this starting material, we have decided to find an efficient experimental protocol to optimize the synthesis of **13**, and then apply such protocol to synthesize other MBHA **12**, **14–19**. Initially, to a mixture 2:1 of 2-nitrobenzaldehyde and **20** as Michael acceptor in acetonitrile, DABCO as promoter was added and stirred for 24 hour at room temperature. The reaction afforded homodimeric MBHA **13** in 88%. After we have studied the solvent effect. Thus, MBHR were performed between the 2-nitrobenzaldehyde and acceptor **20** using some solvents, such as DMF, DMF: H_2O (6:4), ^{t}BuOH, ^{t}BuOH:H_2O (6:4) and DMSO. The reactions time were fixed in 24 h. It was observed that **13** was obtained in better yield using DMF (94% yield). With the solvent optimal conditions established, we investigated the influence of temperature in this reaction. Thus, reactions were performed at 80 °C under microwave irradiation and low temperature (0 °C) [17,18] in the presence of DABCO and DMF. It was observed that **13** was obtained in low yields in microwave and temperature protocols (25% yields).

With the optimal conditions for the preparation of **13**, we examined the MBHR between aromatic aldehydes as electrophile and ethylene glycol diacrylate **20** as Michael acceptor aiming to obtain new homodimers of MBHA (**12-19**). All reactions were carried out using DMF as solvent, DABCO (1 equiv.) as promoter at room temperature. The results of **12-19** preparations are presented in Table 1.

Table 1. Synthesis of homodimers of Morita-Baylis-Hillman adducts (**12 – 19**).



Entry	Ar	Homodimer	Time	Yield %
1	C_6H_5	**12**	20 days	60
2	*o*-$(NO_2)C_6H_4$	**13**	24 h	94
3	*m*-$(NO_2)C_6H_4$	**14**	24 h	88
4	*p*-$(NO_2)C_6H_4$	**15**	24 h	92
5	p-$(F)C_6H_4$	**16**	20 days	35
6	p-$(Cl)C_6H_4$	**17**	20 days	48
7	p-$(Br)C_6H_4$	**18**	20 days	40
8	2-$C_{10}H_7$	**19**	20 days	35

It is possible to highlight in Table 1 that homodimers **12-15** were obtained in moderate to excellent yields (Table 1, entries 1-4). However, no efficient results were obtained preparing homodimers **16-19**, due to long reactions times, low yields were obtained ranging from 35-48% (Table 3, entries 5-8). Up to date, the Morita-Baylis-Hillman reaction with diacrylates like-**20** was reported only once in the literature.[19] The synthesis described by Shanmugam *et al.* performed in 35% yield using 1,6-hexanediol acrylate and isomerics pyridinecarboxaldehydes.[19] The homodimers synthesized here were characterized by spectroscopic analysis such as ^{1}H, ^{13}C NMR and HRMS (for detailed information see the supplementary data). The adducts **4 - 11** also were prepared using procedures recently described by us.[20] Homodimers **12-19** and monomers MBHA **4-11** were evaluated *in vitro* against the promastigote forms of *Leishmania donovani* [21-24] .The IC_{50} values are shown in Table 2.

Table 2. Antileishmanial activity of compounds **4-19** reference drug Amphotericin B.

MBHA	IC_{50} µg/mL	IC_{50} µM	HC_{50}µM	SI_{rb} [a]	LogP
4	183.00	953.13	-	-	1.64
12	48.21	126.20	-	-	3.04
5	163.60	690.29	-	-	1.21
13	11.69	24.77	-	-	1.73
6	38.23	161.31	-	-	1.21
14	20.30	43.01	-	-	1.73
7	39.19	165.36	-	-	1.21
15	21.07	44.64	-	-	1.73
8	128.10	610.00	-	-	1.80
16	17.71	42.37	-	-	3.35
9	45.60	201.77	-	-	2.20
17	4.71	10.47	>200	>42.39	4.15
10	53.07	196.55	-	-	2.47
18	0.27	0.50	>200	>734.48	4.70
11	44.86	185.37	-	-	2.64
19	18.79	38.98	-	-	5.03
Amphotericin B	0.57	0.62	11.61	18.61	1.16

[a] SI_{rb} (selectivity index on red blood cell) = HC_{50}/IC_{50}.

We can observe in Table 2 that homodimers **12-19** are much more potent than corresponding monomers MBHA **4-11**, proving once again the successful strategy of twin drugs.[9-11] Surprisingly homodimer **18** showed IC_{50} = 0.27 µg/mL being almost 200 times more active than respective monomer **9** and showing to be 2.1 times more active than reference drug amphotericin B (IC_{50} = 0.57 µg/mL). Although amphotericin B is the second-line drug, it is well known for its severe and potential lethal side effects, and too expensive for the majority of the poor population. The haemolytic assays (HC_{50} > 200µM) showed that the **17** and **18** did not exhibit toxicity towards human red blood cells, unlike amphotericin B (HC_{50}=11.61µM Table 2).[25] It is worth noting here that this is the first report on the strategy of twin drugs applied on Morita-Baylis-Hillman adducts.

Up to now, there is no knowledge of the exact mechanism of action MBHA in Leishmania targets. A proposal to rationalize our results is that the two unsaturated α,β-carbonyl portion present in homodimers does hereby as covalent irreversible inhibitors of Leishmania proteases and more active than aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts **4 - 11** (Figure 4). This is based on the fact, recently described, where similar MBHA were classified as covalent irreversible thiol-trapping agents.[26] Leishmania express many peptidases during their life, and cysteine are the most abundant proteases.[27]

However, considering only the presence of two identical pharmacophoric groups, this fact does not explain the enormous difference in activity of **10** monomer and homodimer **18** (200 times more potent). We believe that the pharmacokinetic properties (ADME) and especially the conformational change of the dimeric **18** versus monomeric **10** can explain this difference in bioactivity.

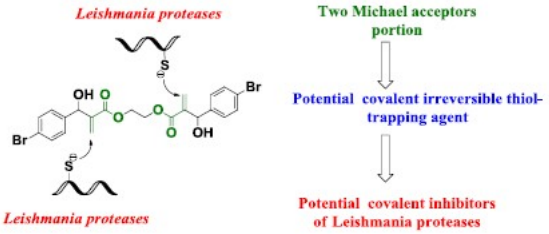


Figure 4. Insight about possible mechanism of action of homodimers of Morita-Baylis-Hillman adducts.

In Figure 5, the conformational minima of **10** and **18** are shown.[28] We can note in this complex like-cage conformation of **18** several intramolecular hydrogen bonds and interactions between the aromatic rings in Like-T position.[29] Moreover, unlike the **10** minimum, in conformational minimum of **18** there are a s-cis and a s-trans geometries to the acrylates moieties. Noteworthy is the direct attraction of the two bromine atoms which has great importance in molecular geometry of the dimer **18**. It is well reported in the literature the importance of halogens in increasing bioactivity due to chlorine and bromine connections in enzymatic environment.[30] However, we do not know the pharmacophoric conformations of **10** and **18**. Studies on biological mechanisms of action of **18** are now in progress.

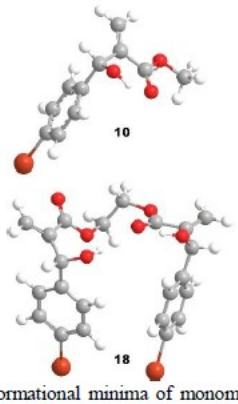


Figure 5. Conformational minima of monomer **10** and homodimer **18**. Since enantiomers present same energies, the calculations were performed for (R)-**10**. However, homodimer **18** has two asymmetric carbons and we show the conformational minimum of most stabled diastereomer.

In conclusion, we have synthesized eighty new homodimers of MBHA **12-19** from reaction between diacrylate **20** and aromatic aldehydes as starting materials. All homodimers were designed based on twin drug approach and **12–19** were much more active against promastigote forms of *Leishmania donovani* than respective monomers MBHA **4-11.** The homodimer **18** (0.27 µg/mL) is almost 200 times more active than the corresponding monomer **10** and 2.1 times more potent than second-line drug amphotericin B (0.57µg/mL). Besides this, homodimer **18** does not exhibit toxicity on red blood cell studies (SI_{rb} >734) which

represents a major advance in the VL treatment. These new homodimers are very easy and cheap to prepare in *green* conditions. This is the first report of twin drugs strategy applied on Morita-Baylis-Hillman adducts which have showed promising as novel leishmanicidal drug candidates.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge CNPq and CAPES for financial support.

References and notes

1. Cunningham, J.; Hasker, E.; Das, P.; El Safi, S.; Goto, H.; Mondal, D.; Mbuchi, M.; Mukhtar, M.; Rabello, A.; Rijal, S.; Sundar, S.; Wasunna, M.; Adams, E.; Menten, J.; Peeling, R.; Boelaert, M.; *Clin. Infect. Dis*. **2012**, 15, 1312.
2. Lindoso, J. A. L. L.; Costa, J. M. L. C; Queiroz, I. T.; Goto, H; *Res. Rep. Trop. Med.* **2012**, 3, 69.
3. Maciel, B. L. L.; Valverde, J. G.; Rodrigues-Neto, J. F.; Freire-Neto, F.; Keesen, T. S. L.; Jeronimo, S. M. B.; Plos One, **2014**, 9.
4. Santos, M. S.; Coelho, F; Lima-Junior, C. G.; Vasconcellos, M. L. A. A.; *Curr.Org. Synt*. **2015**, 12, 830.
5. Bhowmik, S; Batra, S.; *Curr.Org. Chem.*, **2014**, 18, 3078.
6. Lima-Junior, C. G.; Vasconcellos, M. L. A. A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 3954.
7. Junior, C. G. L.; Assis, P. A. C.; Silva, F. P. L.; Sousa, S. C. O.; Andrade, N. G.; Barbosa, T. P.; Neris, P. L. N.; Segundo, L. V. G.; Anjos, I. C.; Carvalho, G. A. U.; Rocha, G. B.; Oliveira, M. R.; Vasconcellos, M. L. A. A.; *Bioorg. Chem*. **2010**, 38, 279.
8. Sandes, J. M.; Borges, A. R.; Junior, C. G. L.; Silva, F. P. L.; Carvalho, G. A. U.; Rocha, G. B.; Vasconcellos, M. L. A. A.; Figueiredo, R. C. B. Q.; *Bioorg. Chem*. **2010**, 38, 190.
9. Silva, F. P. L.; Assis, P. A. C.; Junior, C. G. L.; Andrade, N. G.; Cunha, S. M. D.; Oliveira, M. R.; Vasconcellos, M. L. A. A.; *Eur. J. Med. Chem*. **2011**, 46, 4295
10. Contreras, J. -M.; Sippl, W. In *The practice in Medicinal Chemistry*, 3rd ed.; Wermuth, C. G.; ed.; Elsevier Ltd., London, UK, 2008, pp. 380.
11. Namanja, H. A.; Emmert, D.; Hrycyna, C. A.; Chmielewski, J. *Med. Chem. Commun*. **2013**, 4, 1344.
12. Tomassoli, I.; Gündisch, D.; *Bioorg. Med. Chem*. **2015**, 23, 4375.
13. Vennerstrom, J. L.; Ellis, W. Y.; Jr., A. L. A.; Andersen, S. L.; Gerena, L.; Milhous, W. K.; *J. Med. Chem*. **1992**, 35, 2129.
14. Hu, M. K.; Wu, L. J.; Hsiao, G.; Yen, M. H.; *J. Med. Chem*. **2002**, 45, 2277.
15. De Souza, R. M. O. A.; Pereira, V. L. P.; Muzitano, M. F.; Falcão, C. A. B.; Rossi-Bergmann, B.; Filho, E. B. A.; Vasconcellos, M. L. A. A.; *Eur. J. Med. Chem*. **2007**, 42, 99.
16. Wu, C. B.; Hao, J. Y.; Deng, X. M.; *Polymer* **2007**, 48, 6272.
17. de Souza, R.O.M.A.; Vasconcellos, M.L.A.A.; *Synth. Commun.* **2003**,33, 1383.
18. de Souza, R.O.M.A; Vasconcellos, M.L.A.A.;.; *Catal. Commun*. **2004**, 5, 21.
19. Malini, K.; Periyaraja, S.; Shanmugam, P.; *Tetrahedron Lett*. **2015**, 56, 5123.
20. Junior, C. G. L.; Silva, F. P. L.; Oliveira, R. G.; Subrinho, F. L.; Andrade, N. G.; Vasconcellos, M. L. A. A.; *J. Braz. Chem. Soc*. **2011**, 11, 2220.
21. Leishmania culture: Leishmania (Leishmania) donovani (MHOM/ET/1967/HU3) was provided by Oswaldo Cruz Institute Leishmania Collection-Fiocruz-RJ-Brazil. Promastigotes were maintained in vitro at 26° C in Schneider's medium, pH 7 (20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin and 2% of male urine), as previously described
22. Moreira, R. C. R.; Costa, G. C.; Lopes, T. C.; Bezerra, J. L.; Guerra, R. N. M.; Rebêlo, J. M. M.; Ribeiro, M. N. S.; Nascimento, F. R. F.; Costa, J. M. L.; *Rev. Bras. de Farmacogn.* **2007**, 17, 59.
23. *Antipromastigotes activities:* promastigotes in the logarithmic growth phase were cultured in 96-well cell culture plates at 1 X 10^6 parasites per well in 100 mL of Schneider's medium with increasing concentrations of 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL of Morita-Baylis-Hillman adduct. The plates were incubated for 72 h in a biological oxygen demand (B.O.D.) incubator at 26° C. Cytotoxicity to promastigotes was evaluated by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colourimetric assay . The absorbance was measured using an ELISA plate reader (ELx800, BIOTEK) at 540 nm. Anphotericin® was used as a positive control. The viability of promastigotes incubated in the presence of different concentrations of adducts was determined by comparing to culture control (L. donovani cultivated in Schneider only). The concentration that caused a 50% reduction in cell viability (IC_{50}) was calculated by Probit analysis (SPSS 13.0 for Windows). Each experiment was performed in duplicate and repeated at least 3 times.
24. Valadares, D. G.; Duarte, M. C.; Oliveira, J. S.; Chávez-Fumagalli, M. A.; Martins, V. T.; Costa, L. E.; Leite, J. P. V.; Santoro, M. M.; Régis, W. C. B.; Tavares, C. A. P.; Coelho, E. A. F.; *Parasitol. Int.* **2011**, 60, 357.
25. Rodrigues, K.A.F.; Dias, C.N.S.; Néris, P.L.N. Rocha, J. C.; Scotti, M.T.; Scotti, L. Mascarenhas, S. R.; Veras, R. C.; de Medeiros, I. A.; Keesena, T.S.L.; de Oliveira, T.B.; de Lima, M.C.A; Ballianof, T.L.; de Aquino, T.M.; de Moura, R. L.; Mendonça Junior, F.J.B.; Oliveira, M. R. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 106, 1.
26. Cocco, M.; Garella, D.; Di Stilo, A.; Borretto, E.; Stevanato, L.; Giorgis, M.; Marini, E.; Fantozzi, R.; Bertinaria, M.; *J. Med.Chem*. **2014**, 57, 10366.
27. Das, P.; Alam, Md N.; Paik, D.; Karmakar, K.; De, T.; Chakraborti, T.; *Indian J. Biochem. Biophys*. **2013**, 50, 363.
28. The geometries were fully optimized with minimum potential energy surface by means of the Relaxed Potential Energy Surface Scan (RPESS) at PM6, followed by the HF/631g* as theoretical level. No imaginary frequency was found in this calculations. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.;Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.;Li, ;Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.;Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.;Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.;Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.;Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J.; Gaussian09L, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009
29. Burley, S.K; Petsko, G.A.; *Science*. **1985**, 229, 23.
30. Hernandes, M. Z.; Cavalcanti, S.M. T.; Moreira, D. R.M.; Azevedo-Junior, W. F. Lima-Leite, A. C.; *Drug Targets* **2010**, 11, 303.

Supplementary data

APÊNDICE B

molecules

MDPI

Article

Synthesis of 16 New Hybrids from Tetrahydropyrans Derivatives and Morita-Baylis-Hillman Adducts: In Vitro Screening against *Leishmania donovani*

Suervy Canuto de Oliveira Sousa [1], Juliana da Câmara Rocha [2], Tatjana de Souza Lima Keesen [2], Everton da Paz Silva [1], Priscilla Anne Castro de Assis [1,3], João Paulo Gomes de Oliveira [1], Saulo Luís Capim [4], Francisco José Seixas Xavier [1], Bruno Guimarães Marinho [5], Fábio Pedrosa Lins Silva [1], Claudio Gabriel Lima-Junior [1,*] and Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos [1,*]

1 Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil; suervy@gmail.com (S.C.d.O.S.); notreve.bn@hotmail.com (E.d.P.S.); priscilla.cassis@gmail.com (P.A.C.d.A.); jp_0108@hotmail.com (J.P.G.d.O.); seicxhas@hotmail.com (F.J.S.X.); pedrosalinssilva@gmail.com (F.P.L.S.)

2 Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil ; ju_jurocha@hotmail.com (J.d.C.R.); tat.keesen@cbiotec.ufpb.br (T.d.S.L.K.)

3 Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Campus Cuité, Cuité, PB 58175-000, Brazil

4 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Campus Catu, Barão de Camaçari, Catu, BA 48110-000, Brazil; sauloquimico@hotmail.com

5 Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas and Laboratório de Farmacologia, Departamento Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências e Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Seropédica, RJ 23890-000, Brazil; bruno.marinho78@hotmail.com

* Correspondence: claudio@quimica.ufpb.br (C.G.L.J.); mlaav@quimica.ufpb.br (M.L.A.d.A.V.); Tel.: +55-083-3216-7589 (C.G.L.J. & M.L.A.d.A.V.)

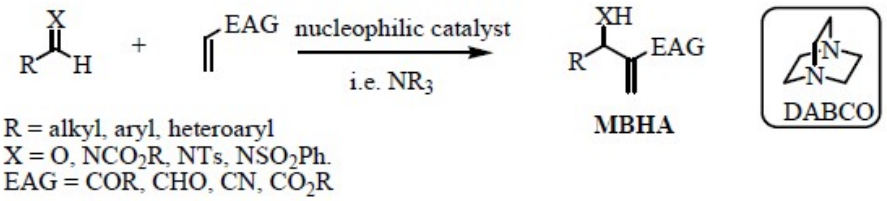
Academic Editors: Diego Muñoz-Torrero and Kelly Chibale
Received: 19 December 2016; Accepted: 25 January 2017; Published: 30 January 2017

Abstract: Leishmaniases are a group of neglected tropical diseases (NTDs) caused by protozoan parasites from >20 *Leishmania* species. Visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-aza, is the most severe form of leishmaniasis, usually fatal in the absence of treatment in 95% of cases. The Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHAs) are being explored as drug candidates against several diseases, one of them being leishmaniasis. We present here the design, synthesis and in vitro screening against *Leishmania donovani* of sixteen new molecular hybrids from analgesic/anti-inflammatory tetrahydropyrans derivatives and Morita-Baylis-Hillman adducts. First, acrylates were synthesized from analgesic/anti-inflammatory tetrahydropyrans using acrylic acid under TsOH as a catalyst (70%–75% yields). After the 16 new MBHAs were prepared in moderate to good yields (60%–95%) promoted by microwave irradiation or low temperature (0 °C) in protic and aprotic medium. The hybrids were evaluated in vitro on the promastigote stage of *Leishmania donovani* by determining their inhibitory concentrations 50% (IC_{50}), 50% hemolysis concentration (HC_{50}), selectivity index (HC_{50}/IC_{50},), and comparing to Amphotericin B, chosen as the anti-leishmanial reference drug. The hybrid which presents the bromine atom in its chemical structure presents high leishmanicide activity and the high selectivity index in red blood cells (SI_{rb} > 180.19), compared with the highly-toxic reference drug (SI_{rb} = 33.05), indicating that the bromine hybrid is a promising compound for further biological studies.

Keywords: antileishmanial Morita-Baylis-Hillman adducts; opioids tetrahydropyrans derivatives; molecular hybridization; *Leishmania donovani*

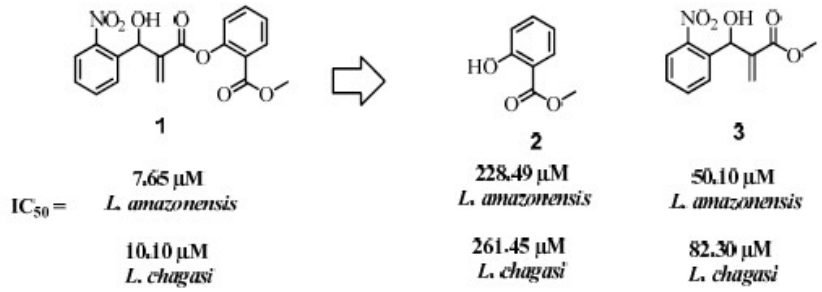
lengthy, toxic, and expensive. In some cases, hospitalization is required, leading to discontinuance of treatment when some improvement is observed in the patient [5]. In addition, *Leishmania* is developing tolerance to the most effective drugs on the market; therefore, the drugs are losing efficiency. Thus, the development of more efficient and cheaper drugs to improve the pharmacological action and the discovery of novel therapeutic targets against trypanosomatids (e.g., *Leishmania* spp.) are major themes of this field [6].

In the last ten years, our research group has been continuously dedicated to the design, synthesis and biological evaluation of Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHAs) as antileishmanial treatments and as treatments against other parasitic NTDs [7]. The Morita-Baylis-Hillman reaction (MBHR, Scheme 1) has been consolidated as an efficient methodology for C-C bond formation [7–9]. Polyfunctional MBHA products are obtained in one step by the MBHR by using nucleophilic catalysis (DABCO is the most common catalyst) under metal-free conditions and may be performed in an aqueous solvent mixture or in a solvent-free medium. MBHR is now classified as an important green reaction in organic syntheses [7].



Scheme 1. General Morita-Baylis-Hillman reaction. EAG = Electron attractor group.

In 2011, we reported that MBHA **1** (a chalcone-like compound), designed from the molecular hybridization [10] of the analgesic methyl salicylate (**2**) and the MBHA **3** (Scheme 2), presented a lower IC_{50} in a congener series of compounds and was shown to be an efficient molecular hybrid and a promising leishmanicidal drug.



Scheme 2. Molecular hybridization between MBHA 3 and methyl salicylate 2 for the design of hybrid **1**.

In connection with our interest in discovering new compounds with efficient leishmanicidal properties [7,11–15], we present here the design, syntheses, and in vitro leishmanicidal evaluations against *L. amazonensis* of nine new *o*-, *m*- and *p*-nitro MBHA hybrids based on the synergistic biological proprieties of the abundant and inexpensive essential oil ingredients eugenol (**4**), thymol (**5**) and carvacrol (**6**) (Figure 1). It is important to note that eugenol (**4**) is an analgesic with leishmanicidal [16] and several others biological activities [17,18]. Thymol (**5**) and carvacrol (**6**) present analgesic and leishmanicidal activities [19]. In Figure 1, we also present MBHAs **16**, **17** and **3**, which were also biologically evaluated to compare motifs [15]. A conformational DFT study is presented to corroborate our proposed mechanism of the reduction of nitroaryl derivatives concerning these *nitro*-MBHAs [19].

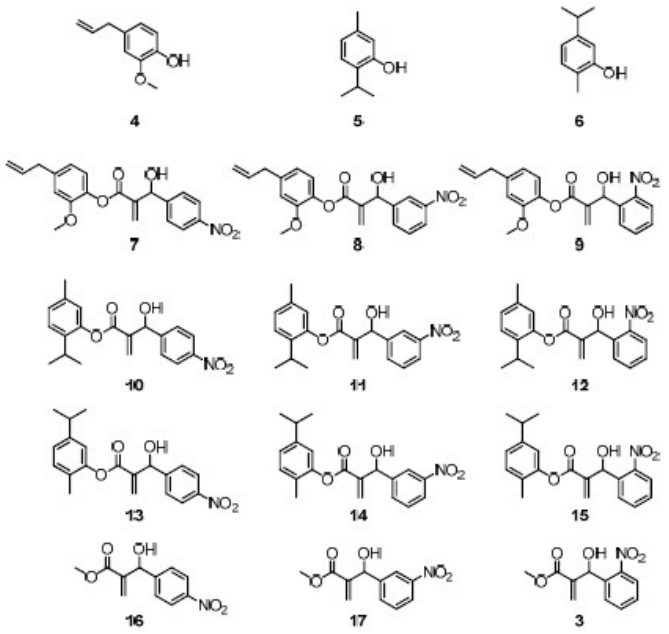
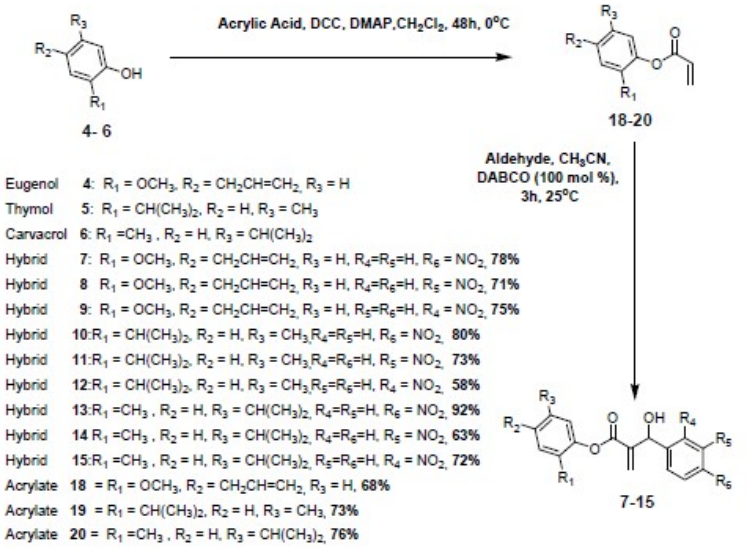


Figure 1. The MBHA hybrids synthetized, biologically evaluated and conformationally studied in this paper and eugenol (**4**), thymol (**5**), and carvacrol (**6**). Compounds **7–9** are hybrids derived from eugenol; compounds **10–12** are hybrids made from thymol. Compounds **13–15** are hybrids of carvacrol. Compounds **16**, **17** and **3** are MBHAs.

2. Results and Discussion

The new acrylates **18–20** and hybrids **7–15** (Figure 1) were synthesized according to Scheme 3. Eugenol, thymol and carvacrol acrylate **18–20** were prepared by the respective reactions with DCC and DMAP (catalytic) at 0 °C in dry dichloromethane (Scheme 3). For the synthesis of hybrids **7–15**, acetonitrile was used without drying, however, we observed hydrolysis reactions of the hybrids leading to the products at low yields (<40% yields). To optimize the reaction yields, dry acetonitrile was used as a solvent at room temperature to thus obtain hybrids **7–15** in moderate to good yields (Scheme 3).



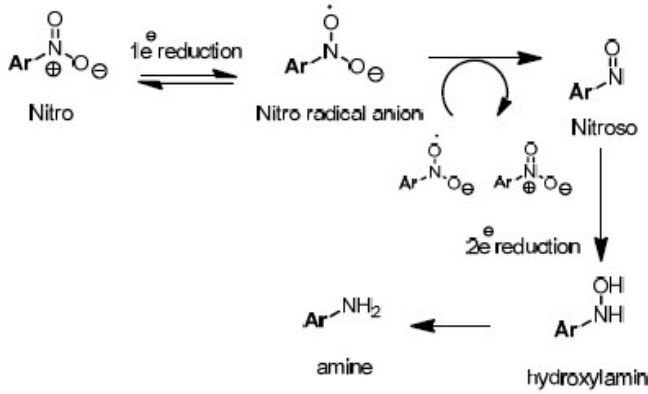
Scheme 3. Reagents, conditions, rates, and yields (%) of our preparations of new compounds **7–15** and **18–20**.

The antileishmanial activities against promastigotes of *L. amazonensis* of compounds **3–17** are presented in Table 1. Some results in this Table should be highlighted here.

Table 1. The antileishmanial activities against promastigotes of *L. amazonensis*. Values represent the average IC_{50} calculated in three independent experiments ± standard error of the mean. For this calculation, we used the probabilistic regression models with SPSS 13.0 software. SIrb (selectivity index on red blood cell) = HC_{50}/IC_{50}.

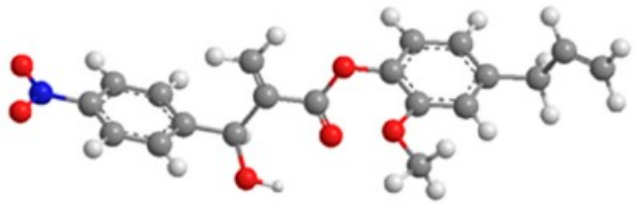
Entry	Compounds	IC_{50} (μM)	HC_{50} (μM)	SIrb	miLogP
1	**4**	77.15 ± 1.77	>400	>5.18	2.10
2	**7**	8.75 ± 0.44	>400	>45.71	3.05
3	**8**	10.49 ± 0.52	>400	>38.13	3.02
4	**9**	4.71 ± 0.24	>400	>84.92	3.00
5	**5**	115.12 ± 5.77	-	-	3.34
6	**10**	11.40 ± 0.57	-	-	4.05
7	**11**	10.56 ± 0.53	-	-	4.03
8	**12**	5.91 ± 0.30	-	-	4.00
9	**6**	138.11 ± 6.91	-	-	3.81
11	**13**	18.08 ± 0.90	-	-	4.52
12	**14**	22.30 ± 1.12	-	-	4.50
13	**15**	13.60 ± 0.68	-	-	4.47
14	**16**	15.77 ± 0.79	>400	>25.36	1.53
15	**17**	22.38 ± 1.12	>400	>17.87	1.50
16	**3**	12.06 ± 0.60	>400	>33.16	1.48
17	Glucantime®	1633.49 ± 437.29	1175.02	1.39	−2.68
18	AmphotericinB	0.52 ± 0.03	11.61	22.34	−2.49

We can observe that eugenol (**4**, Entry 1) exhibits greater leishmanicidal activity than the other essential oils thymol (**5**, Entry 5) and carvacrol (**6**, Entry 9). All hybrids derived from eugenol (compounds **7–9**, Entries 2–4), thymol (**10–12**, Entries 6–8) and carvacrol (**13–15**, Entries 11–13) exhibit higher antileishmanial activity than the corresponding essential oils ingredients. The hybrids of eugenol (compounds **7–9**, Entries 2–4) showed lower IC_{50} values than the other series. Another very important dataset shown in Table 1, which is in agreement with previously obtained data by our research group [7], indicates that the nitrated MBHAs presenting an *ortho* nitro group on the aromatic ring are more bioactive against promastigotes of *L. amazonensis* than the corresponding *meta* and *para* nitroaryl isomers. Several nitro aromatics are used as anti-infective agents, e.g., drugs to treat parasitic infections. The biological activity of the nitro compounds is connected to a *nitro* group reduction that generates $RNO^{-\bullet}$ or more reduced intermediates (Scheme 4) [19].

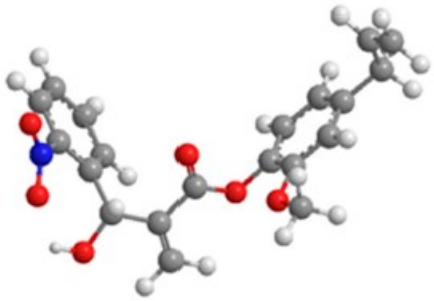


Scheme 4. General scheme of the $2e^-$ nitro aromatic reduction (Ar = aromatic group).

Currently, the exact mechanism of action of MBHAs against *Leishmania* targets is not known. To propose a biological mechanism of action for these new nitroaryl hybrids and to elucidate the reasons behind the higher bioactivity of the *ortho* nitro regioisomer compared to the *meta* and *para* regioisomers, the calculation of the more stable conformation of 7 and 9 in a simulated aqueous medium were performed. These geometries are shown in Figure 2.



7



9

Figure 2. Conformational minima of hybrids 7 and 9 obtained by M062X//6-31+G(d,p) in implicit water simulation as the level of the calculations.

In previous electrochemical studies by cyclic voltammetry of the corresponding adducts **16**, **17** and **3** (Figure 1), it was observed that *ortho* aryl **3** is more easily reduced to the corresponding anion radical ($ArNO_2^{-\bullet}$) of the isomers **16** and **17** [20,21]. It was proposed by QTAIM calculations that the dihedral deviation of the NO_2 moiety in *ortho* aryl **9** with the aromatic ring is caused by the intramolecular hydrogen bonding (IHB) of the seven-member grouping (HO—O-N-O, IHB = 2.104 Å) [22], which is responsible for the highest electron affinity of this nitrogen. These data are accepted as the reason behind the ease of the biological reduction the *ortho* nitro compounds related to their greater leishmanicidal activity [21]. We can note from Figure 2 that, in the hybrid **7**, the nitro group is nearly coplanar with an aromatic ring (dihedral angle $NO_2 - Ar = 1.7°$), which is very different from the observation of hybrid **9** (dihedral angle $NO_2 - Ar = 31.0°$). Thus, the radical intermediates from *ortho* MBHA could present higher lifetimes than those of the *para* nitro regioisomer in cytoplasmic medium, increasing the cleavage of the nuclear membrane of protozoa [21].

3. Materials and Methods

3.1. Experimental Chemistry

General

All commercially available reagents and solvents were obtained from the provider Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) and used without further purification. Reactions were monitored by TLC using Silica gel 60 UV254 pre-coated silica gel plates (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA) and detection was performed using a UV lamp. Flash column chromatography was performed on 300–400 mesh silica gels. Organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$ or Na_2SO_4 prior to evaporation using a rotary evaporator. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectra were recorded using a Mercury Spectra AC 20

spectrometer (200 MHz for ^{1}H, 50 MHz for ^{13}C, Varian, (Varian, Palo Alto, CA, USA). Chemical shifts were reported relative to internal tetramethylsilane (δ 0.00 ppm) for ^{1}H, using $CDCl_3$ as the solvent. FTIR spectra were recorded using a model IRPrestige-21 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) in KBr pellets. The high-resolution mass spectrometry (HRMS) of new compounds **7**–**15** (Figure 1) was performed using a Q-Tof quadrupole/orthogonal instrument (Waters, Milford, MA, USA) in positive and negative mode.

*3.2. General Procedure for Esterification of Eugenol (**4**), Thymol (**5**) and Carvacrol (**6**) with Acrylic Acid; Preparation of Compounds* **18**–**20**

Eugenol (**3**, 1.640 g, 10.0 mmol), thymol (**4**, 1.500 g, 10.0 mmol) or carvacrol (**5**, 1.500 g, 10.0 mmol) and dry dichloromethane (10.0 mL) were added in a bottle flask. After homogenization in an ice-bath and magnetic stirring, DCC (2.060 g, 10.0 mmol) and DMAP (0.122 g, 1 mmol) were added. The reaction was monitored by TL chromatography for 48 h. Filtration on a separating funnel was performed. Water was added and the reaction mixture was extracted with dichloromethane (30.0 mL × 2). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator. Purification was performed using a chromatographic column containing 30.0 g of flash silica gel, using 100.0 mL of hexane as eluent followed by a mixture of 300 mL ethyl acetate/hexane (30%). The fractions were collected, and the solvent was evaporated from the obtained product using a rotary evaporator. The expected products were colorless, somewhat viscous oils and solid at temperatures below 0 °C.

3.2.1. 4-Allyl-2-methoxyphenyl acrylate (**18**)

68% yield; FTIR KBr: 1745 cm^{-1} (C=O); 1637 cm^{-1} (C=C); 1602 (C=C); 1035 cm^{-1} (C-O-C). ^{1}H-NMR δ (ppm): 6.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-Ar); 6.84–6.73 (m, 2H, H-Ar); 6.60 (dd, *J* = 17.3, 1.6 Hz, 1H, CH_2=CH); 6.33 (dd, *J* = 17.3, 10.3 Hz, 1H, CH_2=CH); 6.06–5.84 (m, 2H, CH=CH_2); 5.17–5.03 (m, 2H, CH_2=CH); 3.79 (s, 3H, CH_3OPh); 3.37 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH_2Ph). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.28 (C_3); 150.91 (C_7); 139.07 (C_9); 137.67 (C_4); 137.04 (C_1); 132.46 (C_{10}); 127.64 (C_2); 122.50 (C_5); 120.68 (C_6); 116.18 (C_{12}); 112.75 (C_8); 55.81 (C_{13}); 40.10 (C_{11}).

3.2.2. 2-Isopropyl-5-methylphenyl acrylate (**19**)

73% yield; FTIR KBr: 1743 cm^{-1} (C=O); 1622 cm^{-1} (C=C). ^{1}H-NMR δ (ppm): 7.19 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-Ar); 7.00 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, H-Ar);)6.69 (s, 1H, H-Ar); 6.57 (dd, *J* = 17.2, 1.4 Hz, 1H, CH_2=CH); 6.33 (dd, *J* = 17.3, 10.3 Hz, 1H, CH=CH_2); 5.97 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, CH_2=CH); 2.98–2.75 (m, 1H, HC-$(CH_3)_2$); 2.13 (s, 3H, H_3C-Ph), 1.23 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, $(CH_3)_2$-CH). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.41 (C3); 149.12 (C6); 148.10 (C_4); 132.43 (C_1); 130.93 (C_8); 127.86 (C_2); 127.23 (C_9); 124.24 (C_7); 119.73 (C_5); 33.60, (C_{11}); 23.95 ($C_{12/12'}$); 15.80 (C_{10}).

3.2.3. 5-Isopropyl-2-methylphenyl acrylate (**20**)

76% yield; FTIR KBr: 1743 cm^{-1} (C=O); 1635 cm^{-1} (C=C); 1622 cm^{-1} (C=C). ^{1}H-NMR δ (ppm): 7.08 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-Ar); 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-Ar);) 6.69 (s, 1H, H-Ar); 6.57 (dd, *J* = 17.2, 1.4 Hz, 1H, CH_2=CH); 6.33 (dd, *J* = 17.3, 10.3 Hz, 1H, CH=CH_2); 5.97 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, CH_2=CH); 2.98–2.75 (m, 1H, HC-$(CH_3)_2$); 2.13 (s, 3H, H_3C-Ph), 1.23 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, $(CH_3)_2$-CH). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.41 (C_3); 149.12 (C_6); 148.10 (C_4); 132.43 (C_1); 130.93 (C_8); 127.86 (C_2); 127.23 (C_9); 124.24 (C_7); 119.73 (C_5); 33.60, (C_{11}); 23.95 ($C_{12e12'}$); 15.80 (C_{10}).

3.3. General Synthesis of the MBHAs **16**, **17** *and* **3**

The compounds **16**, **17** and **3** synthesized in this work are not new and were characterized using ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR for comparison with the compounds described in the literature [14]. Reactions were carried out using the corresponding aldehydes (1 mmol), methyl acrylate (0.5 mL) and of DABCO

(1 mmol) at 0 °C. After some time, the reaction media was directly filtered through silica gel using EtOAc-hexane (2:8) as the solvent, and the reaction products were concentrated under reduced pressure. The products were then ready for biological evaluations without the need of further purification.

3.3.1. 2-[Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl]propanoate (**16**)

85% yield; ^{1}H-NMR δ (ppm): d, 8.16 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.54 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 6.36 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.60 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.41 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H). ^{13}C-NMR δ (ppm): 52.2 (1C), 72.6 (1C), 123.5 (1C), 137.2 (1C), 127.3 (1C), 140.8 (1C), 147.3 (1C), 148.5 (1C), 166.3 (1C).

3.3.2. 2-[Hydroxy(3-nitrophenyl)methyl]propanoate (**17**)

98% yield; ^{1}H-NMR δ (ppm): d, 8.22 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H); 8.08–8.13 (m, 1H); 7.69–7.73 (m, 1H); 7.50 (t, *J* = 8 Hz, 1H); 6.38 (s, 1H); 5.89 (s, 1H); 5.60 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H); 3.70 (s, 3H); 3.46 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H). ^{13}C-NMR δ (ppm): 52.2 (1C), 72.5 (1C), 121.5 (1C), 122.7 (1C), 127.2 (1C), 129.3 (1C), 132.7 (1C), 140.9 (1C), 143.5 (1C), 148.2 (1C), 166.3 (1C).

3.3.3. 2-[Hydroxy(2-nitrophenyl)methyl]propanoate (**3**)

92% yield; ^{1}H-NMR δ (ppm): d, 7.92 (dd, *J* = 8.2/1.2 Hz, 1H); 7.73 (dd, *J* = 7.8/1.8 Hz, 1H); 7.62 (ddd, *J* = 7.8/1.2/1.0 Hz, 1H); 7.43 (ddd, *J* = 8.0/1.6/1.6 Hz, 1H); 6.38 (s, 1H); 5.89 (d, 1H); 5.60 (d, *J* = 4.4 Hz, 1 Hz); 3.70 (s, 3H); 3.60 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H). ^{13}C-NMR δ (ppm): 52.20 (1C), 67.56 (1C), 124.55 (1C), 126.48 (1C), 128.67 (C), 128.67 (C) 133.47 (1C), 136.05 (1C), 140.65 (1C), 148.32 (1C), 166.39 (1C).

3.4. General Synthesis of the Hybrids **7–15**

To a 25.0 mL flask, acrylate **18**, **19** or **20** (0.5 mmol), the corresponding nitro-substituted aldehyde (0.6 mmol), and dry acetonitrile (1.0 mL) were added. To the resulting solution DABCO (0.5 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature and monitored by TLC for 3 h. The purified product was obtained by using 6.0 g of silica and 10.0 mL of acetonitrile to form a dispersion and added to a chromatographic column containing 30.0 g of flash silica gel. A mixture of 300 mL ethyl acetate/hexane 5% followed by 200 mL 15% acetate/hexane was used as an eluent. The fractions were separated and transferred to a rotary evaporator. The respective products were yellowish viscous oils at ambient temperature. All spectra are available in the Supplementary information.

3.4.1. 4-Allyl-2-methoxyphenyl 2-(hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)acrylate (**7**)

78% yield; FTIR: 3450 cm^{-1} (O-H); 1735 cm^{-1} (C=O); 1637 cm^{-1} (C=C); 1602 cm^{-1} (C=C); 1531 and 1350 cm^{-1} (R-NO_2), 1035 cm^{-1} (C-O-C). ^{1}H-NMR δ (ppm): 8.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-Ar); 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-Ar); 6.95–6.89 (m, 1H, H-Ar); 6.81–6.73 (m, 2H, H-Ar); 6.64 (s, 1H, H-C-OH); 6.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH_2=C); 5.96–5.70 (m, 2H, CH=CH_2 and CH_2=C); 5.16–5.03 (m, 2H, CH_2=CH); 3.72 (s, 3H, CH_3OPh); 3.40 (t, *J* = 13.3 Hz, 3H, CH_2Ph and HO-C). ^{13}C-NMR δ (ppm): 168.81 (C_8); 155.16 (C_{14}); 153.19 (C_4); 152.16 (C_3); 145.44 (C_6); 144.22 (C_{12}); 141.95 (C_9); 141.56 (C_{16}); 133.51 (C_7); 132.24 (C1e1′); 128.29 (C2e2′); 127.01 (C_{10}); 125.46 (C_{11}); 121.03 (C_{17}); 117.37 (C_{13}); 77.33 (C_5); 60.45 (C_{18}); 44.78 (C_{15}). HRMS (TOF MS ES−) calculated for $C_{20}H_{19}NO_6$: 369.3700 $[M + H]^+$; found: 370.1298.

3.4.2. 4-Allyl-2-methoxyphenyl-2-(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)acrylate (**8**)

71% yield; FTIR: 3450 cm^{-1} (O-H); 1735 cm^{-1} (C=O); 1637 cm^{-1} (C=C); 1602 cm^{-1} (C=C); 1531 and 1350 cm^{-1} (R-NO_2), 1035 cm^{-1} (C-O-C). ^{1}H-NMR δ (ppm): 8.33 (s, 1H, H-Ar); 8.17 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, H-Ar); 7.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-Ar); 7.54 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-Ar); 6.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-Ar); 6.75 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-Ar); 6.66 (s, 1H, H-C-OH); 6.03 (s, 1H, CH_2=C); 5.75–5.95 (m, 2H, CH=CH_2 and CH_2=C); 5.14–5.04 (m, 2H, CH_2=CH); 3.72 (s, 3H, CH_3OPh); 3.36 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH_2Ph and HO-C). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.84 (C_{10}); 151.22 (C_{16}); 149.09 (C_4); 144.23 (C_6); 141.43 (C_9); 140.21 (C_{14}); 138.02 (C_{11}); 137.63 (C_{18}); 133.62 (C_1); 130.09 (C_2); 129.58 (C_8); 123.55 (C_5); 123.06 (C_3); 122.45 (C_{12}); 121.48

(C_{13}); 117.02 (C_{19}); 113.40 (C_{15}); 73.35 (C_7); 56.53 (C_{20}); 40.83 (C_{17}). HRMS (TOF MS ES−) calculated for $C_{20}H_{19}NO_6$: 369.3700 $[M + H]^+$; found: 370.1390.

3.4.3. 4-Allyl-2-methoxyphenyl 2-(hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)acrylate (**9**)

75% yield; FTIR: 3458 cm^{-1} (O-H); 1737 cm^{-1} (C=O); 1637 cm^{-1} (C=C); 1604 cm^{-1} (C=C); 1527 and 1348 cm^{-1} (R-NO_2), 1033 cm^{-1} (C-O-C). ^{1}H-NMR δ (ppm): 7.96–8.06 (m, 1H, H-Ar); 7.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-Ar); 7.67 (dd, *J* = 8.3, 4.6 Hz, 1H, H-Ar); 7.50 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-Ar); 6.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-Ar); 6.79–6.70 (m, 2H, H-Ar); 6.61 (s, 1H, H-C-OH); 6.31 (s, 1H, CH_2=C); 6.05–5.81 (m, 2H, CH=CH_2 and CH_2=C); 5.16–5.01 (m, 2H, CH_2=CH); 3.73 (s, 4H, CH_3OPh and HO-C); 3.36 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH_2Ph). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.12 (C_{10}); 150.52 (C_{16}); 148.32 (C_5); 140.25 (C_9); 139.21 (C_{14}); 137.43 (C_6); 136.92 (C_{18}); 135.99 (C_{11}); 133.50 (C_2); 129.09 (C_3); 128.72 (C_1); 128.06 (C_8); 124.67 (C_4); 122.34 (C_{12}); 120.65 (C_{13}); 116.18 (C_{19}); 112.61 (C_{15}); 67.88 (C_7); 55.72 (C_{20}); 40.04 (C_{17}). HRMS (TOF MS ES−) calculated for $C_{20}H_{19}NO_6$: 369.3700 $[M + H]^+$; found: 370.1298.

3.4.4. 2-Isopropyl-5-methylphenyl 2-(hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)acrylate (**10**)

80% yield; FTIR: 3485 cm^{-1} (O-H); 1732 cm^{-1} (C=O); 1606 cm^{-1} (C=C); 1523 and 1348 cm^{-1} (R-NO_2). ^{1}H-NMR δ (ppm): 8.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-Ar); 7.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-Ar); 7.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-Ar); 6.78 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-Ar); 6.67 (s, 1H, H-C-OH); 6.12 (s, 1H, CH_2=C); 5.75 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, CH_2=C); 3.50 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, HO-C); 2.85 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1H, HC-$(CH_3)_2$); 1.95 (s, 3H, H_3C-Ph); 1.20 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, $(CH_3)_2$-CH). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.24 (C_8); 148.63 (C_4); 148.27 (C_9); 147.48 (C_3); 140.93 (C_{11}); 131.01 (C_{13}); 128.23 (C_6); 128.16 (C_7); 127.56 ($C_{2/2'}$); 126.95 (C_{14}); 124.49 (C_{12}); 123.63 ($C_{1/1'}$); 119.46 (C_{10}); 72.36 (C_5); 33.50 (C_{16}); 23.85 ($C_{17/17'}$); 15.57 (C_{15}). HRMS (TOF MS ES−) calculated for $C_{20}H_{21}NO_5$: 355.1400 $[M - H]^-$; found: 354.1426.

3.4.5. 2-Isopropyl-5-methylphenyl 2-(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)acrylate (**11**)

73% yield; FTIR: 3493 cm^{-1} (O-H); 1730 cm^{-1} (C=O); 1637 cm^{-1} (C=C); 1622 cm^{-1} (C=C); 1531 and 1350 cm^{-1} (R-NO_2).^{1}H-NMR δ (ppm): 8.30 (s, 1H, H-Ar); 8.15 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1H, H-Ar); 7.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-Ar); 7.53 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-Ar); 7.06 (dd, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-Ar); 6.79 (s, 1H, H-Ar); 6.68 (s, 1H, H-C-OH); 6.13 (s, 1H, CH_2=C); 5.74 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH_2=C); 3.36 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, HO-C), 2.76–2.60 (m, 1H, HC-$(CH_3)_2$); 1.95 (s, 3H, H_3C-Ph); 1.20 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, $(CH_3)_2$-CH). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.29 (C_{10}); 148.69 (C_{11}); 148.29 (C_4); 143.56 (C_{13}); 140.81 (C_6); 132.90 (C_1); 131.01 (C_2); 129.44 (C_{15}); 128.36 (C_8); 128.28 (C_9); 126.99 (C_{16}); 124.51 (C_5); 122.89 (C_3); 121.65 (C_{14}); 119.49 (C_{12}); 72.17 (C_7); 33.51 (C_{17}); 23.87 ($C_{18/18'}$); 15.60 (C_{19}). HRMS (TOF MS ES−) calculated for $C_{20}H_{21}NO_5$: 355.1400 $[M - H]^-$; found: 354.1154.

3.4.6. 2-Isopropyl-5-methylphenyl 2-(hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)acrylate (**12**)

58% yield; FTIR: 3450 cm^{-1} (O-H); 1734 cm^{-1} (C=O); 1620 cm^{-1} (C=C); 1527 and 1348 cm^{-1} (R-NO_2). ^{1}H- NMR δ (ppm): 7.87 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-Ar); 7.62 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-Ar); 7.42 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-Ar); 7.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-Ar); 6.81 (s, 1H, H-Ar); 6.58 (s, 1H, H-C-OH); 6.30 (s, 1H, CH_2=C); 5.86 (s, 1H, CH_2=C); 3.82 (s, 1H, HO-C); 2.95–2.74 (m, 1H, HC-$(CH_3)_2$); 1.96 (s, 3H, H_3C-Ph); 1.19 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, $(CH_3)_2$-CH). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.36 (C_{10}); 148.92 (C_{11}); 148.12 (C_5); 140.83 (C_{13}); 136.39 (C_8); 133.61 (C_2); 130.93 (C_{15}); 128.96 (C_3); 128.79 (C_1); 127.70 (C_6); 127.66 (C_9); 127.18 (C_{16}); 124.78 (C_4); 124.32 (C_{14}); 119.61 (C_{12}); 67.54 (C_7); 33.53 (C_{17}); 23.89 ($C_{18/18'}$); 15.55 (C_{19}). HRMS (TOF MS ES−) calculated for $C_{20}H_{21}NO_5$: 355.1400 $[M - H]^-$; found: 354.1335.

3.4.7. 5-Isopropyl-2-methylphenyl 2-(hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)acrylate (**13**)

92% yield; FTIR: 3510 cm^{-1} (O-H); 1728 cm^{-1} (C=O); 1624 cm^{-1} (C=C); 1606 cm^{-1} (C=C); 1521 and 1348 cm^{-1} (R-NO_2). ^{1}H-NMR δ (ppm): 8.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-Ar); 7.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-Ar); 7.06 (dd, *J* = 21.4, 7.8 Hz, 2H, H-Ar); 6.78 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-Ar); 6.67 (s, 1H, H-C-OH); 6.12 (s, 1H,

CH_2=C); 5.75 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, CH_2=C); 3.50 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, HO-C); 2.85 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1H, HC-$(CH_3)_2$); 1.95 (s, 3H, H_3C-Ph); 1.20 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, $(CH_3)_2$-CH). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.24 (C_8); 148.63 (C_4); 148.27 (C_9); 147.48 (C_3); 140.93 (C_{11}); 131.01 (C_{13}); 128.23 (C_6); 128.16 (C_7); 127.56 ($C_{2e2'}$); 126.95 (C_{14}); 124.49 (C_{12}); 123.63 ($C_{1e1'}$); 119.46 (C_{10}); 72.36 (C_5); 33.50 (C_{16}); 23.85 ($C_{17e17'}$); 15.57 (C_{15}). HRMS (TOF MS ES−) calculated for $C_{20}H_{21}NO_5$: 355.1400 $[M - H]^-$; found: 354.1335.

3.4.8. 5-Isopropyl-2-methylphenyl 2-(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)acrylate (**14**)

63% yield; FTIR: 3450 cm^{-1} (O-H); 1735 cm^{-1} (C=O); 1637 cm^{-1} (C=C); 1602 cm^{-1} (C=C); 1531 and 1350 cm^{-1} (R-NO_2). ^{1}H-NMR δ (ppm): 8.30 (s, 1H, H-Ar); 8.14 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-Ar); 7.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-Ar); 7.53 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-Ar); 7.08 (d, *J* =7.8 Hz, 2H, H-Ar); 6.79 (s, 1H, H-Ar); 6.68 (s, 1H, H-C-OH); 6.13 (s, 1H, CH_2=C); 5.74 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH_2=C); 3.36 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, HO-C), 2.97–2.71 (m, 1H, HC-$(CH_3)_2$); 1.95 (s, 3H, H_3C-Ph); 1.20 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, $(CH_3)_2$-CH). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.29 (C_{10}); 148.69 (C_{11}); 148.29 (C_4); 143.56 (C_{13}); 140.81 (C_6); 132.90 (C_1); 131.01 (C_2); 129.44 (C_{15}); 128.36 (C_8); 128.28 (C_9); 126.99 (C_{16}); 124.51 (C_5); 122.89 (C_3); 121.65 (C_{14}); 119.49 (C_{12}); 72.17 (C_7); 33.51 (C_{17}); 23.87 ($C_{18/18'}$); 15.60 (C_{19}). HRMS (TOF MS ES−) calculated for $C_{20}H_{21}NO_5$: 355.1400 $[M - H]^-$; found: 354.1154.

3.4.9. 5-Isopropyl-2-methylphenyl 2-(hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)acrylate (**15**)

72% yield; FTIR: 3489 cm^{-1} (O-H); 1734 cm^{-1} (C=O); 1624 cm^{-1} (C=C); 1527 and 1348 cm^{-1} (R-NO_2). ^{1}H- NMR δ (ppm): 7.86 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-Ar); 7.62 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-Ar); 7.42 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-Ar); 7.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-Ar); 6.81 (s, 1H, H-Ar); 6.58 (s, 1H, H-C-OH); 6.30 (s, 1H, CH_2=C); 5.86 (s, 1H, CH_2=C); 3.82 (s, 1H, HO-C); 2.99–2.67 (m, 1H, HC-$(CH_3)_2$); 1.96 (s, 3H, H_3C-Ph); 1.19 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, $(CH_3)_2$-CH). ^{13}C-NMR δ (ppm): 164.36 (C_{10}); 148.92 (C_{11}); 148.12 (C_5); 140.83 (C_{13}); 136.39 (C_8); 133.61 (C_2); 130.93 (C_{15}); 128.96 (C_3); 128.79 (C_1); 127.70 (C_6); 127.66 (C_9); 127.18 (C_{16}); 124.78 (C_4); 124.32 (C_{14}); 119.61 (C_{12}); 67.54 (C_7); 33.53 (C_{17}); 23.89 ($C_{18/18'}$); 15.55 (C_{19}). HRMS (TOF MS ES) calculated for $C_{20}H_{21}NO_5$: 355.1400 $[M - H]^-$; found: 354.1516.

3.5. Biology

The promastigote viabilities were determined by the ability of living cells to reduce the yellow MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) to purple formazan [23]. Promastigote forms of *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) in the log phase of growth were incubated at 25 °C in 96-well cellular culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) with 1×10^5 cells/well in 100 μL Schneider's Drosophila medium supplemented with 20% of FBS in the presence or absence of different concentrations of compounds **4**–**15**. The growth of promastigotes forms was evaluated simultaneously in the presence of Glucantime®, as reference drug. After 72 h of incubation, 10 mL of a 5 $mg{\cdot}mL^{-1}$ MTT solution was added. After 4 h of incubation at 25 °C, the formed product formazan was dissolved in 50 mL of sodium dodecyl sulfate (SDS) at 10% for 24 h, and the absorbance was measured by spectrophotometry at a 545 nm wavelength. The percentage viability was calculated from the ratio of OD readings in the wells with compounds versus the wells without compounds × 100. The concentration that inhibited 50% of growth (IC_{50}) was determined by regression analysis using the SPSS 8.0 software for Windows (IBM, New York, NY, USA). All experiments were performed at least three times, and each experiment was performed in triplicate [16]. Haemolytic assays (HC_{50} > 400 μM) showed that the **4**, **7**, **8**, **9**, **16**, **17** and **3** exhibit low toxicity towards human red blood cells, unlike amphotericin B (HC_{50} = 11.61 μM Table 1) [24].

3.6. Conformational Analysis

The relaxed potential energy surface scan (RPESS) was performed by taking particular care of the dihedral angles θ_1–θ_{10}, which are illustrated in Figure 3. These calculations were executed by using the semi-empiric PM6 level with angle variations from 0° to 360° in intervals of 10°. Next, the minimum conformation was fully optimized by M062x//6-31+G(d,p) as the level of the calculations without any

symmetry constraint and with all geometries modeled at a minimum of potential energy because no imaginary frequencies were found. The minima of hybrids 7 and 9 were optimized in water implicit simulations using the CPCM methodology by GAUSSIAN09L [25].

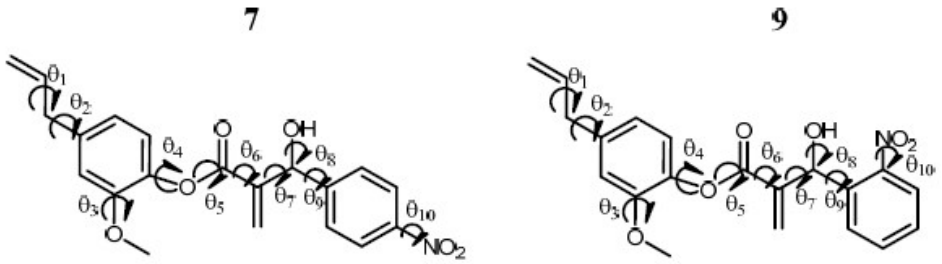


Figure 3. Computational methodology used to minimize the new hybrids 7 and 9. Optimized geometries (Cartesian coordinates) to 7 and 9 are available in the Supplementary information.

4. Conclusions

The nine new molecular hybrids designed in this study were synthesized in good yields in two steps from eugenol, thymol and carvacrol and presented IC_{50} values in the range of 22.30–4.71 μM to promastigotes of *Leishmania amazonensis*. Besides, the most active hybrid 9 does not exhibit significant toxicity in red blood cell studies (SIrb > 84.92) which suggests the possibility of an advancement in CL and MCL treatment. The experimental studies of bioactivity and conformational DFT calculations presented here are in full agreement with our first mechanistic proposal whereby the biological activity of nitro compounds is connected to nitro group reduction that generates $RNO^{-\bullet}$. Separation of the enantiomers of the new compound 9 by kinetic resolution catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* [26] and performing in vivo studies will continue this present work.

Supplementary Materials: Supplementary information related to this article is available at www.mdpi.com/1420-3049/21/11/1483/s1.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge CNPq and CAPES for financial support; Felipe T. Martins (UFG) for the HRMS data; and PRPG-UFPB by financial support of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts and the payment of publication fees of this article.

Author Contributions: Francisco José da Seixas Xavier was responsible for the chemical experiments and analyzed the data; Klinger Antonio da Franca Rodrigues was responsible for antipromastigotes experiments, Ramon Guerra de Oliveira and Claudio Gabriel Lima Junior participate in discussions during the work. Juliana da Câmara Rocha developed the study of cytotoxicity and selectivity index of compounds. Tatjana Keesen de Souza Lima directed the study of cytotoxicity and selectivity index of compounds. Marcia Rosa de Oliveira directed the study of antipromastigotes experiments; Fábio Pedrosa Lins Silva and Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos coordinate the chemical experiments and analyzed the data and had all conception of this work. They also wrote this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Alvar, J; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den-Boer, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35671. [CrossRef]
2. Volpinia, Â.C.; Passos, V.M.A.; Oliveira, G.C.; Romanha, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* **2004**, *90*, 31–37. [CrossRef]
3. Leishmaniasis. Available online: http://www.who.int/leishmaniasis/en/ (accessed on 10 March 2016).
4. Rafik, L.; Rhaiem, B.; Houimel, M. Targeting Leishmania major parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. *Acta Tropica* **2016**, *159*, 11–19.
5. Croft, S.L.; Coombs, G.H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 502–508. [CrossRef]

6. Sangshetti, J.N.; Khan, F.A.K.; Kulkarni, A.A.; Arote, R.; Patil, R.H. Antileishmanial drug discovery: Comprehensive review of the last 10 years. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 32376–32415. [CrossRef]
7. Lima-Junior, C.G.; Vasconcellos, M.L.A.A. Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3954–3971. [CrossRef]
8. Basavaiah, D.; Reddy, B.S.; Badsara, S.S. Recent Contributions from the Baylis−Hillman Reaction to Organic Chemistry. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5447–5674. [CrossRef]
9. Santos, M.S.; Coelho, F.; Lima-Junior, C.G.; Vasconcellos, M.L.A.A. The Morita-Baylis-Hillman Reaction: Advances and Contributions from Brazilian Chemistry. *Curr. Org. Synth.* **2015**, *12*, 830–852. [CrossRef]
10. Barbosa, T.P.; Sousa, S.C.O.; Amorim, F.M.; Rodrigues, Y.K.S.; De Assis, P.A.C.; Caldas, J.P.A.; Oliveira, M.R.; Vasconcellos, M.L.A.A. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4250–4256. [CrossRef]
11. De Souza, R.O.M.A.; Pereira, V.L.P.; Muzitano, M.F.; Rossi-Bergmann, B.; Filho, E.B.A.; Vasconcellos, M.L.A.A. High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl) propanenitrile and analogous compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 99–102. [CrossRef]
12. Barbosa, T.C.; Lima, C.G., Jr.; Silva, F.P.L.; Lopes, H.M.; Figueiredo, L.R.F.; Souza, S.C.O.; Batista, G.N.; Silva, T.G.; Silva, T.M.; Oliveira, M.R.; et al. Improved synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): Evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1726–1730. [CrossRef]
13. Junior, C.G.L.; de Assis, P.A.C.; Silva, F.P.L.; Sousa, S.C.O.; de Andrade, N.G.; Barbosa, T.P.; Nerís, P.L.N.; Segundo, L.V.G.; Anjos, I.C.; Carvalho, G.A.U.; et al. Efficient synthesis of 16 aromatic Morita–Baylis–Hillman adducts: Biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. *Bioorg. Chem.* **2010**, *38*, 279–284. [CrossRef]
14. Silva, F.P.L.; de Assis, P.A.C.; Lima-Junior, C.G.; de Andrade, N.G.; da Cunha, S.M.D.; Oliveira, M.R.; Vasconcellos, M.L.A.A. Synthesis, evaluation against *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity assays in macrophages of sixteen new congeners Morita-Baylis-Hillman adducts. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4295–4301. [CrossRef]
15. Da Silva, W.A.V.; Rodrigues, D.C.; Oliveira, R.G.; Mendes, R.K.S.; Olegário, T.R.; Rocha, J.C.; Keesen, T.S.L.; Lima, C.G., Jr.; Vasconcellos, M.L.A.A. Synthesis and activity of novel homodimers of Morita-Baylis-Hillman adducts against *Leishmania donovani*: A twin drug approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4523–4526. [CrossRef]
16. Islamuddin, M.; Sahal, D.; Afrin, F. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 74–85. [CrossRef]
17. Morais, S.M.; Vila-Nova, N.S.; Bevilaqua, C.M.L.; Rondon, F.C.; Lobo, C.H.; Moura, A.A.A.; Sales, N.A.D.; Rodrigues, A.P.R.; Figuereido, J.R.; Campello, C.C.; et al. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agentes. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6250–6255. [CrossRef]
18. Farias, P.A., Jr.; Rios, M.C.; Moura, T.A.; Almeida, R.P.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Fernandes, R.P.; Scher, M.R. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Biol. Res.* **2012**, *45*, 399–402. [CrossRef]
19. Patterson, S.; Wyllie, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.* **2014**, *30*, 289–298. [CrossRef]
20. Paiva, Y.G.; Souza, A.A.; Lima, C.G., Jr.; Silva, F.P.L.; Filho, E.B.A.; Vasconcelos, C.C.; Abreu, F.C.; Goulart, M.O.F.; Vasconcellos, M.L.A.A. Correlation between electrochemical and theoretical studies on the leishmanicidal activity of twelve Morita-Baylis-Hillman adducts. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 894–904. [CrossRef]
21. Paiva, Y.G.; Júnior, W.P.A.; de Souza, A.; Costa, C.O.; Silva, F.P.L.; Lima, C.G., Jr.; Vasconcellos, M.L.A.A.; Goulart, M.O.F. Electrochemical and computational studies, in protic medium, of Morita-Baylis-Hillman adducts and correlation with leishmanicidal activity. *Electrochim. Acta* **2014**, *140*, 557–563. [CrossRef]
22. Filho, E.B.A.; Ventura, E.; do Monte, S.A.; Oliveira, B.G.; Junior, C.G.L.; Rocha, G.B.; Vasconcellos, M.L.A.A. Synthesis and conformational study of a new class of highly bioactive compounds. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *449*, 336–340. [CrossRef]
23. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [CrossRef]

24. Rodrigues, K.A.F.; Dias, C.N.S.; Néris, P.L.N.; Rocha, J.C.; Scotti, M.T.; Scotti, L.; Mascarenhas, S.R.; Veras, R.C.; de Medeiros, I.A.; Keesen, T.S.L.; et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *106*, 1–14. [CrossRef]
25. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; et al. *Gaussian 09*, Revision E.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
26. Xavier, F.J.S.; Neto, J.S.S.; Néris, P.L.N.; Oliveira, M.R.; Vale, J.A.; Vasconcellos, M.L.A.A. Kinetic resolution of leishmanicidal meta and para (±)-2-[Hydroxy(nitrophenyl) methyl]acrylonitrile catalyzed by CALB: In vitro evaluations of separated meta (*R*), (*S*) and (*R*/*S*) adducts. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **2014**, *108*, 7–12. [CrossRef]

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

APÊNDICE C

molecules

MDPI

Article

Synthesis and In Vitro Anti *Leishmania amazonensis* Biological Screening of Morita-Baylis-Hillman Adducts Prepared from Eugenol, Thymol and Carvacrol

Francisco José Seixas Xavier [1], Klinger Antonio da Franca Rodrigues [2], Ramon Guerra de Oliveira [1], Claudio Gabriel Lima Junior [1], Juliana da Câmara Rocha [3], Tatjana Souza Lima Keesen [3], Marcia Rosa de Oliveira [2], Fábio Pedrosa Lins Silva [1,*] and Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos [1,*]

1 Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, Paraíba CEP 58059-900, Brazil; seicxhas@hotmail.com (F.J.S.X.); ramonoliveirajp@gmail.com (R.G.d.O.); claudio@quimica.ufpb.br (C.G.L.J.)

2 Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular and Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas and da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba CEP 58059-900, Brazil; klinger.antonio@gmail.com (K.A.d.F.R.); mrosajp@gmail.com (M.R.d.O.)

3 Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, Paraíba CEP 58059-900, Brazil; ju_jurocha@hotmail.com (J.d.C.R.); tat.keesen@cbiotec.ufpb.br (T.S.L.K.)

* Correspondence: pedrosalinssilva@gmail.com (F.P.L.S.); mlaav@quimica.ufpb.br (M.L.A.d.A.V.); Tel.: +55-083-3216-7589 (F.P.L.S. & M.L.A.d.A.V.)

Academic Editor: Diego Muñoz-Torrero
Received: 11 October 2016; Accepted: 1 November 2016; Published: 8 November 2016

Abstract: Leishmaniasis represents a series of severe neglected tropical diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is widely distributed around the world. Here, we present the syntheses of Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHAs) prepared from eugenol, thymol and carvacrol, and their bioevaluation against promastigotes of *Leishmania amazonensis*. The new MBHAs are prepared in two steps from essential oils in moderate to good yields and present IC_{50} values in the range of 22.30–4.71 μM. Moreover, the selectivity index to the most potent compound is very high (SIrb > 84.92), far better than that of Glucantime® (SIrb 1.39) and amphotericin B (SIrb = 22.34). Conformational analysis were carried out at the M062X//6-31+G(d,p) level of theory to corroborate a hypothesis about the nitroaromatic bioreduction mechanism.

Keywords: Morita-Baylis-Hillman adducts; *Leishmania amazonensis*; eugenol; thymol; carvacrol

1. Introduction

Leishmaniasis is considered a set of neglected tropical diseases (NTD) caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is widely distributed around the world [1]. These diseases are classified into three clinical forms: visceral leishmaniasis (VL), cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). The most abundant species in the Americas, which causes general disfigurement of the face (MCL) and leads to patients withdrawing from social life, are *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* [2]. Approximately 500,000 new cases of VL are registered each year and are responsible for the deaths of thousands of people. Six countries, one of which is Brazil, account for 90% of deaths related to the disease. The World Health Organization (WHO) estimates that approximately one billion people live in areas at risk, and the 0.9–1.3 million new cases are responsible for the deaths of approximately 30,000 people annually [3]. *Leishmania* spp. is distributed by sandflies, which inject infective promastigotes into the skin of mammalian hosts during a blood meal. To date, there is no leishmaniasis vaccine for humans [4]. Few drug treatment options are available, which are

1. Introduction

Neglected tropical diseases (NTDs) are those that occur primarily in poor countries. Drugs to treat these diseases are few, and usually lead to severe side effects, since the buying power of these populations is very low, not being attractive to global pharmaceutical industries to invest money on the development of drugs for these diseases [1]. Leishmaniases are a group of NTDs caused by protozoan parasites from >20 *Leishmania* species [2]. Visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, is the most severe form of leishmaniasis, usually fatal in the absence of treatment in over 95% of cases [3]. *Leishmania donovani* is one of the major species of the genus *Leishmania* that causes VL, affecting more than 100 million people worldwide, with 500,000 new cases and more than 50,000 deaths each year [4]. Due to inexistence of vaccines for humans and that the available chemotherapy is toxic and expensive, research aiming to obtain new efficient drugs is of great urgency.

The Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHAs) are being explored as drug candidates against several diseases, one of them being leishmaniasis [5]. These compounds are prepared from the Morita-Baylis-Hillman reaction [6,7] in green conditions from aldehydes (among other electrophiles) or alkenes connected to electron attractor groups (EAG, like methyl acrylate, acrylonitrile, and others) under basic catalysis (DABCO being the most common base, Scheme 1).



Scheme 1. General Morita-Baylis-Hillman reaction. EAG = electron attractor group. Ar = aryl or heteroaryl, R = alkyl or H.

Molecular hybridization is a useful tool in the design of new drug prototypes [8]. It was reported by us that the hybridization between an analgesic/anti-inflammatory methyl salicylate (**2**) and the MBHA (**3**) resulting in the development of a chalcone-like compound (**1**) that is more active as a leishmanicide than corresponding precursors [9]. In 2016 we also described the synthesis of a new hybrid (**5**) from an analgesic and anti-inflammatory eugenol (**4**) that presents a stronger leishmanicidal activity than compound **1** [10] (Figure 1).

In a different line of research from our group, synthesis and in vivo experiments were described that demonstrate that tetrahydropyran derivative **6** is very efficient and is a non-toxic analgesic/anti-inflammatory [11,12]. It was published the synthesis of (±)-*cis,cis*-**6** [13,14] and recently the anti-hyperalgesic effect of is associated with NO/cGMP/KATP pathway participation and the κ-opioid receptor [15]. Additionally, it was recently discovered that the tetrahydropyran derivative (±)-*cis*-**7** [16,17] presents an analgesic effect in the same order of magnitude (μmol·kg^{-1}) than the analogous **6** (Figure 1) [16].

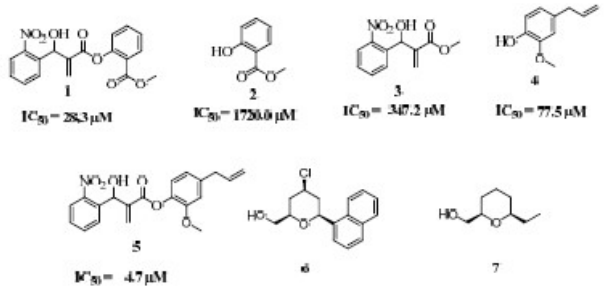


Figure 1. The leishmanicidal activity of hybrids **1** and **5** and their precursors. The analgesic/anti-inflammatory **6** and **7**.

In connection with our interest in the discovery of new Morita-Baylis-Hillman adducts with promising leishmanicidal and other bioactivities [5,18–21], we present here the design, synthesis, and in vitro screening against *Leishmania donovani* of sixteen new molecular hybrids (**8a–h** and **9a–h**, Figure 2). It is important to note here that our design is based on the fact that inhibitors of opioid receptors participate in the mechanism of action against leishmaniasis interfering with the immune system, not only participating in the function of the immune cells, but also modulating innate and acquired immune responses [22].

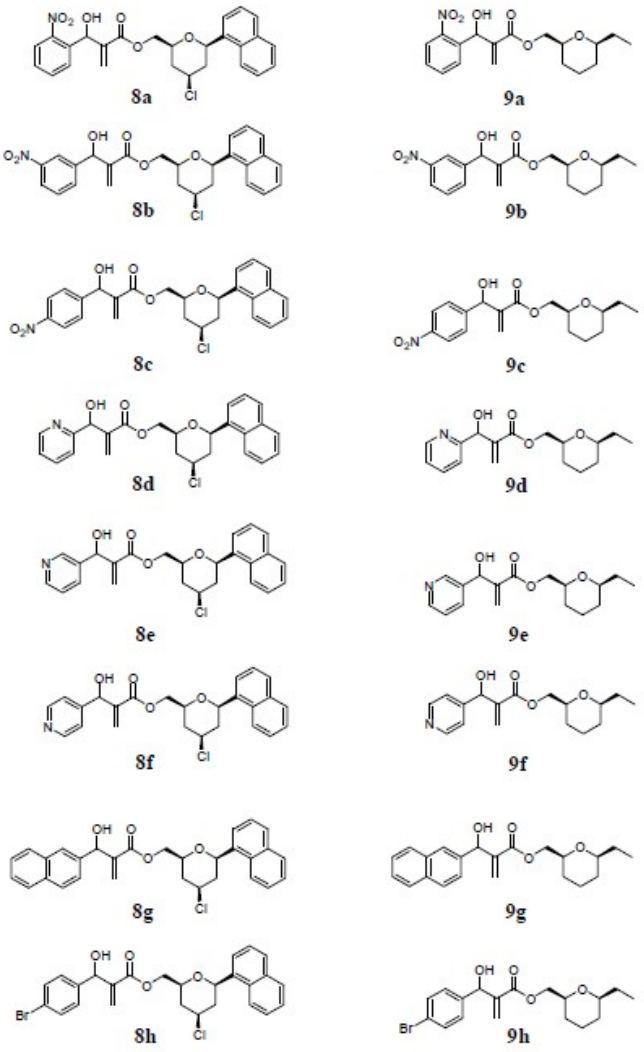


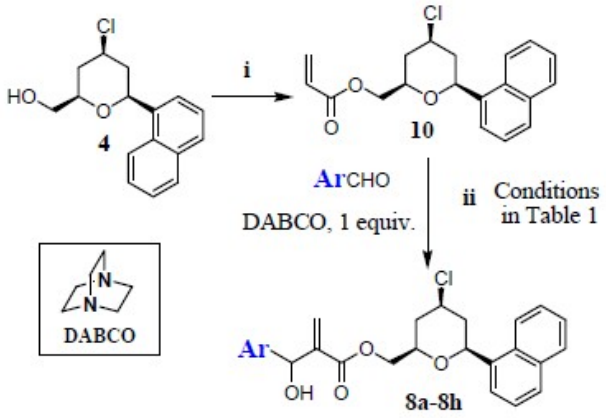
Figure 2. The synthetized hybrids **8a–8h** and **9a–9h**.

2. Results and Discussion

2.1. Chemistry

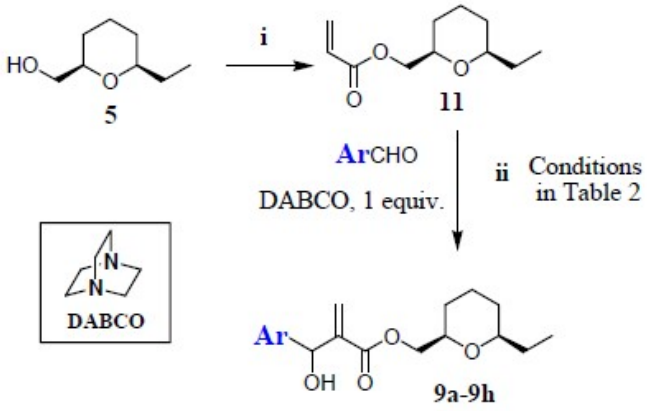
Compounds **6** and **7** were prepared in the same way as described in the literature [11,13]. Synthesis of new hybrids **8a–8h** (spectra, see in Supplementary Materials) were made via the Morita-Baylis-Hillman reaction (MBHR) between acrylate **10** and aromatic aldehydes ArCHO (Scheme 2) under DABCO as a promoter (conditions and yields are described in Table 1). Acrylate **10** was synthetized from **6** using acrylic acid under TsOH as a catalyst (70%, Scheme 2). In the same way, the new acrylate **11** was prepared from **7** (Scheme 3) with 75% yield. The conditions and yields of the

MBH reaction between **11** and ArCHO, to prepare the hybrids **9a–9h** (spectra, see in Supplementary Materials) are presented in Table 2.



Ar =
o-nitrophenyl = **a**
m-nitrophenyl = **b**
p-nitrophenyl = **c**
2-pyridinyl = **d**
3-pyridinyl = **e**
4-pyridinyl = **f**
α-naphthyl = **g**
p-bromophenyl= **h**

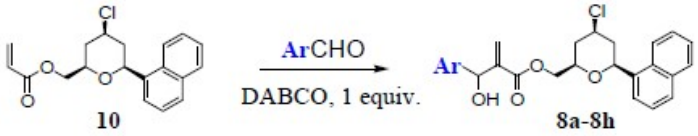
Scheme 2. (i) Acrylic acid (2 equiv.), TsOH (20 mol%), anhydrous CH_2Cl_2, 50 °C, two days, 70% yield. (ii) MBHR between **10** and ArCHO (conditions and yields in Table 1).



Ar =
o-nitrophenyl = **a**
m-nitrophenyl = **b**
p-nitrophenyl = **c**
2-pyridinyl = **d**
3-pyridinyl = **e**
4-pyridinyl = **f**
α-naphthyl = **g**
p-bromophenyl= **h**

Scheme 3. (i) Acrylic acid (2 equiv.), TsOH (20 mol%), anhydrous CH_2Cl_2, 50 °C, two days, 75% yield. (ii) MBHR between **11** and ArCHO (conditions and yields in Table 2).

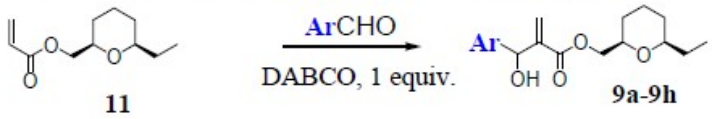
Table 1. Conditions and yields in the synthesis of new hybrids **8a–8h**.



Entry	Ar	Hybrid	Solvent [a]	Temp. (°C) [b]	Time (h)	Yield (%) [c]
1	*o*-nitrophenyl	**8a**	t-buOH/H_2O	80 Mw	1	85
2	*m*-nitrophenyl	**8b**	t-buOH/H_2O	80 Mw	0.7	34[d]
3	*m*-nitrophenyl	**8b**	DMF:H_2O	0	48	81
4	*p*-nitrophenyl	**8c**	t-buOH/H_2O	80 Mw	0.7	86
5	2-pyridinyl	**8d**	t-buOH/H_2O	80 Mw	1.3	81
6	3-pyridinyl	**8e**	t-buOH/H_2O	80 Mw	2	80
7	4-pyridinyl	**8f**	t-buOH/H_2O	80 Mw	1	87
8	α-naphthyl	**8g**	t-buOH/H_2O	80 Mw	2	n.r.
9	α-naphthyl	**8g**	DMF:H_2O	0	48	45
10	*p*-bromophenyl	**8h**	t-buOH/H_2O	80 Mw	2	n.r.
11	*p*-bromophenyl	**8h**	DMF:H_2O	0	240	60

[a] Mixture of 9:1; [b] Mw = microwave irradiation; [c] isolated yields; [d] co-products were observed; n.r.= no reaction.

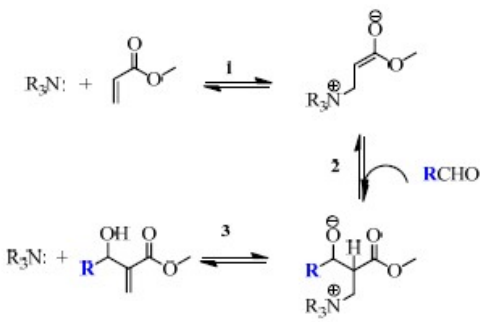
Table 2. Conditions and yields in the synthesis of new hybrids **9a–9h**.



Entry	Ar	Hybrid	Solvent [a]	Temp. (°C) [b]	Time (h)	Yield (%) [c,d]
1	*o*-nitrophenyl	**9a**	t-buOH/H_2O	80 Mw	0.7	74
2	*m*-nitrophenyl	**9b**	t-buOH/H_2O	80 Mw	0.7	78
3	*p*-nitrophenyl	**9c**	t-buOH/H_2O	80 Mw	0.3	95
4	2-pyridinyl	**9d**	t-buOH/H_2O	80 Mw	0.8	96
5	3-pyridinyl	**9e**	t-buOH/H_2O	80 Mw	1.3	80
6	4-pyridinyl	**9f**	t-buOH/H_2O	80 Mw	0.7	72
7	4-pyridinyl	**9f**	t-buOH/H_2O, PhOH	80 Mw	0.3	96
8	α-naphthyl	**9g**	t-buOH/H_2O	80 Mw	2	n.r.
9	α-naphthyl	**9g**	DMF/H_2O, PhOH	0	96	65
10	*p*-bromophenyl	**9h**	t-buOH/H_2O	80 Mw	2	n.r.
11	*p*-bromophenyl	**9h**	DMF/H_2O, PhOH	0	240	50

[a] Mixture of 9:1; [b] Mw = microwave irradiation; [c] isolated yields; [d] co-products were not observed.

The general proposal mechanism of MBHR is presented in Scheme 4.



Scheme 4. The general proposal mechanism of MBHR.

However, the slow step of the mechanism and the transition state structure has been the main source of controversy [7]. To date, the slow step has been proposed to change between the aldol step (step 2) and the elimination step (step 3). In fact, depending on various parameters, such as the Michael acceptor used as the reagent, solvents, addition or not of phenolic additives, temperature (may be reversible or not), many different catalysts, etc. [7], MBHR is an exquisite reaction and each reaction must have its experimental parameters carefully optimized as an individual problem. However, some facts are incontestable: the MBHR between methyl acrylate reacting with *p*-bromobenzaldehyde is reversible at elevated temperatures [21]; several MBHR are faster at 0 °C than at room temperature [23,24]; and the type of solvent (aprotic or protic) [25,26] and the phenol or naphthol additives modifies the reactions rate. We can see in Table 1 (Entries 1, 2, 4–8, 10) and Table 2 (Entries 1–6, 8 and 10) that it used t-buOH/H_2O at 80 °C under microwave irradiation as the first experimental attempt [21]. When this condition was not efficient, low temperatures were used (0 °C) in DMF/water as the solvent mixture and used phenol as the additive, increasing yields (Entries 7, 9 and 11, Table 2). Addition of phenol as an additive with t-buOH/H_2O at 80 °C under microwave irradiation also improves the rate and yields (compare entries 6 and 7, Table 2). These delicate results can be interpreted based on the experimental studies on the MBHR described recently by Plata and Singleton [27]. Enthalpy and entropy of activations, contributions in $\Delta G^{\neq}$ were measured on the methyl acrylate and *p*-nitrobenzaldehyde reaction in methanol as a solvent and DABCO as a promoter, proving the pivotal importance of entropic parameters in the slow step of this reaction.

2.2. Biology

The hybrids **8a–8h** and **9a–9h** were evaluated in vitro on the promastigote stage of *Leishmania donovani* by determining their inhibitory concentrations 50% (IC_{50}), 50% hemolysis concentration (HC_{50}), selectivity index (HC_{50}/IC_{50},), and comparing to Amphotericin B, chosen as the anti-leishmanial reference drug (Table 3 and Figure 3).

Table 3. In vitro biological results.

Compounds	IC_{50} [a] ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	IC_{50} [a] (μM)	HC_{50} [b] ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	HC_{50} [b] (μM)	SI_{rb} [c]
6	47.53 ± 39	172.19 ± 141.25	-	-	-
7	>400	>2775.46	-	-	-
8a	7.09 ± 3.0	14.74 ± 6.23	>400	>831.38	>56.40
8b	8.76 ± 4.0	18.21 ±8.31	-	-	-
8c	9.05 ± 3.3	18.81 ± 6.85	-	-	-
8d	61.93 ± 18	141.67 ± 41.17	-	-	-
8e	8.76 ± 3.8	20.04 ± 8.69	-	-	-
8f	8.96 ± 4.5	20.50 ± 10.29	-	-	-
8g	24.51± 7.5	50.42 ± 15.42	-	-	-
8h	17.17 ± 5.6	33.40 ± 10.90	-	-	-
9a	5.64 ± 3.0	16.15 ± 8.60	>400	>1145.64	>70.94
9b	13.75 ± 9.8	39.38 ± 28.06	-	-	-
9c	7.03 ± 4.3	20.13 ± 12.31	>400	>1145.64	>56.91
9d	72.32 ± 26.0	240.27 ± 85.20	-	-	-
9e	17.68 ± 7.7	57.94 ± 25.23	-	-	-
9f	57.76 ± 20.0	189.28 ± 65.53	-	-	-
9g	9.73 ± 4.8	27.47 ± 13.55	-	-	-
9h	2.22 ± 7.6	5.81 ± 19.90	>400	>1046.90	>180.19
Amphotericin B	0.35 ± 0.27	0.38 ± 0.30	11.61	12.56	33.05

[a] The half maximal inhibitory concentration; [b] 50% hemolysis in red blood cells; [c] SI_{rb} (selectivity index on red blood cell) = HC_{50}/IC_{50}.

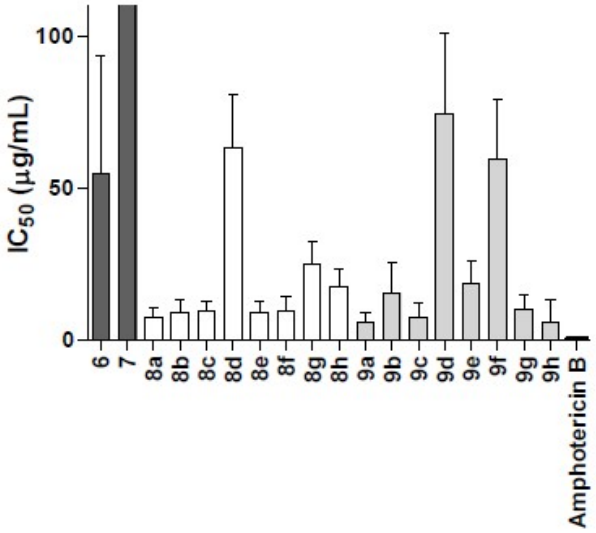


Figure 3. In vitro biological results.

The experimental results are shown in Table 3 and deserve comment here. Precursors **6** and **7** had their leishmanicidal activity evaluated (data not shown). Precursor **6** was shown to be effective against *L. donovani* (IC_{50} = 172.19 μM), whereas the precursor tetrahydropyrans (THP)with the ethyl portion (**7**) has no leishmanicida activity (IC_{50} > 2775.46 μM). Knowing this, the proposal of the work was the molecular hybridization of these precursors with MBHAs presenting anti-*leishmania* activities already reported, aiming to increase the leishmanicidal activity. Initially hybrids **8a–8h**, demonstrated a higher antiparasitic activity against *L. donovani* compared to precursor **6**; leishmanicidal activity with IC_{50} values ranging from 14.74 μM to 141.67 μM. As can be seen in Table 3, among hybrids **8a–8h**, compounds **8a**, **8b**, **8c**, **8e**, and **8f** showed similar anti-*leishmania* activity against the promastigote forms of *L. donovani*, but **8a** presented a lesser cytotoxic effect (HC_{50} >831,38 μM) and the highest selectivity index (S.I. $_{rb}$ > 56.40), showing the most promise of the **8a–8h** hybrids.

The improvement in leishmanicidal activity was also observed for the hybrids originating from precursor **7** that did not show antiparasitic activity (IC_{50} > 2775.46 μM), but with the hybrids **9a–9h** presented higher antiparasitic activities against *L. donovani*. The variation of leishmanicidal activities of hybrids **9a–9h** IC_{50} values ranged from 5.81 μM to 240.27 μM. Hybrids **9a**, **9c**, and **9h** were the ones that presented greater tendencies of antiparasitic activities, presenting IC_{50} values of 16.15 μM, 20.13 μM, and 5.81 μM, respectively. Additionally, values of HC_{50} were >1000 μM. It should be noted that the high selectivity index of **9h** (SI_{rb} > 180.19) compared with the reference drug that presents high toxicity (SI_{rb} = 33.05). The hybrid **9h** presents the bromine atom in its chemical structure. In previous works described by our research group we highlight the association between leishmanicidal activity and the presence of bromine atoms as substituents in the aromatic moiety [9,18–20,28]. Among the works we highlight two examples. In 2007 we reported a significant increase in leishmanicidal activity in promastigote forms of *L. amazonensis* when the benzene moiety (49.3 μM) was changed to *p*-bromobenzyl (12.5 μM) in MBHAs. Furthermore, in these two compounds there was no toxicity measured by the release of lactate dehydrogenase into macrophages (% LDH = 0%) [18]. In 2016 we reported that the homodimer of MBHAs with a bromine atom as a substituent in the aromatic moiety showed very high anti-*leishmania* activity on *L. donovani* (0.50 μM) almost 400 times more active than the corresponding monomer and 1.24 times more potent than Amphotericin B (0.62 μM). Moreover, the selectivity index of the homodimer was very high (SI_{rb} > 400), far better than Amphotericin B (SI_{rb} = 18.73) [28]. These results demonstrate that the hybridization reactions were pivotal for the increase of leishmanicidal action and maintaining the absence of toxicity in macrophages and red blood cells of the hybrids, indicating that **9h** is a promising compound for further biological studies.

3. Materials and Methods

3.1. Chemistry

3.1.1. General

All commercially available reagents and solvent were obtained from the commercial providers from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) and used without further purification, except the opioids tetrahydropyrans **6** and **7**, which have previously been synthesized. Reactions were monitored by TLC (thin layer chromatography) using silica gel 60 UV254 Macherey-Nagel pre-coated silica gel plates (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA); detection was by means of a UV lamp. Flash column chromatography was performed on 300–400 mesh silica gel. Organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$ or Na_2SO_4 prior to evaporation on a rotary evaporator. ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded using Varian Mercury Spectra AC 20 spectrometer (500 MHz for ^1H, 125 MHz for ^{13}C). Chemical shifts were reported relative to internal tetramethylsilane (δ 0.00 ppm) for ^1H, and $CDCl_3$ (δ 77.0 ppm) for ^{13}C (Varian, Palo Alto, CA, USA). HRMS was obtained using Q-TOF quadrupole/orthogonal spectrometry (Waters, Milford, MA) in negative or positive mode. Analyses of low-resolution mass spectrometry were obtained via a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer, model GCMS–QP2010 from Shimadzu. Infrared spectra (FTIR) data were recorded in a spectrophotometer, model IR Prestige–21 from Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan), using potassium bromide (KBr) pellets. Reactions requiring microwave irradiation were performed in a CEM®microwave reactor, Discover model, with a BenchMate system temperature monitor with an infrared sensor (Gilroy, CA, USA).

3.1.2. Procedure for the Synthesis of Acrylate **10** and **11**

Tetrahydropyrans **6** or **7** (10 mmol), acrylic acid (20 mmol), p-toluensulfonic acid (20 mol%), and 80 mL anhydrous CH_2Cl_2 were mixed in a 125 mL flask under a reflux system at 50 °C for two days. The reaction mixture was neutralized with sodium bicarbonate aqueous solution, washed with salt water until pH = 7, and dried by anhydrous sodium sulfate. The mixture was purified by column chromatography, performed using silica gel (230–400 mesh). Acrylates **10** and **11** were obtained with yields of 70% and 75%, respectively.

3.1.3. General Procedure for the Synthesis of MBHA (**8a–8h**) and (**9a–9h**)

Reactions were carried out using the acrylates **10** or **11** (0.5 mmol), corresponding aromatic aldehydes (1.0 mmol), and 3 mL of appropriate solvent in the presence of DABCO, with catalytic promotion and under microwave irradiation (MW), or subjected to a temperature of 0 °C when a reaction improvement was necessary. After that, the solvent was removed and the reaction media was directly filtered through silica gel, using hexane/ethyl acetate (7:3) as eluent. The reaction products were concentrated under reduced pressure (yields are shown in Tables 1 and 2).

Acrylic acid 4-chloro-6-naphthalen-1-yl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester (**10**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 541, 777, 794, 954, 1062, 1188, 1298, 1406, 1633, 1718, 2944. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 1.835 (dd, 1H, *J* = 15 Hz); 2.08 (dd, 1H, *J* = 15 Hz); 2.33 (dt, 1H, *J* = 10 Hz, *J* = 5 Hz); 2.60 (dt, 1H, *J* = 10 Hz, *J* = 5 Hz); 3.99 (m, 1H); 4.31 (m, 1H); 5.1 (d, 1H, *J* = 10 Hz); 5.85 (dd, 1H, *J* = 10 Hz, *J* = 2.5 Hz); 6.16 (dd, 1H, *J* = 15 Hz, *J* = 10 Hz); 6.45 (dd, 1H, *J* = 15 Hz, *J* = 2.5 Hz); 7.48 (m, 3H); 7.62 (d, 1H, *J* = 5 Hz); 7.80 (d, 1H, *J* = 5 Hz); 7.86 (d, 1H, 10 Hz); 7.97 (d, 1H, *J* = 10 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$): δ 38.57; 42.70; 55.16; 66.38; 75.11; 75.82; 123.02; 123.31; 125.46; 125.55; 126.34; 128.06; 128.53; 129.93; 130.31; 131.32; 133.78; 136.04; 165.94. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{19}H_{20}ClO_3$: 331.1095 $[M + H]^+$; found: 331.1097.

Acrylic acid 6-ethyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester (**11**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 455, 645, 800, 894, 955, 1230, 1411, 1540, 1643, 1704, 2849, 2926. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 0.94 (t, 3H, *J* = 10 Hz); δ 1.51 (m, 2H); δ 1.61 (m, 2H); δ 2.16 (m, 2H); δ 3.25 (m, 1H); δ 3.62 (m, 1H); δ 4.16 (dd, 1H, *J* = 15 Hz, 5 Hz); δ 4.21

(dd, 1H, *J* = 10 Hz, 5 Hz); δ 5.85 (dd, 1H, *J* = 10 Hz, 2.5 Hz); δ 6.16 (dd, 1H, *J* = 15 Hz, 10 Hz); δ 6.44 (dd, 1H, *J* = 15 Hz, 2.5 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 9.78; 28.63; 38.76; 41.76; 55.34; 66.43; 74.29; 78.24; 128.13; 131.19; 165.95. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{11}H_{19}O_3$: 199.1329 $[M + H]^+$; found: 199.1330.

2-[Hydroxy-(2-nitro-phenyl)-methyl]-acrylic acid 4-chloro-6-naphthalen-1-yl-tetrahydro- pyran-2- ylmethyl ester (**8a**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 781, 1051, 1136, 1159, 1265, 1301, 1348, 1446, 1525, 1720, 2927, 2960, 3448. RMN ^{1}H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 1.14 (dd, 1H, *J* = 25 Hz, 10 Hz); δ 1.60 (m. 1H); 1.91 (ddd, 1H, *J* = 30 Hz, 25 Hz, 10 Hz); δ 2.08 (m, 1H); δ 2.49 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 2.83 (d, 1H); δ 3.8 (m, 1H); δ 4.18 (m, 3H); δ 4.97 (dd, 1H, *J* = 15 Hz, 10 Hz); δ 5.76 (d, 1H, *J* = 15 Hz); δ 6.08 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 6.39 (d, 1H, *J* = 15 Hz); δ 7.18 (dt, 1H, *J* = 5 Hz); δ 7.41 (m, 5H); δ 7.55 (dd, 1H, *J* = 20 Hz, 10 Hz); δ 7.72 (m, 2H); δ 7.80 (m, 1H); δ 7.87 (t, 1H, *J* = 10 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 38.29; 38.47; 55.00; 66.79; 67.49; 74.80; 75.30; 122.84; 122.96; 123.33; 124.53; 124.62; 125.60; 126.23; 127.24; 128.43; 128.56; 128.79; 129.00; 133.47; 136.09; 137.17; 140.37; 140.45; 148.40; 165.50. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{26}H_{24}ClNO_6Na$: 504.1184 $[M + Na]^+$; found: 504.1188.

2-[Hydroxy-(3-nitro-phenyl)-methyl]-acrylic acid 4-chloro-6-naphthalen-1-yl-tetrahydro- pyran-2- yl-methyl ester (8b): FTIR (KBr) cm^{-1}: 781, 802, 1053, 1087, 1159, 1348, 1527, 1714, 2854, 2924, 3427, RMN ^{1}H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 1.64 (q, 1H, *J* = 10 Hz); δ 1.95 (ddd, 1H, *J* = 25 Hz, 15 Hz, 5 Hz); δ 2.14 (m, 1H); δ 2.50 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 3.85 (m, 1H); δ 4.20 (m, 3H); δ 5.00 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 5.52 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 5.85 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 6.39 (s, 1H); δ 7.29 (dt, 1H, *J* = 10 Hz, 7.5 Hz); δ 7.41 (m, 3H); δ 7.50 (dd, 1H, *J* = 10 Hz, 5 Hz); δ 7.57 (dd, 1H, *J* = 20 Hz, 10 Hz); δ 7.73 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 7.80 (dd, 1H, *J* = 5 Hz, 2.5 Hz); δ 7.88 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 7.96 (m, 1H); δ 8.15 (d, 1H, *J* = 15 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 38.34; 42.71; 54.88; 66.84; 72.51; 74.86; 75.83; 121.49; 122.79; 123.26; 125.50; 125.66; 126.26; 127.88; 128.66; 129.06; 129.34; 130.26; 132.65; 133.81; 135.90; 140.89; 143.59; 148.31; 165.48. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{26}H_{24}ClNO_6Na$: 504.1184 $[M + Na]^+$; found: 504.1188.

2-[Hydroxy-(4-nitro-phenyl)-methyl]-acrylic acid 4-chloro-6-naphthalen-1-yl-tetrahydro-pyran-2- ylmethyl ester (**8c**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 781, 854, 1053, 1159, 1263, 1346, 1521, 1604, 1720, 2926, 2960, 3450. RMN ^{1}H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 1.16 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 1.64. (q, 1H, *J* = 10 Hz); δ 1.96 (m, 1H); δ 2.14 (d, 1H, *J* = 15 Hz); δ 2.51 (d, 1H, *J* = 0 Hz); δ 3.84 (m, 1H); δ 4.20 (m, 3H); δ 5.00 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 5.52 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 5.83 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 6.38 (s, 1H); δ 7.42 (m, 5H); δ 7.51 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 7.75 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 7.80 (m, 1H); δ 7.89 (m, 1H); δ 7.99 (dd, 2H, *J* = 10 Hz, 5 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 18.95; 38.30; 42.63; 54.87; 66.79; 72.51; 74.88; 75.84; 122.87; 123.27; 123.60; 125.49; 125.68; 126.28; 127.32; 127.79; 127.88; 128.73; 129.10; 130.28; 133.83; 133.85; 140.94; 147.44; 148.57; 165.46. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{26}H_{24}ClNO_6Na$: 504.1184 $[M + Na]^+$; found: 504.1186.

2-(Hydroxy-pyridin-2-yl-methyl)-acrylic acid 4-chloro-6-naphthalen-1-yl-tetrahydro-pyran-2-yl methyl ester (8d): FTIR (KBr) cm^{-1}: 781, 800, 958, 1064, 1159, 1247, 1375, 1438, 1593, 1720, 2926, 2958, 3057, 3394. RMN ^{1}H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 1.18 (s, 1H); δ 1.66 (dd, 2H, *J* = 30 Hz, 10 Hz); δ 1.14 (d, 1H, *J* = 15 Hz); δ 2.50 (dt, 1H, *J* = 20 Hz, 5 Hz); δ 4.20 (m, 4H); δ 5.61 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 6.00 (d, 1H, *J* 10 Hz); δ 6.40 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 6.97 (t, 1H, *J* = 10 Hz); δ 7.41 (m, 6H); δ 7.74 (d, 2H, *J* = 10 Hz); δ 7.79 (m, 1H); δ 7.90 (m, 1H). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 29.71; 38.41; 42.81; 55.04; 66.65; 71.37; 71.57; 74.94; 75.77; 121.86; 122.98; 123.40; 125.49; 125.67; 126.33; 128.53; 128.96; 130.25; 133.79; 136.17; 128.23; 141.01; 146.68; 158.86; 165.49. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{25}H_{24}ClNO_4Na$: 438.1467 $[M + Na]^+$; found: 438.1469.

2-(Hydroxy-pyridin-3-yl-methyl)-acrylic acid 4-chloro-6-naphthalen-1-yl-tetrahydro-pyran-2-yl methyl ester (**8e**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 713, 781, 800, 848, 1058, 1157, 1261, 1375, 1425, 1597, 1624, 1720, 2856, 2960, 3055, 3294. RMN ^{1}H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 1.26 (m, 1H); δ 1.71 (qua, 1H, *J* = 20 Hz); δ 2.04 (m, 1H); δ 2.19 (m, 1H); δ 2.58 (dt, 1H, *J* = 25 Hz, 5 Hz); δ 3.90 (t, 1H, *J* = 15 Hz); δ 4.24 (m, 3H); δ 5.06 (dd, 1H, *J* = 20 Hz); δ 5.57 (s, 1H); δ 5.96 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 6.45 (s, 1H); δ 7.12 (m, 1H); δ 7.48 (m, 3H); δ 7.58 (d, 1H); δ 7.66 (t, 1H, *J* = 20 Hz); δ 7.82 (m, 2H); δ 7.96 (d, 1H, *J* = 15 Hz); δ 8.40 (m, 1H); δ 8.55 (s, 1H). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 38.57; 42.88; 55.12; 66.87; 71.10; 75.07; 75.97; 123.09; 123.46; 123.62; 125.68;

125.81; 126.40; 127.33; 128.76; 129.19; 130.44; 133.96; 134.74; 136.14; 137.36; 141.44; 148.38; 148.90; 165.67. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{25}H_{24}ClNO_4Na$: 438.1467 $[M + Na]^+$; found: 438.1470.

2-(Hydroxy-pyridin-4-yl-methyl)-acrylic acid 4-chloro-6-naphthalen-1-yl-tetrahydro-pyran-2-yl methyl ester (**8f**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 781, 800, 1066, 1178, 1244, 1373, 1448, 1598, 1734, 2854, 2958, 3053, 3332. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) Despite the spectrum does not provide enough resolution to demonstrate the integration of the peaks we can observe the presence of the olefinic and carbinolic hydrogens signals characterizing the C-C bond formation in Morita-Baylis-Hillman reaction step. δ 5.42 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 5.83 (d, 1H, 10 Hz); δ 6.38 (s, 1H). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 13.24; 24.06; 38.16; 41.31; 42.66; 48.44; 54.83; 65.68; 67.21; 74.72; 75.72; 121.36; 122.75; 122.83; 123.31; 125.53; 125.67; 126.26; 128.53; 128.62; 129.07; 150.85; 159.84. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{25}H_{24}ClNO_4Na$: 438.1467 $[M + Na]^+$; found: 438.1470.

2-(Hydroxy-naphthalen-2-yl-methyl)-acrylic acid 4-chloro-6-naphthalen-1-yl-tetrahydro-pyran -2-ylmethyl ester (**8g**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 474, 553, 746, 772, 956, 1034, 1139, 1252, 1507, 1621, 1708, 2847, 2926, 2952, 3057, 3425. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 1.62 (ddd, 1H, *J* = 20 Hz, 10 Hz, 5 Hz); δ 1.90 (qui, 1H, *J* = 10 Hz); δ 2.07 (m, 1H); δ 2.47 (d, 1H, *J* = 15 Hz); δ 2.82 (d, 1H); δ 3.77 (m, 1H); δ 4.10 (m, 1H); δ 4.15 (dd, 1H, *J* = 10 Hz, 5 Hz); δ 4.18 (m, 1H); δ 4.95 (m, 1H); δ 5.66 (s, 1H); δ 5.87 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz); δ 6.39 (s, 1H); δ 7.39 (m, 7H); δ 7.71 (m, 6H); δ 7.80 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 7.86 (d, 1H, *J* = 10 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 29.72; 38.39; 42.65; 54.95; 66.57; 73.30; 74.95; 75.80; 122.93; 122.98; 123.96; 124.57; 125.50; 125.60; 126.07; 126.19; 127.03; 127.68; 128.09; 128.29; 128.55; 129.00; 130.26; 133.02; 133.20; 133.80; 135.98; 138.60; 141.70; 165.95. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{30}H_{27}ClO_4Na$: 509.1490 $[M + Na]^+$; found: 509.1492.

2-[(4-Bromo-phenyl)-hydroxy-methyl]-acrylic acid 4-chloro-6-naphthalen-1-yl-tetrahydro-pyran -2-ylmethyl ester (**8h**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 550, 728, 771, 797, 950, 1009, 1034, 1137, 1265, 1299, 1401, 1503, 1630, 1707, 2856, 2925, 3435. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 1.63 (dd, 1H, *J* = 30 Hz, 10 Hz); δ 1.93 (m, 1H); δ 2.09 (dd, 1H, *J* = 20 Hz, 5 Hz); δ 2.48 (dt, 1H, *J* = 15 Hz, 5 Hz); δ 3.76 (qui, 1H); δ 4.15 (m, 3H); δ 4.95 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 5.37 (s, 1H); δ 5.76 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 6.30 (s, 1H); δ 7.90 (t, 2H, *J* = 10 Hz); δ 7.27 (m, 2H); δ 7.39 (m, 3H); δ 7.49 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 7.72 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 7.79 (m, 1H); δ 7.86 (d, 1H, *J* = 15 Hz) RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 38.35; 42.70; 54.99; 66.64; 72.58; 74.94; 75.84; 121.82; 122.98; 123.33; 125.53; 125.67; 126.27; 126.97; 127.07; 128.36; 128.65; 129.07; 130.30; 131.57; 133.83; 135.99; 140.35; 141.48; 165.75. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{26}H_{24}BrClO_4Na$: 537.0439 $[M + Na]^+$; found: 537.0442.

2-[Hydroxy-(2-nitro-phenyl)-methyl]-acrylic acid 6-ethyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester (**9a**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 752, 786, 1037, 1145, 1267, 1350, 1527, 1633, 1720, 2875, 2933, 2962, 3448. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 0.84 (t, 2H, *J* 15 Hz); δ 1.42 (m, 6H); δ 2.06 (m, 1H); δ 3.14 (m, 1H); δ 3.90 (m, 1H); δ 4.04 (d, 2H, *J* = 15 Hz); δ 5.68 (d, 1H, *J* = 15 Hz); δ 6.11 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 6.36 (s, 1H); δ 7.40 (t, 1H, *J* = 15 Hz); δ 7.58 (t, 1H, *J* = 15 Hz); δ 7.65 (m, 1H); δ 7.89 (ddd, 1H, *J* = 15 Hz, 10 Hz, 2.5 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 9.71; 28.53; 38.58; 41.66; 55.10; 66.73; 67.63; 73.97; 78.22; 124.58; 127.16; 128.87; 133.49; 136.04; 140.53; 148.34; 165.41. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{18}H_{24}NO_6$: 350.1598 $[M + H]^+$; found: 350.1602.

2-[Hydroxy-(3-nitro-phenyl)-methyl]-acrylic acid 6-ethyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester (**9b**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 740, 812, 962, 1047, 1147, 1350, 1529, 1624, 1658, 1722, 2873, 2931, 2962, 3427. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 0.85 (t, 3H, *J* = 15 Hz); δ 1.43 (m, 4H); δ 2.07 (m, 1H); δ 3.17 (m, 1H); δ 3.49 (m, 1H); δ 3.91 (m, 1H); δ 4.06 (m, 2H); δ 5.56 (s, 1H); δ 5.84 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 6.39 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 7.46 (t, 1H, *J* = 20 Hz); δ 7.66 (t, 1H, *J* = 10 Hz); δ 8.07 (d, 1H, *J* = 15 Hz); δ 8.19 (s, 1H). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 9.70; 28.55; 38.39; 41.58; 54.92; 66.79; 72.65; 73.89; 78.20; 121.46; 122.78; 127.88; 129.34; 132.52; 140.81; 143.70; 148.33; 165.32. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{18}H_{24}NO_6$: 350.1598 $[M + H]^+$; found: 350.16012.

2-[Hydroxy-(4-nitro-phenyl)-methyl]-acrylic acid 6-ethyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester (**9c**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 754, 829, 854, 962, 1047, 1147, 1265, 1348, 1521, 1604, 1631, 1720, 2875, 2935, 2964, 3462. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 0.92 (t, 3H, *J* = 10 Hz); δ 1.51 (m, 5H); δ 2.05 (m, 1H); δ 2.15 (dt, 1H, *J* = 15 Hz, 5 Hz); δ 3.23 (m, 1H); δ 3.55 (m, 1H); δ 3.985 (m, 1H); δ 4.15 (d, 2H, *J* = 10 Hz); δ 5.64 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 5.90 (d, 2H, *J* = 15 Hz); δ 6.46 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 7.58 (dd, 2H, *J* = 10 Hz, 2.5 Hz); δ 8.20 (d, 2H, *J* = 10 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 9.71; 28.57; 38.38; 41.59; 54.93; 66.78; 72.65; 73.98; 78.23; 123.62; 127.38; 127.79; 127.94; 140.91; 147.46; 148.61; 148.73; 165.37. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{18}H_{24}NO_6$: 350.1598 $[M + H]^+$; found: 350.15995.

2-(Hydroxy-pyridin-2-yl-methyl)-acrylic acid 6-ethyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester (**9d**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 754, 960, 1006, 1045, 1062, 1147, 1267, 1382, 1436, 1593, 1635, 1720, 2875, 2933, 2962, 3392. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 0.84 (t, 3H, *J* = 10 Hz); δ 1.44 (m, 5H); δ 1.95 (m, 1H); δ 2.07 (dt, 1H, *J* = 15 Hz, 2.5 Hz); δ 3.14 (qui, 1H, *J* = 7.5 Hz); δ 3.46 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz); δ 3.91 (qui, 1H, *J* = 5 Hz, 10 Hz); δ 4.06 (m, 2H); δ 5.55 (s, 1H); δ 5.93 (s, 1H); δ 6.34 (s, 1H); δ 7.16 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz); δ 7.37 (t, 1H, *J* = 10 Hz); δ 7.61 (t, 1H, *J* = 10 Hz); δ 8.48 (d, 1H, *J* = 5 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 9.72; 28.57; 38.65; 41.68; 55.19; 66.53; 72.20; 74.08; 78.15; 121.23; 122.71; 127.50; 136.87; 141.53; 148.22; 159.36; 165.68. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{17}H_{24}NO_4$: 306.1700 $[M + H]^+$; found: 306.17010.

2-(Hydroxy-pyridin-3-yl-methyl)-acrylic acid 6-ethyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester (**9e**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 713, 758, 813, 848, 960, 1058, 1147, 1263, 1327, 1377, 1425, 1460, 1624, 1633, 1720, 2875, 2933, 2962, 3332. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 0.84 (t, 3H, *J* = 15 Hz); 1.43 (m, 4H); 1.94 (m, 1H); 2.07 (dt, 1H, *J* = 25 Hz, 5 Hz); 3.15 (m, 1H); 3.45 (m, 1H); 3.91 (m, 1H); 4.06 (m, 2H); 5.53 (s, 1H); 5.88 (d, 1H, *J* = 10 Hz); 6.37 (s, 1H); 7.20 (t, 1H, *J* = 10 Hz); 7.66 (dd, 1H, *J* = 15 Hz, 2.5 Hz); 8.40 (dd, 1H, *J* = 10 Hz, 2.5 Hz); 8.48 (s, 1H). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 9.72; 28.55; 38.49; 41.59; 55.02; 66.65; 70.93; 73.98; 78.16; 123.40; 127.00; 134.44; 137.14; 141.41; 148.34; 148.83; 165.40. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{17}H_{24}NO_4$: 306.1700 $[M + H]^+$; found: 306.17011.

2-(Hydroxy-pyridin-4-yl-methyl)-acrylic acid 6-ethyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester (**9f**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 758, 873, 1041, 1089, 1149, 1259, 1377, 1409, 1458, 1602, 1635, 1735, 2852, 2927, 2962, 3392. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) Despite the spectrum does not provide enough resolution to demonstrate the integration of the peaks we can observe the presence of the olefinic and carbinolic hydrogens signals characterizing the C-C bond formation in Morita-Baylis-Hillman reaction step. δ 5.48 (d, 1H, *J* = 5 Hz); δ 5.84 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 6.38 (d, 1H, *J* = 5 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 9.81; 13.25; 28.58; 38.28; 41.61; 48.43; 54.99; 55.59; 65.60; 67.31; 73.91; 78.23; 121.47; 141.95; 150.95; 169.81. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{17}H_{24}NO_4$: 306.1700 $[M + H]^+$; found: 306.17006.

2-(Hydroxy-naphthalen-2-yl-methyl)-acrylic acid 6-ethyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester (**9g**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 752, 819, 962, 1045, 1147, 1269, 1382, 1462, 1631, 1658, 1718, 2852, 2927, 2962, 3427. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 0.81 (t, 3H, *J* = 5 Hz); δ 1.35 (m, 3H); δ 1.45 (m, 1H); δ 1.87 (m, 1H); δ 1.99 (d, 1H); δ 3.06 (m, 1H); δ 3.37 (m, 1H); δ 3.78 (m, 1H); δ 4.01 (m, 2H); δ 5.635 (d, 1H); δ 5.81 (d, 1H); δ 6.35 (d, 1H); δ 7.39 (m, 3H); δ 7.75 (dd, 4H, *J* = 10 Hz); RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 9.78; 28.59; 38.52; 41.63; 55.10; 66.58; 73.34; 74.06; 78.18; 124.60; 125.51; 126.10; 126.23; 127.02; 127.73; 128.12; 128.28; 133.05; 133.24; 138.68; 141.80; 165.89. LC-MS-IT-TOF calculated for $C_{22}H_{26}O_4Na$: 377.1723 $[M + Na]^+$; found: 377.17258.

2-[(4-Bromo-phenyl)-hydroxy-methyl]-acrylic acid 6-ethyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl ester (**9h**): FTIR (KBr) cm^{-1}: 759, 817, 875, 962, 1014, 1045, 1070, 1147, 1271, 1382, 1404, 1460, 1631, 1656, 1716, 2852, 2927, 2962, 2448. RMN ^1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ 0.83 (t, 3H, *J* = 10 Hz); δ 1.37 (m, 3H); δ 1.48 (dt, 1H, *J* = 25 Hz, 10 Hz); δ 1.93 (t, 1H, *J* = 10 Hz); δ 2.05 (d, 1H, *J* = 15 Hz); δ 3.12 (m, 1H); 3.43 (m, 1H); δ 3.89 (m, 1H); δ 4.04 (m, 2H); δ 5.41 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 5.74 (d, 1H, *J* = 10 Hz); δ 6.30 (d, 1H); δ 7.17 (dd, 1H, *J* = 7.5 Hz); δ 7.38 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ 9.78; 28.63; 38.52; 41.66; 55.08; 66.66; 72.77; 72.87; 74.03; 78.23; 121.81; 127.07; 127.11; 128.32; 131.57; 140.29; 140.40; 141.41; 141.52; 165.68. LC-MS-IT-TOF calculated for C18H23BrO4Na: 405.0672 $[M + Na]^+$; found: 405.06756.

3.2. Biology

3.2.1. *Leishmania* Culture

Leishmania (Leishmania) donovani (MHOM/ET/1967/HU3) was provided by Oswaldo Cruz Institute *Leishmania* Collection-Fiocruz-RJ-Brazil. Promastigotes were maintained in vitro at 26 °C

in Schneider's medium, pH 7 (20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 2% of male urine), as previously described [29].

3.2.2. Effect of Morita-Baylis-Hillman Adduct in Promastigotes of *Leishmania donovani*

Briefly, promastigotes in the logarithmic growth phase were cultured in 96-well cell culture plates at 1×10^6 parasites per well in 100 mL of Schneider's medium with increasing concentrations of 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, and 400 μg/mL of Morita-Baylis-Hillman adduct. The plates were incubated for 72 h in a biological oxygen demand (B.O.D.) incubator at 26 °C. Cytotoxicity to promastigotes was evaluated by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay as described by Valadares et al. [30].The absorbance was measured using an ELISA plate reader (ELx800, BIOTEK) at 540 nm. Amphotericin® was used as a positive control. The viability of promastigotes incubated in the presence of different concentrations of adducts was determined by comparing to a culture control (*L. donovani* cultivated in Schneider only). The concentration that caused a 50% reduction in cell viability (IC_{50}) was calculated by Probit analysis (SPSS 13.0 for Windows). Each experiment was performed in duplicate and repeated at least three times. Haemolytic assays (HC_{50} > 400 $\mu g \cdot L^{-1}$) towards human red blood cells were performed as described in the literature [30].

4. Conclusions

The synthesis of the sixteen new hybrids was done in two steps in moderate to very good yields, through the reaction of MBHAs with tetrahydropyran acrylates and aromatic aldehydes. Studies of the variation of reaction conditions, such as the use of microwaves promoting the reaction at 80 °C, use of low temperature, protic or aprotic solvents, and the use of phenol as additives were used satisfactorily based on the knowledge of MBHR reaction mechanisms. The success of the biological results of leishmanicidal activities and high indices of selectivities of several hybrids, especially those which present a bromine atom in the aromatic structure (SIrb > 180.19) higher than the reference drug Amphotericin B (SI_{rb} = 33.05), which presents high toxicity, indicate that our proposal that hybridization of opioid analgesic tetrahydropyrans with MBHA was a good strategy. This also shows a good possibility to obtain new leishmanicidal drugs against *Leishmania donovani* ssp.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/1420-3049/22/2/207/s1.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge CNPq/CAPES for financial support and the Pro-Rector's Office (PRPG, UFPB) for the payment of publication fees in Molecules.

Author Contributions: Suervy Canuto de Oliveira Sousa was responsible for the chemical experiments and analyzed the data; Everton da Paz Silva, Francisco José Seixas Xavier and João Paulo Gomes de Oliveira assisted Suervy Canuto de Oliveira Sousa in some experiments; Juliana da Câmara Rocha was responsible for antipromastigotes experiments; Tatjana Keesen de Souza Lima directed the biological studies; Fábio Pedrosa Lins Silva and Priscilla Anne Castro de Assis participate in discussions during the work; Saulo Luís Capim and Bruno Guimarães Marinho were responsible for the synthesis and corresponding evaluation of the analgesic activity of tetrahydropyran 7; Claudio Gabriel Lima Junior and Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos coordinate the chemical experiments and analyzed the data and had all conception of this work. They also wrote this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Feasey, N.; Wansbrough-Jones, M.; Mabey, D.C.W.; Solomon, A.W. Neglected tropical diseases. *Br. Med. Bull.* **2010**, *93*, 179–200. [CrossRef] [PubMed]
2. Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den-Boer, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35671. [CrossRef] [PubMed]
3. Romero, G.A.S.; Boelaert, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS NTD* **2010**, *1*, e584. [CrossRef] [PubMed]
4. Forestier, C.L. Imaging host-Leishmania interactions: significance in visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **2013**, *35*, 256–266. [CrossRef] [PubMed]

5. Lima–Junior, C.G.; Vasconcellos, M.L.A.A. Morita–Baylis–Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3954–3971. [CrossRef] [PubMed]
6. Basavaiah, D.; Reddy, B.S.; Badsara, S.S. Recent Contributions from the Baylis—Hillman Reaction to Organic Chemistry. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5447–5674. [CrossRef] [PubMed]
7. Santos, M.S.; Coelho, F.; Lima-Junior, C.G.; Vasconcellos, M.L.A.A. The Morita-Baylis-Hillman Reaction: Advances and Contributions from Brazilian Chemistry. *Curr. Org. Synt.* **2015**, *12*, 830–852. [CrossRef]
8. Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V.S.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1829–1852. [CrossRef] [PubMed]
9. Barbosa, T.P.; Sousa, S.C.O.; Amorim, F.M.; Rodrigues, Y.K.S.; de Assis, P.A.C.; Caldas, J.P.A.; Oliveira, M.R.; Vasconcellos, M.L.A.A. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4250–4256. [CrossRef] [PubMed]
10. Xavier, F.J.S.; Rodrigues, K.A.F.; Oliveira, R.G.; Lima-Junior, C.G.; Rocha, J.C.; Keesen, T.S.L.; Oliveira, M.R.; Silva, F.P.L.; Vasconcellos, M.L.A.A. Synthesis and In Vitro Anti Leishmania amazonenses Biological Screening of Morita-Baylis-Hillman Adducts Prepared from Eugenol, Thymol and Carvacrol. *Molecules* **2016**, *21*, 1483. [CrossRef] [PubMed]
11. Capim, S.L.; Carneiro, P.H.P.; Castro, P.C.; Barros, M.R.M.; Marinho, B.G.; Vasconcellos, M.L.A.A. Design, Prins-cyclization reaction promoting diastereoselective synthesis of 10 new tetrahydropyran derivatives and in vivo antinociceptive evaluations. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
12. The 2D-NOESY spectrum of compound 6 described on reference 11, presented significant signals of correlation between Ha/ Hb, Ha/Hc and Hb/Hc that determine unequivocally the 2,4,6-cis geometry of tetrahydropyran ring. Thus, the relative configuration of the C2 -C4-C6 in the compounds **8a-8h** in the tetrahydropyran ring are the same as those determined for 6. However, the relative configuration in the carbinolic carbon in **8a-8h** has not been determined in this article.
13. Miranda, L.S.M.; Marinho, B.G.; Leitão, S.G.; Matheus, M.E.; Fernandes, P.D.; Vasconcellos, M.L.A.A. (±)-cis-(6-Ethyl-tetrahydropyran-2-yl)-formic acid: A novel substance with antinociceptive properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1573–1575. [CrossRef] [PubMed]
14. Eliel, E.L.; Manoharan, M.; Pietrusiewicz, K.M.; Hargrave, K.D. Carbon ^{13} NMR Spectra of Saturated Heterocycles. XI:-Tetrahydropyrans (Oxanes). *Org. Magn. Res.* **1983**, *21*, 94–107. [CrossRef]
15. Gonçalves, G.M.; Capim, S.L.; Vasconcellos, M.L.A.A.; Marinho, B.G. Antihyperalgesic effect of [(±)-(2,4,6-cis)-4-chloro-6-(naphthalen-1-yl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl]methanol:participation of the NO/cGMP/KATP pathway and κ-opioid receptor. *Behav. Pharmacol.* **2016**, *27*, 506–515. [CrossRef] [PubMed]
16. Calculated ED_{50} values from the acetic acid-induced abdominal writhes in mice to 6 = 27.97 $\mu Mol \cdot Kg^{-1}$ Capim, S.L.; Gonçalves, G.M.; dos Santos, G.C.M.; Marinho, B.G.; Vasconcellos, M.L.A.A. High analgesic and anti-inflammatory in vivo activities of six new hybrids NSAIAs tetrahydropyran derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6003–6010. Calculated ED_{50} values from the acetic acid-induced abdominal writhes in mice to 7 = 41.67 $\mu Mol \cdot Kg^{-1}$ (unpublished results).
17. The relative *cis* configuration of the groups present in the C_2 and C_6 positions of the corresponding carboxylic acid prepared from the alcohol 7, were determinated by ^{13}C NMR spectroscopy through the characteristic down field shift of the C_2, C_6 carbons (see references 28 and 29). Thus, the relative configuration of the C2-C6 in the compounds **9a–9h** in the tetrahydropyran ring are the same as those determined for 7. However, the relative configuration in the carbinolic carbon in **9a-9h** has not been determined in this article.
18. De Souza, R.O.M.A.; Pereira, V.L.P.; Muzitano, M.F.; Rossi-Bergmann, B.; Filho, E.B.A.; Vasconcellos, M.L.A.A. High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl) propanenitrile and analogous compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 99–102. [CrossRef] [PubMed]
19. Junior, C.G.L.; de Assis, P.A.C.; Silva, F.P.L.; Sousa, S.C.O.; de Andrade, N.G.; Barbosa, T.P.; Nerís, P.L.N.; Segundo, L.V.G.; Anjos, I.C.; Carvalho, G.A.U.; et al. Efficient synthesis of 16 aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: biological evaluation on Leishmania amazonensis and Leishmania chagasi. *Bioorg. Chem.* **2010**, *38*, 279–284. [CrossRef] [PubMed]

20. Silva, F.P.L.; de Assis, P.A.C.; Lima-Junior, C.G.; de Andrade, N.G.; da Cunha, S.M.D.; Oliveira, M.R.; Vasconcellos, M.L.A.A. Synthesis, evaluation against Leishmania amazonensis and cytotoxicity assays in macrophages of sixteen new congeners Morita-Baylis-Hillman adducts. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4295–4301. [CrossRef] [PubMed]
21. Junior, C.G.L.; Silva, F.P.L.; Oliveira, R.G.; Subrinho, F.L.; Andrade, N.G.; Vasconcellos, M.L.A.A. Microwave Irradiation or Low Temperature Improved Synthesis of Antiparasitic Morita-Baylis-Hillman Adducts. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 2220–2224. [CrossRef]
22. Muylder, G.D.; Ang, K.K.H.; Chen, S.; Arkin, M.R.; Engel, J.C.; McKerrow, J.H. A Screen against Leishmania Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identificationof a Host Cell-Specific Hit. *PLoS NTD* **2011**, *5*, e1253. [CrossRef] [PubMed]
23. Rafel, S.; Leahy, J.W. An unexpected rate acceleration practical improvements in the Baylis-Hillman reaction. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1521–1522. [CrossRef]
24. Vasconcellos, M.L.A.A.; de Souza, R.O.M.A. Intrinsic catalytic activity of tertiary amines: a mechanistic proposal to the unexpected temperature effect in Baylis-Hillman reaction. *Catal. Commun.* **2004**, *5*, 21–24.
25. Price, K.E.; Broadwater, S.J.; Walker, B.J.; McQuade, D.T. A new interpretation of the Baylis-Hillman mechanism. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3980–3987. [CrossRef] [PubMed]
26. Robiette, R.; Aggarwal, V.K.; Harvey, J.N. Mechanism of the Morita-Baylis-Hillman reaction: a computational investigation. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15513–15525. [CrossRef] [PubMed]
27. Plata, R.E.; Singleton, D.A. A Case Study of the Mechanism of Alcohol-Mediated Morita Baylis–Hillman Reactions. The Importance of Experimental Observations. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3811–3826. [CrossRef] [PubMed]
28. Da Silva, W.A.V.; Rodrigues, D.C.; Oliveira, R.G.; Mendes, R.K.S.; Olegário, T.R.; Rocha, J.C.; Keesen, T.S.L.; Lima-Junior, C.G.; Vasconcellos, M.L.A.A. Synthesis and activity of novel homodimers of Morita–Baylis–Hillman adducts against Leishmania donovani: A twin drug approach. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4523–4526. [CrossRef] [PubMed]
29. Morais-Teixeira, E.; Damasceno, Q.S.; Galuppo, M.K.; Romanha, A.J.; Rubella, A. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant Leishmania species of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2011**, *106*, 475–478. [CrossRef] [PubMed]
30. Valadares, D.G.; Duarte, M.C.; Oliveira, J.S.; Chávez-Fumagalli, M.A.; Martins, V.T.; Costa, L.E.; Leite, J.P.V.; Santoro, M.M.; Régis, W.C.B.; Tavares, C.A.P.; et al. Leishmanicidal activity of the Agaricus blazei Murill in different Leishmania species. *Parasitol. Int.* **2011**, *60*, 357–363. [CrossRef] [PubMed]

Sample Availability: Samples of the compounds not available from the authors.



© 2017 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

APÊNDICE D

European Journal of Medicinal Chemistry 106 (2015) 1–14

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Research paper

2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation *in vitro*

Klinger Antonio da Franca Rodrigues [a], Cínthia Nóbrega de Sousa Dias [a], Patrícia Lima do Nascimento Néris [a], Juliana da Câmara Rocha [b], Marcus Tullius Scotti [a], Luciana Scotti [a], Sandra Rodrigues Mascarenhas [a], Robson Cavalcante Veras [c], Isac Almeida de Medeiros [a, c], Tatjana de Souza Lima Keesen [a, d], Tiago Bento de Oliveira [e], Maria do Carmo Alves de Lima [e], Tatiane Luciano Balliano [f], Thiago Mendonça de Aquino [f], Ricardo Olímpio de Moura [g], Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior [a, g], Márcia Rosa de Oliveira [b, h, *]

[a] *Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil*
[b] *Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil*
[c] *Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil*
[d] *Departamento de Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil*
[e] *Departamento de Antibióticos, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil*
[f] *Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió, AL, Brazil*
[g] *Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, 58058-420, João Pessoa, PB, Brazil*
[h] *Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba CEP, 58059-900, Brazil*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 September 2015
Received in revised form
28 September 2015
Accepted 6 October 2015
Available online 17 October 2015

Keywords:
Leishmaniasis
Drug development
Mechanisms of action
Synthetic chemistry

ABSTRACT

This study evaluated the effects of 2-amino-thiophene derivatives on the promastigote and amastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and their possible mechanisms of action. Initially, we evaluated the antileishmanial activity of ten 2-amino-thiophene derivatives on promastigote and axenic amastigote forms of *Leishmania amazonensis* and their cytotoxicity against murine macrophages and human red blood cells. Three promising compounds were selected for studies of the cell death process using flow cytometry analysis and a DNA fragmentation assay. The effects of the compounds were assessed on intramacrophagic amastigotes, and the modulation of cytokine and NO production was investigated. All thiophene derivatives showed antileishmanial activity against promastigotes and axenic amastigotes with less toxicity for murine macrophages and human red blood cells. The best values were obtained for compounds containing a lateral indole ring. Docking studies suggested that these compounds played an important role in inhibiting trypanothione reductase (TryR) activity. The selected compounds SB-200, SB-44, and SB-83 induced apoptosis in promastigotes involving phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation in a pattern similar to that observed for the positive control. Additionally, SB-200, SB-44, and SB-83 significantly reduced the infection index of macrophages by the parasites; for compounds SB-200 and SB-83 this reduction was associated with increased TNF-α, IL-12 and NO levels. This study demonstrated the effective and selective action of 2-amino-thiophene derivatives against *L. amazonensis*, resulting in apoptosis-like cell death and immunomodulation *in vitro*. The results suggest that they are promising compounds for the development of new leishmanicidal drugs.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved

* Corresponding author. Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Castelo Branco, João Pessoa, Paraíba, CEP, 58059-900, Brazil.
E-mail address: mrosajp@gmail.com (M.R. Oliveira).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.011
0223-5234/© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is a complex of infectious diseases caused by more than 20 kinetoplastid protozoan parasites that belong to the Trypanosomatidae family and genus *Leishmania*. It affects approximately 12 million people in more than 98 countries distributed in five continents and is included in the neglected tropical diseases (NTD) group [1,2]. The clinical manifestations can vary from nodular and ulcerative skin lesions to the progressive mucocutaneous and visceral form, which is the most severe form and can potentially result in fatal disease [3]. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* is found in the New World primarily in Latin America and is associated with different clinical forms of cutaneous leishmaniasis. It is the main agent of diffuse cutaneous leishmaniasis, which is commonly refractory to available treatments [4].

Currently, leishmaniasis chemotherapy has a reduced arsenal of drugs and is far from satisfactory. Most of the drugs exhibit severe toxic side effects, and increased chemoresistance of the parasite greatly reduces its sensitivity to these drugs [3]. The first-line and most widely used drugs for the treatment of leishmaniasis are pentavalent antimonials such as meglumine antimoniate (Glucantime®) and sodium stibogluconate (Pentostan®). Pentavalent antimonials have been used since 1945; they require parenteral administration and are toxic and poorly tolerated drugs [5]. Second-line drug such amphotericin B, pentamidine, paromomycin and miltefosine are used in refractory and resistant cases, but these drugs have high costs and may be even more toxic than the antimonials [6]. Therefore, there is a dire need globally for the development of drugs that are more effective against the parasite and less toxic than conventional drugs.

Planning and synthesizing new drugs based on known structures is founded on the main objective of obtaining derivatives with greater therapeutic interest and higher activity, bioavailability and metabolism that are more suited to therapeutic use. These drugs should exhibit less toxicity and may even acquire more appropriate pharmacotechnical features [7,8].

Among the compounds that have been tested as potential antileishmanial agents, thiophene derivatives are particularly interesting [9]. Thiophene derivatives have been identified as secondary metabolites in various organisms including fungi and plants, such as *Tagetes patula* and *Tagetes erecta* (Asteraceae) [10]. In medicinal chemistry, thiophenes are a versatile class of sulphur-containing heterocyclic compounds that meet the characteristics of a "privileged structure" in which a simple molecular framework is able to provide ligands for diverse targets [11]. Several reports confirm that small substitutions in the thiophene structure cause large differences in the biological and pharmacological profiles [12]. Properties described in the literature include: anti-inflammatory, antitumor, antinociceptive, anticonvulsant, and antiarrhythmic [13]. These structures also exhibit promising activity against microorganisms due to their antibacterial, antifungal, and antiprotozoal properties [12,14]. Some plant-extracted thiophene derivatives have been reported to be effective against the promastigote forms of *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, and *L. amazonensis* [9,15], thereby highlighting the potential of these molecules as agents for the treatment of leishmaniasis. However, studies of naturally occurring substances commonly present limitations in terms of the availability of the substance to be tested.

In this context, the present study evaluated the antileishmanial activity of 10 synthetic 2-amino-cycloalkyl[*b*]thiophene-3-carbonitrile derivatives against *L. amazonensis*, one of the etiological agents of American cutaneous leishmaniasis (ACL). These molecules present simple chemical structures and are easily synthesized using a low cost method via a two-step reaction. The reaction starts with the one pot reaction between malononitrile with a cyclic ketone and elemental sulphur in the presence of morpholine, followed by the Gewald reaction [16]. Among the molecules tested, three showed better selectivity indices to the parasite and were evaluated on amastigotes internalized into macrophages. Finally, possible mechanisms of action responsible for the antileishmanial activity were evaluated.

2. Results

2.1. Synthetic chemistry

Scheme 1 shows the reaction sequence used to obtain the thiophene derivatives and the chemical structures of the studied compounds. For the evaluation of the antileishmanial activity, all compounds were re-synthesized and their chemical structures were confirmed by comparison with their physico-chemical characteristics and signals in the NMR ^{1}H spectra. All compounds were obtained with a good yield (greater than 70%), demonstrating the good synthetic feasibility and choice of standardization of reaction conditions employed in the synthetic strategy.

2.2. X-ray crystal structures of SB-83 and SB-200

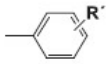
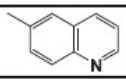
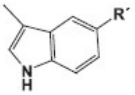
The crystal structures of two of the thiophene derivatives (compounds SB-200 and SB-83) were solved by X-ray crystallography. The crystallographic parameters, crystal data, data collection details and structure refinement results for SB-200 and SB-83 were presented in Table 1.

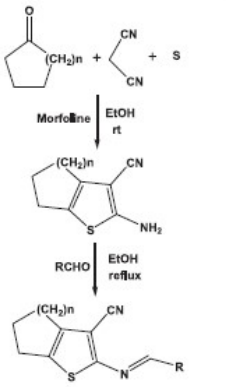
The fractional atomic coordinates and isotropic temperature parameters (Å^2) for SB-200 and SB-83 are presented in the supplementary data. Figs. 1 and 2 represent the stereodiagrams of the crystal structures of SB-200 and SB-83. The nonhydrogen atoms are drawn as ellipsoids that represent the probability (50%) that the atoms are located within the designated volumes. The interatomic bond distances (Å) and angles (°) for SB-200 and SB-83 are presented in the supplementary data. The view of the packing of SB-200 and SB-83 showing the intermolecular interactions that stabilize the crystal structures are presented in the supplementary data.

2.3. In vitro antileishmanial efficacy of 2-amino-thiophenes and their cytotoxicity

In a preliminary experiment, ten 2-amino-thiophene derivatives were investigated. Their antileishmanial efficacy on the promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis* and their cytotoxicity against murine peritoneal macrophages and human red blood cells were evaluated to identify the most active and selective molecules against the parasite. Their IC_{50}, EC_{50}, CC_{50} and HC_{50} calculated values are shown in Table 2; meglumine antimoniate and amphotericin B were included as reference drugs.

All thiophene derivatives showed antileishmanial activity on promastigotes, with IC_{50} values ranging from 3.37 μM (SB-83) to 189.3 μM (SB-63) and EC_{50} values ranging from 15.82 μM (SB-44) to 212.73 μM (6CN10) when assayed against axenic amastigotes. Among the evaluated compounds, SB-200, SB-44, and SB-83 (which contain a lateral indole ring) showed higher antileishmanial activity. The antileishmanial activity was higher than meglumine antimoniate and lower than amphotericin B. With regards to their cytotoxic effects, all of the compounds showed lower toxicity for macrophages than for the different parasite forms (CC_{50} values ranging from 32.02 μM for SB-200 to 721.76 μM for SB-63). The haemolytic assays showed that the 2-amino-thiophene derivatives did not exhibit toxicity towards human red blood cells

Compound	n	R	R´
6CN01	2		H
6CN09	2		2-Br-5-OMe
6CN10	2		4-NO_2
SB-63	3		-
SB-80	1		-
SB-68	3		-
SB-81	1		-
SB-44	3		H
SB-83	2		5-Bromo
SB-200	3		5-Bromo



Scheme 1. Synthesis and chemical structures of studied compounds.

Table 1
Crystal data, data collection details and structure refinement results for SB-200 and SB-83.

Parameter	SB-200 - $C_{19}H_{16}BrN_3S$	SB-83 – $C_{18}H_{14}BrN_3S$
Molecular weight (g/mol)	398.32	384.29
Space group	$P2_1/n$	Pmnb
a (Å)	11.370(1)	6.769(1)
b (Å)	11.195(1)	10.160(2)
c (Å)	14.275(1)	24.968(4)
β (°)	106.026(1)	90.000 (0)
V (Å^3)	1746.5(3)	1717.3(1)
Z	4	4
D_c(g.cm^{-3})	1.515	1.486
Absorbance (μ.mm^{-1})	2.478	2.518
Independent reflections	4143	2206
Reflections $I>2\sigma(I)$	3265	1731
R-factor	0.0396	0.0429

(HC_{50} values ranging from 624.8 μM for SB-81 to >800 μM for the compounds 6CN10, 6CN09, SB-80, SB-63, SB-200, and SB-83). In contrast, meglumine antimoniate was less toxic to the parasite than the macrophages (CC_{50} of 1035 mg/L) and human erythrocytes (HC_{50} of 429.5 mg/L), and amphotericin B presented high levels of cytotoxicity (CC_{50} of 0.18 μM and HC_{50} of 11.6 μM).

The best selectivity index values were again obtained for the compounds containing a lateral indole ring (SB-200, SB-44, and SB-83). The selective indices of these compounds compared to the reference drugs were particularly interesting because the selectivity of SB-200, SB-44, and SB-83 for the parasites was much more pronounced. For example, SB-83 was 840- and >14,836-fold more benign than meglumine antimoniate towards macrophages and erythrocytes, respectively. These values are highly representative of the *in vitro* potential efficacy of thiophenes compared to the reference drugs. In view of the promising results obtained with the thiophene derivatives containing an indole ring (the SB-200, SB-44, and SB-83 compounds) that showed the best selectivity indices for the parasite (Table 2), these molecules were selected for further study.

2.4. Docking

To determine the molecular mechanism responsible for the antileishmania activity of the 2-amino-thiophene derivatives,

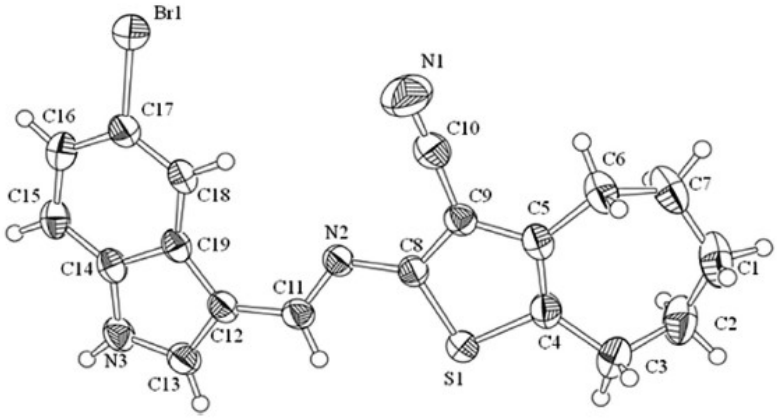


Fig. 1. Projection of SB-200, showing atom labelling and 50% probability displacement ellipsoids.

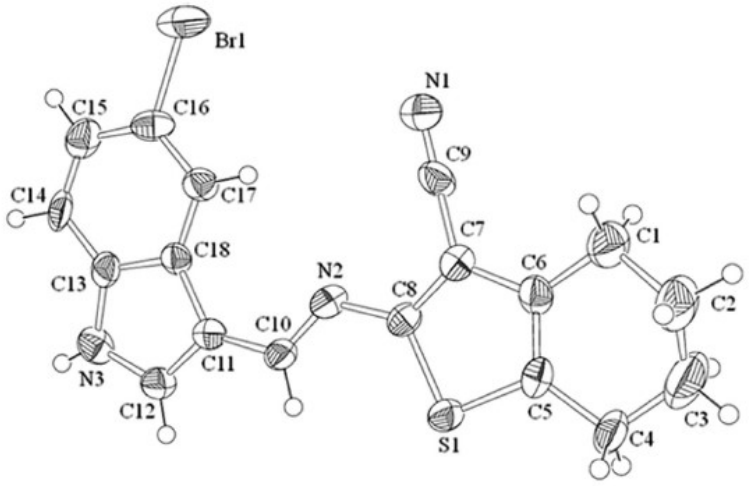


Fig. 2. Projection of SB-83, showing atom labelling and 50% probability displacement ellipsoids.

Table 2
Antileishmanial activity, cytotoxic effects against mammalian cells, and selectivity index values calculated for thiophene derivatives, meglumine antimoniate and amphotericin B.

Compounds	Cytotoxicity		Antileishmanial activity					
	Macrophages	Red blood cell	Promastigotes			Axenic amastigotes		
	CC_{50} μM	HC_{50} μM	IC_{50} μM	SI_m	SI_{rb}	EC_{50} μM	SI_m	SI_{rb}
6CN10	228.86	>800	187.1	1.22	>4.27	212.73	1.07	>3.76
6CN09	211.43	>800	88	2.4	>9.1	167.2	1.26	>4.78
6CN01	141.1	682.1	61.5	2.29	11.09	124.4	1.13	5.4
SB-80	540.44	>800	139.44	3.87	>5.73	210.7	2.56	>3.79
SB-68	438.46	716.3	164.66	2.66	4.35	132.37	3.31	5.41
SB-63	721.76	>800	189.3	3.81	>4.22	192.15	3.75	>4.16
SB-81	196.01	624.8	49.12	3.99	12.71	102.8	1.9	6
SB-200	32.02	>800	3.65	8.77	>291.17	20.09	1.59	>39.8
SB-44	49.08	721.3	7.37	6.65	97.86	15.82	3.1	45.5
SB-83	113.4	>800	3.37	33.6	>237.38	18.5	6.12	>43.24
Meglumine antimoniate	1035[a]	429.5[a]	25740[a]	0.04	0.016	1017.4[a]	1.01	0.42
Amphotericin B	0.18	11.6	0.17	1.05	68.23	0.23	0.78	14.87

SI_m (selectivity index) = CC_{50}/IC_{50}.
SI_{rb} (selectivity index) = HC_{50}/IC_{50}.
[a] Values in mg/L.

docking studies on trypanothione reductase (TryR) from *L. infantum* (PDB id: 2jk6) were performed. Table 3 shows the results of docking the thiophene derivatives into the catalytic site of TryR by presenting the binding energies (E_{dock}). The best ligands were compounds SB-200, SB-44 and SB-83, with E_{dock} values of −11.17, −10.29 and −9.81 Kcal/mol, respectively. In contrast, the worse ligands were compounds SB-80 and SB-81, with E_{dock} values of −7.86 and −7.69 Kcal/mol, respectively.

Table 3
Docking results of 2-amino-thiophene derivatives docked to Trypanothione reductase from *L. infantum* (PDB id: 2jk6).

Compound	Affinity energy (Kcal/mol)
6CN01	−8.79
6CN09	−8.60
6CN10	−9.36
SB63	−8.20
SB200	−11.17
SB44	−10.29
SB80	−7.86
SB81	−7.69
SB83	−9.81
SB68	−9.64

Docking analysis of the ligands into the TryR-binding site revealed that the 2-amino-thiophene derivatives fit well into the active site pocket made up of key residues (Fig. 3). The main residues were Thr51 and Ser162, which interacted with all of the compounds through hydrogen bonds and acted as H-bond donors. Residue Thr51 made an H-bond with the sp nitrogen of the nitrile (−C≡N), and residue Ser162 stabilised the ligands though H-bonding with the sp^2 nitrogen of the imine group (−N=CH−). Other hydrophobic interactions with residues Gly11, Gly13, Val36, Ala159, Thr160 and Asp327 helped to stabilise the guest–host complexes and played an important role in the ligand binding affinity.

2.5. Apoptotic-necrotic profiling in Leishmania promastigotes by selected thiophenes

To determine the cell death process in parasites exposed to compounds SB-200, SB-44, and SB-83, conventional flow

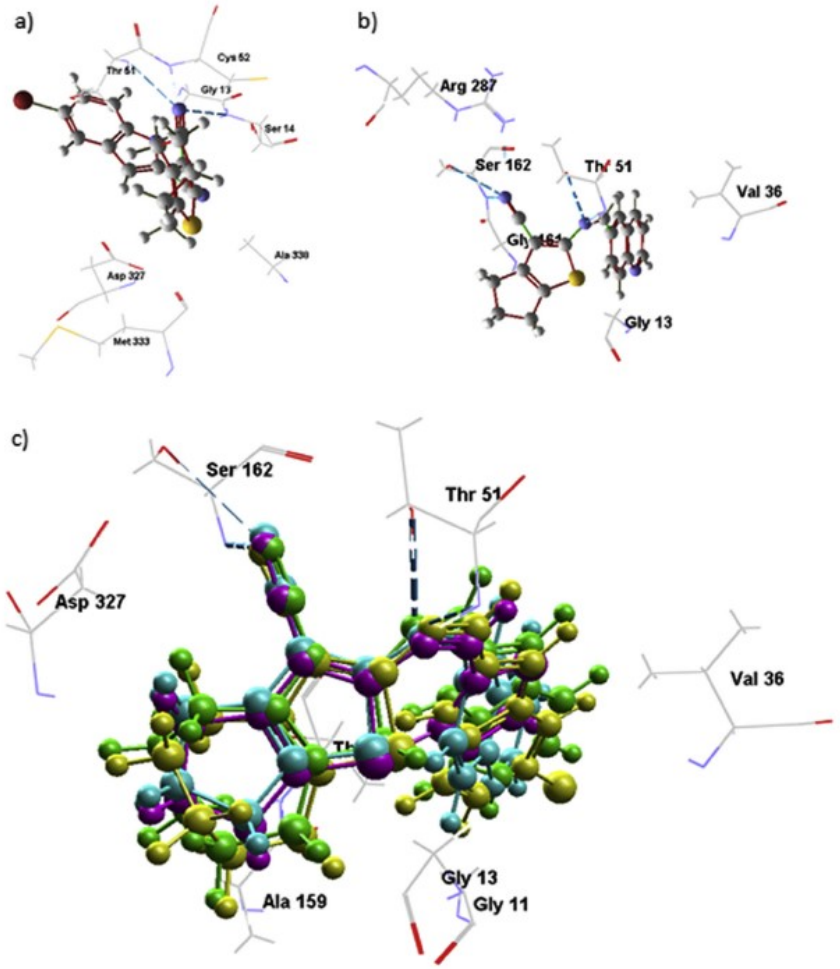


Fig. 3. a) Interaction of SB-200 with the TryR-binding site. Blue lines represent hydrogen bonds. b) Interaction of SB-81 with the TryR-binding site. Blue lines represent hydrogen bonds. c) TryR binding sites cluster with compounds SB-44 (green), SB-200 (yellow), SB-81 (blue) and SB-80 (purple). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cytometry was performed using Annexin V-FITC and PI. Viable cells remained unstained (Annexin V-FITC−/PI−). Early apoptotic cells showed Annexin V-FITC+/PI− staining patterns, whereas late apoptotic cells exhibited Annexin V-FITC+/PI + staining patterns due to the loss of plasma membrane integrity [17]. Moreover, DNA fragmentation was analysed using the agarose gel electrophoresis assay. Representative dot-plots of Annexin V-FITC/PI staining are provided in Fig. 4.

No death from initial apoptosis was observed (cells positive for annexin V and negative for PI) after treatment with the compounds SB-200, SB-44, SB-83 and amphotericin B (positive control). However, an increase in the number of promastigotes with late apoptosis (parasites staining positive for annexin V and PI) was observed following treatment with SB-200 (2x and 4x IC_{50}), SB-44 (4x IC_{50}), SB-83 (2x and 4x IC_{50}), and amphotericin B (1x, 2x, and 4x IC_{50}). Furthermore, necrotic cell death (cells negative for annexin V and positive for PI) was detected for compounds SB-200 (1x, 2x, and 4x IC_{50}), SB-44 (1x, 2x, and 4x IC_{50}), SB-83 (2x, and 4x IC_{50}), and amphotericin B (4x IC_{50}) (Table 4).

In a qualitative analysis using the DNA fragmentation assay by agarose gel electrophoresis, DNA fragmentation was detected in promastigote cells treated with SB-200, SB-44, and SB-83 at concentrations of 1x, 2x, and 4x the IC_{50} (Fig. 5). The result was similar to that observed following treatment with amphotericin B at a concentration of 1x the IC_{50} using cellular death by apoptosis as a positive control. These results suggest that the cell death caused by the compounds SB-200, SB-44 and SB-83 in the *L. amazonensis* promastigote forms is associated with endonucleases activity, which is responsible for the DNA fragmentation that occurs as a result of apoptosis.

2.6. In vitro efficacy of thiophenes SB-200, SB-44, and SB-200 against intramacrophagic amastigotes

To evaluate the action of selected thiophenes against intramacrophagic amastigotes, an *in vitro* model of infection of murine peritoneal macrophages was used. The results of the treatment with thiophenes SB-200, SB-44, and SB-83 on macrophages

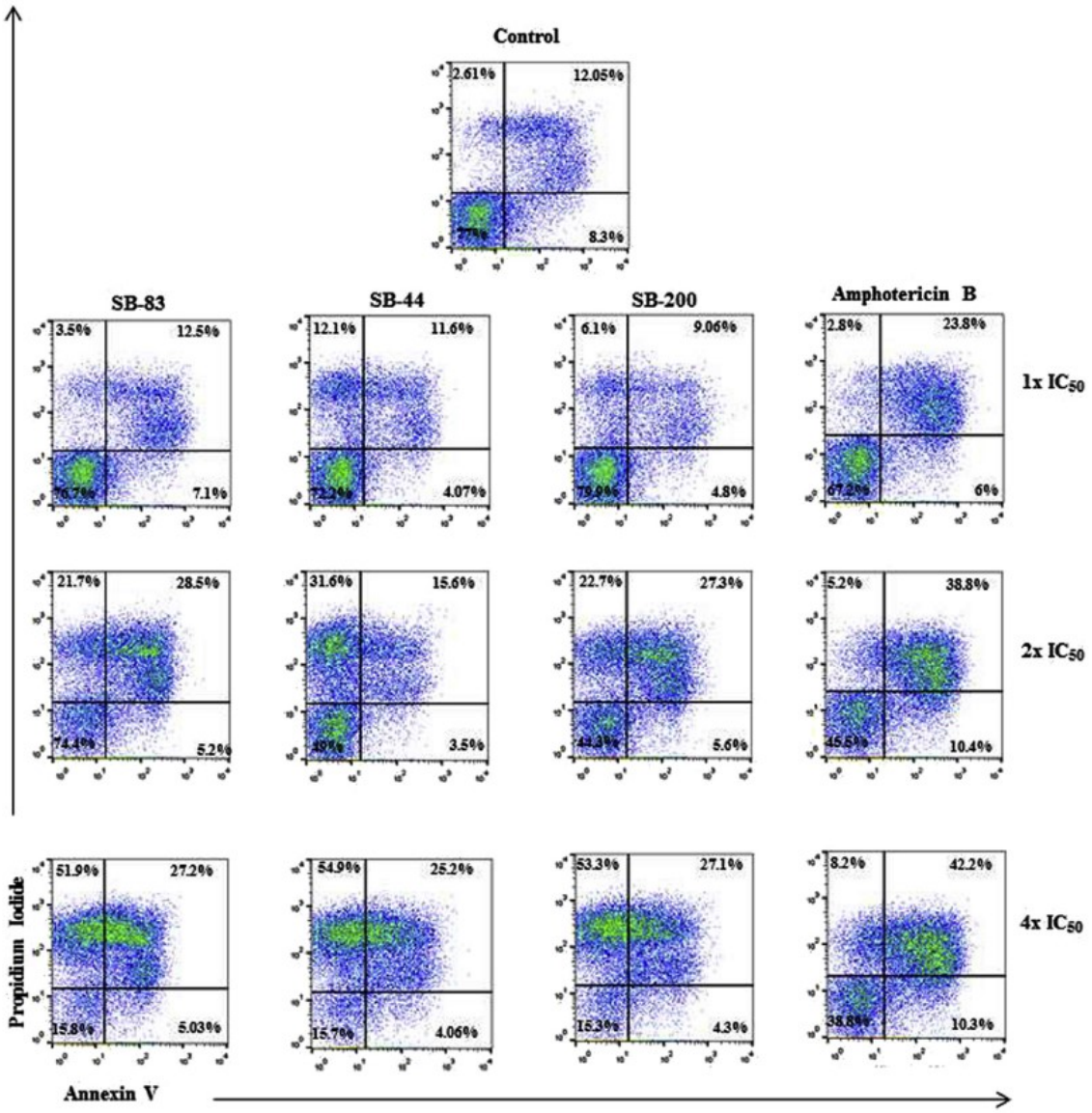


Fig. 4. Representative dot plots showing staining of *Leishmania amazonensis* promastigotes. *L. amazonensis* promastigotes were incubated at 26 °C for 4 h in the absence or presence of 2-amino-thiophene derivatives or amphotericin B at IC_{50}, 2x IC_{50} and 4x IC_{50} concentrations. Annexin/propidium iodide staining was performed and the samples were analysed by flow cytometry.

infected with *L. amazonensis* are presented in Figs. 6 and 7. The obtained values revealed a significant and concentration-dependent reduction in the survival rate of amastigotes after 24 h of treatment, resulting in EC_{50} values of 7.84, 10.5, and 8.17 for compounds SB-200, SB-44, and SB-83, respectively, while the reference drug meglumine antimoniate showed no effect. After 72 h of treatment, SB-200, SB-44, and SB-83 induced an even greater concentration-dependent reduction in the survival index, with EC_{50} values of 4.81, 9.52, and 6.4 μM, respectively. These thiophene derivatives had a much more significant effect than meglumine antimoniate after 72 h of exposure under the same experimental conditions; this reference drug was only able to induce a significant reduction in the survival index at a concentration of 300 mg/L and had an EC_{50} of 169.43 mg/L. Additionally, Fig. 7 shows a qualitative representation of the effect of the thiophenes, which can be observed through the preserved integrity of macrophages after 72 h of treatment with different concentrations.

2.7. Compounds SB-200, SB-44, and SB-200 induce a host-protective cytokine response and provide stimulus to increase NO levels

Due to the reduction in the infection rate of macrophages treated with the thiophene derivatives SB-44, SB-200 and SB-83,

Table 4
Flow cytometry analysis of *Leishmania amazonensis* promastigotes without treatment and treated with SB-200, SB-44, SB-83 and the reference drug amphotericin B showing the percentage of annexin-V and propidium iodide (PI)-positive cells. The results represent the means ± S.E.M. of three experiments performed in triplicate. ([a]) $P < 0.05$ vs. control; ([b]) $P < 0.01$ vs. control; ([c]) $P < 0.001$ vs. control.

	Leishmania intracellular entities (% of cells)		
	Annexin	Annexin/PI	PI
Control	8.3	12.05	2.6
SB-200 1x IC_{50}	4.8	9.06	6.1[a]
SB-200 2x IC_{50}	5.6	27.3[b]	22.7[c]
SB-200 4x IC_{50}	4.3	27.1[b]	53.2[c]
SB-44 1x IC_{50}	4.07	11.6	12.1[a]
SB-44 2x IC_{50}	3.5	15.6	31.6[c]
SB-44 4x IC_{50}	4.06	25.2[b]	54.9[c]
SB-83 1x IC_{50}	7.1	12.5	3.5
SB-83 2x IC_{50}	5.2	28.5[b]	21.7[c]
SB-83 4x IC_{50}	5.03	27.2[b]	51.9[c]
Amph. B 1x IC_{50}	6	23.8[a]	2.8
Amph. B 2x IC_{50}	10.4	38.8[c]	5.2
Amph. B 4x IC_{50}	10.3	42.2[c]	8.6[a]

we investigated whether the antileishmanial activity was associated with an *in vitro* immunomodulatory action. SB-200 and SB-83 increased the production of TNF-α (Fig. 8A), IL-12 (Fig. 8B) and NO levels (Fig. 8D) in murine macrophages infected with *L. amazonensis* without altering the level of IL-10 (Fig. 8C) after 72 h of treatment. SB-44 did not affect the cytokine or NO levels under the evaluated conditions.

3. Discussion

Synthetic compounds or those derived from medicinal plants have been extensively evaluated for antileishmanial activity due to the urgent need for the discovery of new agents that are more effective and less toxic than the conventional drugs used for the treatment of leishmaniasis [6,18]. Thus, we evaluated the antileishmanial efficacy of ten synthetic 2-amino-thiophene derivatives and their potential mechanisms of action. The thiophenes evaluated in this study were previously synthesized and shown to be promising antifungal [12] and antitumor agents [14]. These thiophenes have an additional advantage over natural compounds because they are synthesized with high purity and may be obtained on a large scale, including an industrial scale. The crystallographic data of compounds SB-200 and SB-83 confirms the chemical structures of the compounds in question and unequivocally provides the stereochemistry of the imine bond (CH = N), in both cases confirming the achievement of the *E* isomer. This information allowed us to obtain docking data with higher reliability and showed that the compounds could be obtained with very high purity (an indispensable condition to obtain single crystals of drugs).

As shown in Table 1, all ten evaluated thiophene derivatives inhibited the growth of *L. amazonensis* promastigotes, with SB-200, SB-44, and SB-83 presenting the highest activity. Studies with other thiophene derivatives also reported the antileishmanial potential of this class of chemical compounds against promastigote forms [19]. The necessity to minimize the use of laboratory animals in pharmacological and toxicological potential assessments of new products has led to the development of alternative *in vitro* methods. Thus, models involving axenic amastigotes are important for the screening of new drugs because the life stages of the parasite responsible for the different clinical manifestations of leishmaniasis must be considered [18]. Similar to the promastigote forms, all of the derivatives showed antileishmanial activity against the axenic amastigote forms. The compounds that showed enhanced antileishmanial activity against the promastigotes and axenic amastigotes (SB-200, SB-44, and SB-83) had in common the presence of an indole moiety ring that might be involved in the increase in antileishmanial activity. These compounds also showed increased antileishmanial activity compared to meglumine antimoniate, which was used as a reference drug. Meglumine antimoniate showed higher antileishmanial activity against axenic amastigotes (IC_{50} of 1017.4 μM) than against promastigotes (IC_{50} of 25740 μM). These differences were also observed in previous studies and might be related to differences in the metabolic machinery and biochemistry of both stages [20,21].

To investigate the safety of 2-amino-thiophene derivatives on mammalian cells, we evaluated possible cytotoxic effects on murine peritoneal macrophages and human red blood cells. Experimental cytotoxic models involving macrophages are ideal for studies on antileishmanial activity because they are the major host cell type parasitized by *Leishmania* spp. [22,23]. All compounds tested in this study were safer for macrophages than the reference drug, as evidenced by the CC_{50} values and selectivity indices. The presence of the indole ring appeared to greatly increase the selectivity indices of SB-200, SB-44, and SB-83, thereby contributing to the safety of these molecules. Other thiophenes that were evaluated for their murine macrophage cytotoxicity also presented

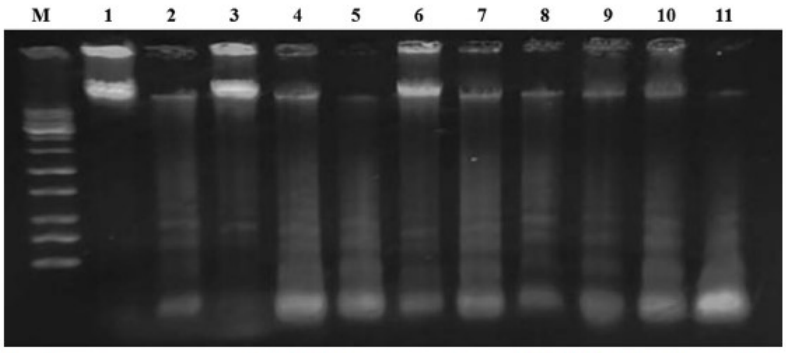


Fig. 5. The genomic DNA of *Leishmania amazonensis* promastigotes treated with different concentrations of SB-83, SB-44, and SB-200 or amphotericin B. The agarose gel (1%) was stained with gel red (1:500), and the analysis was performed under UV light. (M) – molecular marker 1 kb DNA (300–10,000 bp – Axygen); (1) – control; (2) – amphotericin B at a concentration of 1x IC_{50}; SB-200 at concentrations of 1x IC_{50} (3), 2x IC_{50} (4), and 4x IC_{50} (5); SB-44 at concentrations of 1x IC_{50} (6), 2x IC_{50} (7), and 4x IC_{50} (8); SB-83 at concentrations of 1x IC_{50} (9), 2x IC_{50} (10), and 4x IC_{50} (11).

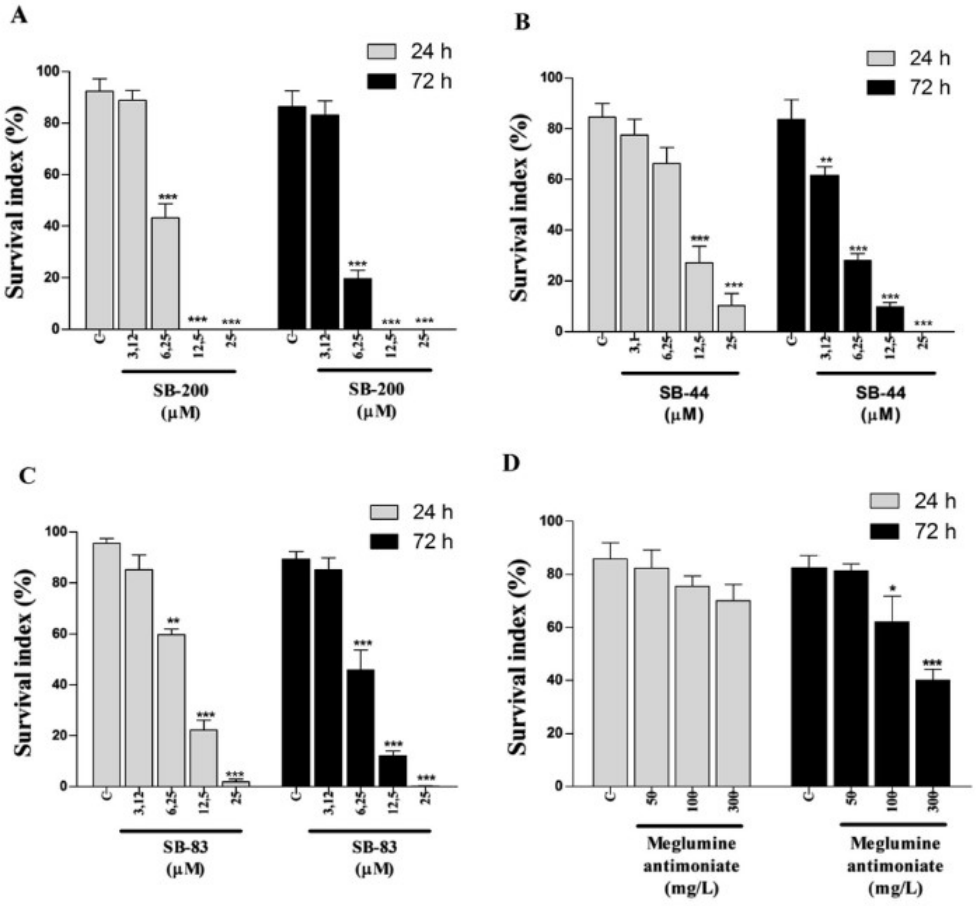


Fig. 6. Effects of SB-44, SB-200, SB-83, and the reference drug meglumine antimoniate on the survival index of amastigotes internalized in macrophages after 24 and 72 h of exposure. Murine macrophages were infected with promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and treated at different concentrations of SB-44 (A), SB-200 (B), SB-83 (C) and meglumine antimoniate (D). The results represent the means ± S.E.M. of three experiments performed in triplicate. (*) $P < 0.05$ vs. control; (**) $P < 0.01$ vs. control; (***) $P < 0.001$ vs. control. C = control.

higher selectivity for the parasite [9]. The selective action against *L. amazonensis* described for the thiophenes analysed in this work was remarkably higher than meglumine antimoniate, which was the first choice drug for leishmaniasis treatment; indeed, meglumine antimoniate presented higher cytotoxicity for the macrophages than for the parasite. The reference drug amphotericin B also exhibited high toxicity to macrophages despite having an antileishmanial activity superior to the evaluated compounds. This result can be compared to the *in vivo* effects of amphotericin B, which has high toxicity and induces many side effects (i.e., nephrotoxicity) despite being a drug of second choice. Therefore, amphotericin B is not an ideal drug [2].

Other cytotoxicity models have been investigated to determine the safety of new compounds with antileishmanial activity [21]. Cytotoxicity evaluations using red blood cells represent an *in vitro* model that is correlated with cell damage *in vivo* based on the injury or formation of pores in the plasma membrane [18]. Thus, the cytotoxicity of 2-amino-thiophene derivatives against human red blood cells was also evaluated. A safety level was demonstrated in these cells because all thiophenes showed a lower percentage of haemolysis (624.8—>800 μM) compared to meglumine antimoniate (429.5 mg/L) and amphotericin B (11.6 μM), which exhibited high toxicity. Other thiophene derivatives were found to be weakly toxic to erythrocytes [24,25], demonstrating the safety of this compound class. Similar to the macrophage cytotoxicity results, the presence of the indolic ring increased the selectivity indices of SB-44, SB-200, and SB-83 against the promastigote and axenic amastigote forms with superior values compared to the reference drugs. The comparison with other studies confirmed the selectivity of thiophenes for parasites of the genus *Leishmania* compared to host cells [9,19]. Moreover, the safety of these molecules may be a strong indication of low toxicity *in vivo* because many studies have reported a correlation between *in vitro* cytotoxicity assays and acute toxicity in animals and humans [26].

Trypanothione reductase (TyrR) is an NADPH-dependent flavoprotein that is present only in protozoan parasites from the genera *Trypanosoma* and *Leishmania*. The absence of TyrR in humans makes it an attractive target for rational drug design targeting leishmaniasis and trypanosomiasis [27]. The trypanothione system is essential for parasite survival because the dithiol trypanothione system is required for the synthesis of DNA precursors, the detoxification of hydroperoxides, and the sequestration/export of thiol

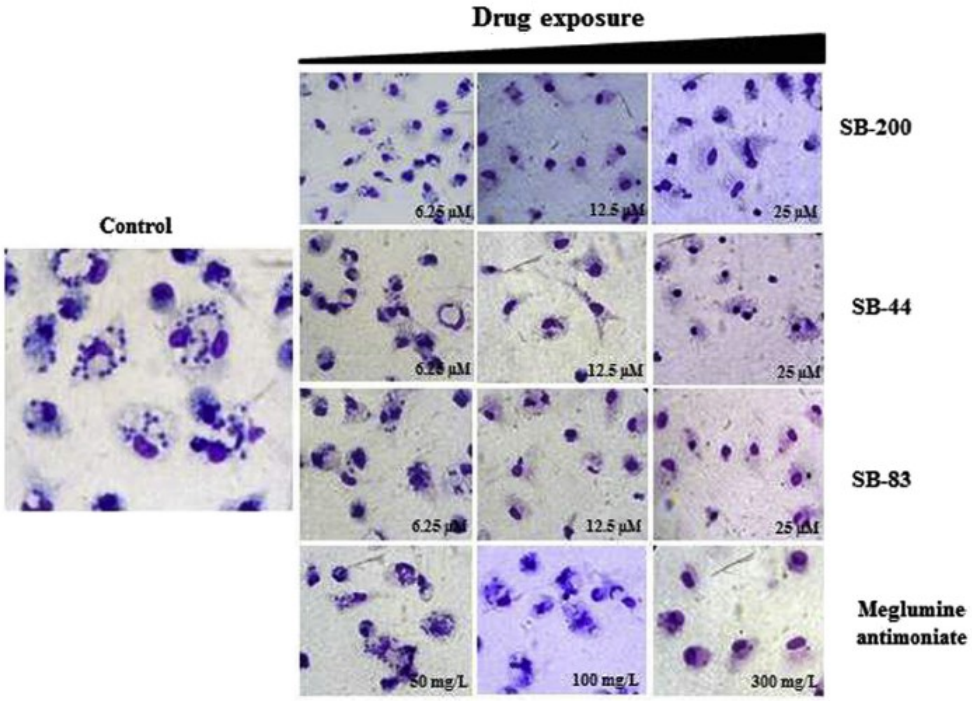


Fig. 7. Optical microscopy images of macrophages infected with promastigotes of *L. amazonensis* and treated with the 2-amino-thiophenes SB-200, SB-44, and SB-83 and the reference drug meglumine antimoniate for 72 h. The slides were observed at 1000x magnification.

conjugates [27–29]. Computational tools are typically used to aid in the development and discovery of new drugs based on the chemical structures and properties of biological targets (enzymes) with the aim of decreasing illness [30].

The enzyme TryR from *L. infantum* (PDB id: 2jk6) is broadly used as a leishmaniasis target in docking studies. In our study, we found that several of our thiophene derivatives had lower E_{dock} values compared to other compounds described in the literature as promising inhibitors of TryR with high affinity. The E_{dock} values found for SB-200, SB-44 and SB-83 (−11.17, −10.29 and −9.81 Kcal/mol, respectively) were smaller than: Taxifolin (−8.82 Kcal/Mol) [28]; a series of various tricyclic and quinone derivatives (between −6.70 and −9.50 Kcal/Mol) [31]; and chromene-2-thione and benzo[*f*]chromene-2-thione analogues (between −6.82 and −9.20 Kcal/Mol) [29]. These results indicate that these thiophene derivatives may be potent inhibitors of TryR. The study of Gundampati and Jagannadham [28], confirmed our docking results and also identified several amino acid residues including the Ser-162 residue as important for ligand binding to the TryR binding pocket. The association between the experimental data (*in vitro* antileishmanial activity of thiophenes; Table 2) with the docking study results (Table 3) shows a high correlation between the results, providing additional evidence that the possible mechanism of action of these molecules may occur through the inhibition of TryR. However, additional biological studies using the enzyme need to be performed to validate this hypothesis. In both studies (experimental and *in silico*), the compounds that showed more pronounced activity (lower IC_{50} and E_{dock} values) were the same: compounds SB-200, SB-44 and SB-83. Likewise, compounds 6CN09, SB63 and SB80 were the seventh, eighth and ninth best ligands in the docking study and in the inhibition of the axenic amastigote forms, respectively.

In the present study, compounds SB-200, SB-44, and SB-83 displayed a better antileishmanial capability and an increased safety level for mammalian cells. Based on these characteristics, we provide the first insights into the mechanism of cell death induced by 2-amino-thiophene derivatives in *L. amazonensis* using the compounds SB-200, SB-44, and SB-83. For this purpose, we initially investigated the apoptotic–necrotic profile using Annexin V-FITC/PI staining. Annexin V is a Ca^{2+}-dependent phospholipid-binding protein that is typically used to investigate the externalization of phosphatidylserine due to a high affinity for this phospholipid. Double-staining with PI, which is a DNA intercalator that only travels through damaged membranes, allows apoptotic cells to be distinguished from necrotic cells [17]. Our results demonstrated that our thiophene derivatives acted through a direct mechanism on promastigote forms that was associated with apoptosis and accompanied by secondary necrotic cell death. The reference drug amphotericin B, which was known to cause cell death by apoptosis in *Leishmania* spp. [32]. and was used in this study as a positive control, showed the same profile. In a qualitative analysis, the DNA fragmentation assay using agarose gel electrophoresis showed that the effect of the compounds SB-200, SB-44, and SB-83 on promastigotes led to fragmentation of the oligonucleosomal DNA, which was similar to the results observed with amphotericin B and confirmed the involvement of apoptosis in the mechanism of action of these substances. Different studies have provided a large number of promising substances that promote antileishmanial activity by inducing apoptosis of the promastigote and amastigote forms of *Leishmania* spp. These mechanisms are mainly related to the externalization of phosphatidylserine, DNA fragmentation, and depolarization of the mitochondrial membrane potential [17].

In addition to direct effects on the parasite, in this study we also

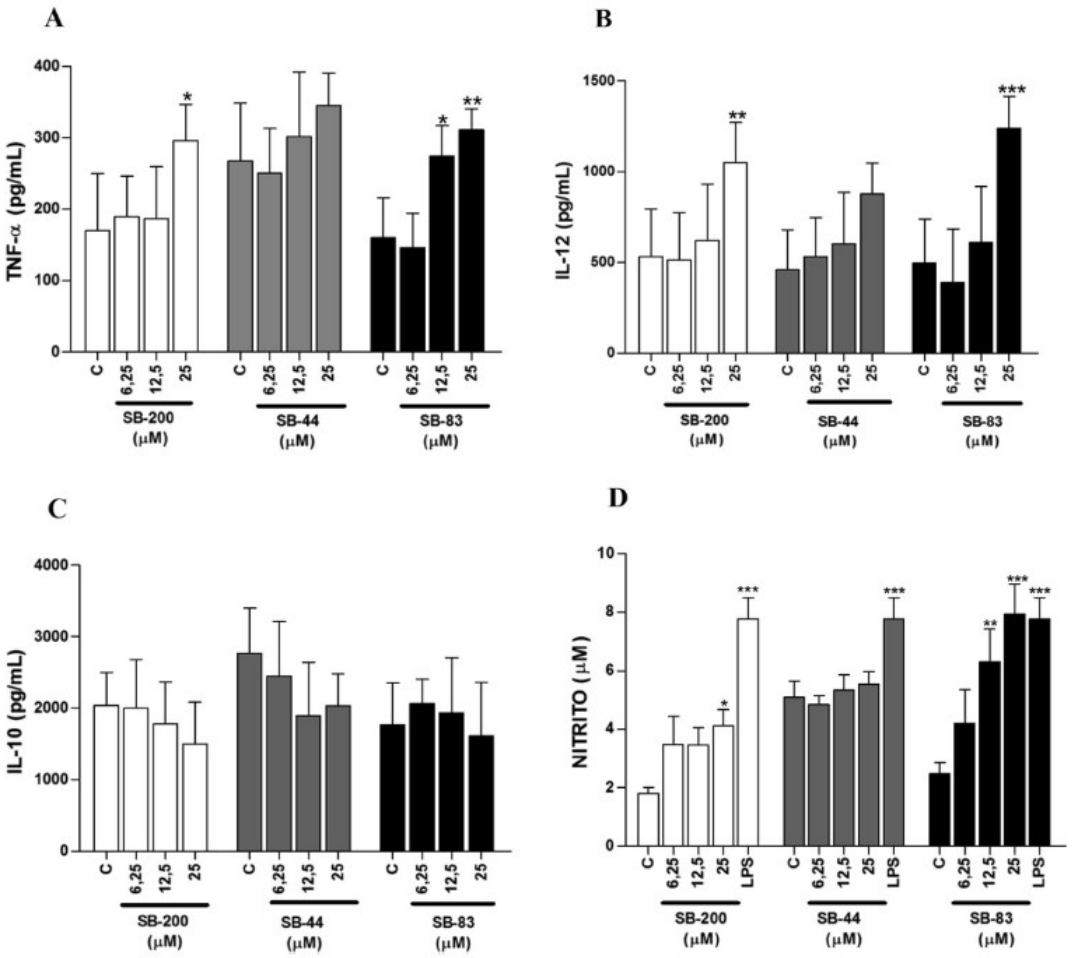


Fig. 8. – Effects of SB-44, SB-200 and SB-83 on cytokine and nitric oxide (NO) production. The cytokines TNF-α (A), IL-12 (B), IL-10 (C) and NO (D) concentrations were measured in the supernatants from cultured macrophages infected with *Leishmania amazonensis* and treated with SB-44, SB-200, and SB-83 for 72 h at 37 °C and 5% CO_2. LPS – Bacterial lipopolysaccharide (10 mg/L). Data are presented as the mean ± S.E.M. of three experiments performed in triplicate. (*) $P < 0.05$ vs. control; (**) $P < 0.01$ vs. control; (***) $P < 0.001$ vs. control.

investigated the effects of the compounds SB-200, SB-44, and SB-83 in a model of *in vitro* infection using murine peritoneal macrophages. We ascertained the potential of these molecules to modulate the immune response of host cells. Experimental models with intracellular amastigotes represent the most effective way to relate antileishmanial activity of a drug *in vitro* to its potential *in vivo* because macrophages are the primary cells parasitized by *Leishmania* spp. in mammalian hosts [33]. The 2-amino-thiophene derivatives SB-200, SB-44, and SB-83 were more effective in treating macrophages infected with *L. amazonensis* than meglumine antimoniate, and they were more sensitive against intramacrophagic amastigotes compared to axenic amastigotes. The difference in antileishmanial activity may be indicative of macrophage activation, which combines their microbicidal power with direct effects previously demonstrated for the three compounds [34].

Macrophages are the main phagocytic cells of the host. They perform their microbicidal functions through structural (phagocytosis, vacuolization, spreading, and increased lysosomal volume) and cellular changes (altered cytokine levels, changes in reactive oxygen species (ROS) and NO profiles, and matrix metalloproteinase secretion) [18]. To investigate the mechanisms by which SB-200, SB 44, and SB-83 diminished the macrophage infection rate, we determined the immunomodulator effect by analysing the production of TNF-α, IL-10, IL-12 and NO by infected macrophages treated with the thiophenes. Our results suggest that the anti-amastigote effect of compounds SB-200 and SB-83 is associated with increased TNF-α, IL-12, and NO; in contrast, SB-44 appears to exert its antileishmanial activity only through a direct parasite killing action. Successful elimination of parasites of the genus *Leishmania* have been reported to be dependent on the stimulation of the immune system by the test drug via activation of host-protective Th1-dominated immune responses with the production of protective cytokines (IFN-γ, TNF-α, and IL-12) [35]. TNF-α is a proinflammatory cytokine produced by many cell types, although it is primarily produced by macrophages. It induces the

activation of different signalling pathways, including MAPK and NF-κB (a major transcription factor that modulates iNOS gene expression and results in the subsequent production of NO) [36]. IL-12 is a proinflammatory cytokine produced by various cells types such as NK cells, polymorphonuclear cells and macrophages that is involved in macrophage activation and the induction of the production of INF-γ, TNF-α and NO [37]. Experimental models of *L. amazonensis* infection of murine macrophages showed that INF-γ and IL-12 were essential for parasite control [38], which was in agreement with our findings. Gomes et al. [39] demonstrated that the involvement of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) activity of *L. amazonensis* in the increase in the parasite's survival was linked to the down-modulation of macrophage production of IL-12, TNF-a and NO but not IL-10. We observed in the present work that the decrease in the infection rate was dependent on NO production. In response to the signal initiated by the activation of protective cytokines, infected cells produced microbicidal molecules such as ROS and NO, which played a crucial role in the elimination of the parasite *in vitro* and *in vivo* [40]. In terms of antileishmanial activity, NO is the principal effector molecule involved in the killing of established intracellular amastigotes [41]. Previous works demonstrated that the control of *L. amazonensis in vitro* and *in vivo* was associated with the combination of NO and the superoxide anion, resulting in production of peroxynitrite ($ONOO^-$), a powerful, highly reactive oxidant that acts as a leishmanicidal. This finding is in contrast to other species such as *Leishmania major*, in which NO acts alone with a high leishmanicidal effect [42].

4. Conclusions

In conclusion, our results reveal that 2-amino-thiophene derivatives exhibit selective antileishmanial activity against both stages of *L. amazonensis* with lower levels of cytotoxicity to host cells. The effects of the selected compounds SB-200, SB-44, and SB-83 against the promastigote forms is associated with apoptosis involving phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation accompanied by secondary necrotic cell death. The three compounds were effective against macrophage infection, and the anti-amastigote activity of SB-200 and SB-83 was associated with the modulation of the host immune response. These results encourage the progression of studies on these compounds for the development of new leishmanicidal agents.

5. Experimental section

5.1. Chemicals

Schneider's medium, the antibiotics penicillin and streptomycin, tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO, 99% purity) thioglycollate medium, sodium dodecyl sulphate (SDS), and Griess reagent (1% sulphanilamide in H_3PO_4 10% (v/v) in Milli-Q water) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). RPMI-1640 medium and foetal bovine serum (FBS) were obtained from Cultilab (São Paulo, SP, Brazil). The chemotherapy drug amphotericin B (Anforicin B®) was obtained from Cristália (São Paulo, SP, Brazil), and meglumine antimoniate (Glucantime®) was purchased from Aventis Pharma (São Paulo, SP, Brazil). The haematological stain kit Panótico Rápido was obtained from Laborclin (Curitiba, PR, Brazil). The sandwich ELISA assay kit and Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) staining kit were obtained from eBioscience™ (San Diego, CA, USA).

5.2. Synthetic chemistry

2-Amino-cycloalkyl[*b*]thiophene-3-carbonitrile derivatives (called simply thiophene derivatives in this work) were synthesized via a two-step reaction. The reaction started with the one pot reaction between malononitrile with a cyclic ketone and elemental sulphur in the presence of morpholine, followed by the Gewald procedure [16]. Treatment of the Gewald adducts with aromatic aldehydes in ethanolic medium and reflux afforded the target compounds 6CN01, 6CN09, 6CN10, SB-63, SB-80, SB-68, SB-81, SB-44, SB-83 and SB-200 according to previous procedures (Scheme 1). All compounds were previously synthesized and described by our group [12,14].

5.3. X-ray crystal structures of SB-83 and SB-200

The crystals of the compounds SB-83 and SB-200 were obtained from ethanol solution using the slow evaporation method at 30 °C under saturating conditions. The obtaining procedures of experimental data, cell refinements, data reduction and resolution of the crystal structure were performed according as described in Franscisco et al. [43] and are briefly described. The experimental data set was obtained using a Bruker Enraf – Nonius Kappa CCD diffractometer. The cell refinements were performed using the software Collect and Scalepack, and the final cell parameters were obtained on all reflections. Data were collected up to 28.2° in θ for SB-83 and up to 27.9° for SB-200, resulting in 15,624 and 15,822 Bragg reflections, respectively. Data reduction was performed using the software Denzo-SMN and Scalepack. Absorption was found to have a significant effect on both compounds (2.517 mm^{-1} for SB-83 and 2.478 mm^{-1} for SB-200); therefore, absorption correction was applied. The structure was solved using the software SHELXS-97 and refined using the software SHELXL-97. The C, N and O atoms were clearly solved and the full matrix least-squares refinement of these atoms with anisotropic thermal parameters was performed. The hydrogen atoms were positioned stereochemically and refined with the riding model, except when they were found to be involved in hydrogen bonds on the electronic density map. The details concerning data collection and structure refinement were prepared using WinGX (version 1.70.01). The ORTEP-3 program was used to prepare the figures. The complete crystallographic data have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center as supplementary publications no. CCDC 1029425 (SB-83) and no. CCDC 1027323 (SB-200). Copies of the data are available upon application to The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk or http://www.ccdc.cam.ac.uk).

5.4. Docking studies

The molecular modelling was performed as described in Scotti et al. [44]. Using the program Hyperchem v. 8.0.3, the chemical structures of the compounds of interest were drawn and their geometry was optimised using the MM + force field. Afterwards, we performed a new geometry optimisation based on the semi-empirical method AM1 (Austin Model 1). The optimised structures were subjected to conformational analyses using the Spartan for Windows 10.0 software. We selected the Monte Carlo search method with 1000 interactions, 100 cycles of optimisation, and 10 conformers with the lowest minimum energy. The dihedrals were evaluated by rotation in accordance with the standard (default) conditions of the program, in which the number of simultaneous variations was 1–8, acyclic chains were subjected to rotations from 60 to 180° and torsion rings were in the range of 30–120°. The conformers with the lowest minimum energy were selected and saved in.sdf format. The docking simulations were performed on

the AutoDock 4.2 software. Receptor and ligand preparation was performed using VEGA ZZ 3.0.1 and MOLEGRO MOLECULAR VIEWER 2.5. Initially, the structures of the ligand and receptor were saved in pqbqt format to be used for docking calculations. PyRx 0.9 software was used to aid the steps of job submission and the analysis of the results. The grid maps that represented the intact ligand in the actual docking trypanothione reductase (TryR) enzyme site were calculated with AutoGrid. The three dimensional grid box was created with a 60 Å grid size (x, y, z) and spacing of 0.300 Å. Each ligand was docked into this grid with the Lamarckian algorithm implemented in AutoDock. The genetic-based algorithm ran 12 simulations per substrate with 2,500,000 energy evaluations and a maximum number of 54,000 generations. The crossover rate was increased to 0.8, the rate of gene mutation was 0.02, and the number of individuals in each population was 200. All other parameters were left at the AutoDock default settings. The results for each calculation were analysed to obtain the affinity energy (Kcal/mol) values for each ligand conformation in its respective complex; probable structure inaccuracies were ignored in the calculations. To verify the number of hydrogen bonds and non-covalent interactions between each ligand conformation and the catalytic residues of the TryR enzyme, the programs PyMOL 1.4 and MOLEGRO MOLECULAR VIEWER 2.5 were employed [44].

5.5. Leishmania culture conditions

Promastigote forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) used in this work were maintained at 26 °C in supplemented Schneider's medium (20% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 mg/L streptomycin). The parasites were maintained as amastigotes *in vivo* in Swiss mice infected in the left hind paw [2]. Extracellular axenic amastigote forms were obtained following the methodology described previously [41]. Promastigote forms in stationary growth phase were differentiated into axenic amastigotes by the combination of a temperature increase (32 °C) and pH decrease (4.6).

5.6. Animals and peritoneal macrophages

Male and female Swiss mice (8–10 weeks old) were obtained from the biotherium section of the Professor Thomas George Animal House (Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil) and maintained under controlled temperature (21 ± 1 °C; relative humidity 60%) and photoperiod (12-h light/dark cycle) conditions with free access to food pellets and water.

5.7. Activity assay against promastigotes and axenic amastigotes of *L. amazonensis*

Inhibition of promastigote growth was assayed as previously described [45]. Briefly, promastigotes (1×10^6 cells) were harvested in the exponential growth phase and incubated in supplemented Schneider's medium in the presence and absence of different concentrations of the 2-amine-thiophene derivatives and the reference drugs meglumine antimoniate and amphotericin B. The cultures were kept for 72 h in a biological oxygen demand (B.O.D.) incubator at 25 °C; then, the effects of each compound were evaluated using a Neubauer haemocytometer. Axenic amastigotes were seeded into 96-well culture plates (1×10^6 per well) in the presence and absence of different concentrations of thiophenes and reference drugs at 32° for 24 h; the viability was evaluated by adding 10 μL of MTT (5 mg/mL). After a 4-h incubation, 10% SDS was added to dissolve the formazan crystals and the absorbance was evaluated using a spectrophotometer (Biosystems model ELx800, Curitiba, PR, Brazil) at 540 nm [18].

5.8. In vitro cytotoxicity on murine macrophages

Murine peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavity of Swiss mice 5 days after elicitation with 1 mL of thioglycollate medium (3% in distilled water) as described previously [46]. Animals were treated according to Resolution number 1000 (2012) of the Federal Council of Veterinary Medicine, Brazil, and all experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Research (CEPA) of the Federal University of Paraíba (process number 0911/14).

Macrophage viability was determined using the MTT test [47]. Approximately 1×10^6 macrophages per well were seeded into 96-well plate plates with supplemented RPMI 1640 medium (10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 mg/L streptomycin) in the presence or absence of thiophenes and reference drugs at 37 °C and 5% CO_2 for 24 h. After incubation, cytotoxicity was determined by adding 10 μL of MTT (5 mg/mL); after 4 h, 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) was added. Finally, readings were performed at 540 nm on a microplate reader.

5.9. Red blood cell lysis assay

The haemolytic activity of thiophenes and the reference drugs was determined using human red blood cells according to the method of Jain et al. [48]. Briefly, 80 μL of a 5% erythrocytes/PBS suspension was mixed with 20 μL of a series of concentrations of thiophenes, meglumine antimoniate, and amphotericin B and incubated at 37 °C for 1 h. From each suspension, 200 μL of phosphate-buffered saline (PBS; 1.5 mM KH_2PO_4, 8.1 mM Na_2HPO_4, 136.9 mM NaCl, and 2.6 mM KCl, pH 7.2) was added to stop the haemolysis process and the sample were centrifuged for 10 min at 1000 × g. Then, the supernatant was collected and haemolysis was measured spectrophotometrically (540 nm). The haemolysis percentage was determined as $[(Abs_{sam} - Abs_{con})/(Abs_{tot} - Abs_{con}) \times 100$, where Abs_{sam} was the absorbance of the samples, Abs_{con} was the absorbance of the blank control (without drugs), and Abs_{tot} was the absorbance of total haemolysis (replacing the samples solution with an equal volume of Milli-Q water).

5.10. Apoptotic-necrotic profiling with annexin V/PI staining

Promastigotes (1×10^6) in the logarithmic growth phase were incubated with or without 1x, 2x, and 4x IC_{50} values of thiophenes SB-200, SB-44, SB-83 and amphotericin B for 4 h, washed three times in cold PBS and re-suspended in binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, and 2.5 mM $CaCl_2$, pH 7.4) according to the manufacturer's protocol. Then, the cells were stained using the FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Stained cells were diluted in Annexin V-binding buffer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Suspended cells were used to perform flow cytometry. Annexin V-FITC/PI-stained cells were analysed using a BD FACSCanto® II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). In total, 30,000 cells were analysed per measurement. The data were analysed using the FlowJo 10.0.7 software (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA) [49].

5.11. DNA fragmentation assay by agarose gel electrophoresis

Qualitative analysis of DNA fragmentation from logarithmic growth-phase *L. amazonensis* promastigotes (untreated or treated with 1x, 2x, and 4x IC_{50} values of SB-200, SB-44, SB-83, and amphotericin B for 24 h) was performed by agarose gel electrophoresis. After exposure to the drugs, cells were subjected to DNA extraction using the chloroform/phenol method as previously

described [2]. Genomic DNA was run on a 2% agarose gel containing the Gel Red Nucleic Acid Gel Stain at a 1:500 dilution (10,000x Biotium®) for 1 h at 100 mV and visualised using a UV trans-illuminator (ImageMaster®).

5.12. Treatment of infected macrophages

Peritoneal macrophages were harvested and plated on round glass coverslips in 24-well culture plates at a density of 1×10^6 cells/mL in supplemented RPMI 1640 medium for 2 h at 34 °C and 5% CO_2 to allow cell adhesion. Then, *L. amazonensis* stationary-phase promastigotes (in a ratio of 10 promastigotes to 1 macrophage) were added to each well. After 3 h of infection at 5% CO_2 and 34 °C, the wells were washed with PBS and new medium was added with different concentrations of SB-200, SB-44, SB-83 or meglumine antimoniate as the reference drug. Plates were incubated for 24 and 72 h; then, the coverslips were removed, fixed, and stained with the Panoptic staining kit. For each coverslip, 300 macrophages were analysed by light microscopy [36].

5.13. Estimation of Th1/Th2 cytokine and nitric oxide (NO) production

The supernatants of infected macrophages treated and untreated with thiophene derivatives were harvested after 24 and 72 h and stored at −20 °C for TNF-α, IL-10, IL-12, and NO production analysis [36]. Cytokine production was analysed by sandwich ELISA assay according to manufacturer's instructions. NO production was estimated from nitrite levels by the Griess reaction. LPS (10 mg/L) was used as a positive control. Cytokine (pg/mL) and NO (μM) concentrations were extrapolated from a standard curve with murine recombinant cytokines and sodium nitrite, respectively. At the end of the experiment, the analysis was performed using a microplate reader at 450 nm (cytokines) and 540 nm (NO).

5.14. Statistical analysis

All assays were performed in triplicate and in 3 independent experiments. One-way ANOVA followed by the Bonferroni test was used to compare differences between groups using a p value < 0.05 as the maximum level of statistical significance. GraphPad Prism® software version 6.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for the statistical analysis. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}), 50% effective concentration (EC_{50}) 50% cytotoxic concentration (CC_{50}), and 50% haemolytic concentration (HC_{50}) values were calculated using the probit regression model (SPSS program, version 13.0, Chicago, IL, USA).

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant number 446274/2014-3 and concession of scholarships to P.L.N.N.) and Coordernação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for concession of scholarships to K.A.F.R.

Conflict of interest

The authors declare they have no conflict of interests for this work.

Author contributions

Conceived, designed and performed the experiments: KAFR, CNSD, PLNN, JCR, MTS, LS, SRM, RCV, IAM, TSLK, TBO, MCAL, TLB, TMA, ROM, FJBMJ, MRO. Analysed the data: KAFR, PLNN, FJBMJ, MRO. Wrote the paper: KAFR, FJBMJ, MRO. All the authors have read, approved and made substantial contributions for the manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Rosângela Gomes Cordeiro for her technical support and José Crispin Duarte for his assistance with the treatment of mice.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.011.

References

[1] J. Alvar, I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, et al., Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, PLoS One 7 (2012) e35671, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671.
[2] P.L.N. Néris, J.P.A. Caldas, Y.K.S. Rodrigues, F.M. Amorim, J.A. Leite, S. Rodrigues-Mascarenhas, et al., Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania (Leishmania) major* associated with immunomodulation *in vitro*, Exp. Parasitol. 135 (2013) 307–313, http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.007.
[3] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R.W. Peeling, et al., Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat. Rev. Microbiol. 5 (2007) 873–882, http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1748.
[4] A.B. Guimarães-Costa, M.T.C. Nascimento, G.S. Froment, R.P.P. Soares, F.N. Morgado, F. Conceição-Silva, et al., *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 6748–6753, http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0900226106.
[5] S.L. Croft, G.H. Coombs, Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs, Trends Parasitol. 19 (2003) 502–508, http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.008.
[6] L.A. Dutra, L. de Almeida, T.G. Passalacqua, J.S. Reis, F. a E. Torres, I. Martinez, et al., Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives, Antimicrob. Agents Chemother. 58 (2014) 4837–4847, http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00052-14.
[7] C.G. Wermuth, Selective optimization of side activities: another way for drug discovery, J. Med. Chem. 47 (2004) 1303–1314, http://dx.doi.org/10.1021/jm030480f.
[8] D. Brown, Unfinished business: target-based drug discovery, Drug Discov. Today 12 (2007) 1007–1012, http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2007.10.017.
[9] H.T. Takahashi, C.R. Novello, T. Ueda-Nakamura, B.P.D. Filho, J.C.P. De Mello, C.V. Nakamura, Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass, Molecules 16 (2011) 3469–3478, http://dx.doi.org/10.3390/molecules16053469.
[10] L. Margl, W. Eisenreich, P. Adam, A. Bacher, M.H. Zenk, Biosynthesis of thiophenes in Tagetes patula, Phytochemistry 58 (2001) 875–881, http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00360-0.
[11] D. Gramec, L.P. Maši, M.S. Dolenc, Bioactivation potential of thiophene containing drugs bioactivation potential of thiophene containing drugs, Chem. Res. Toxicol. 27 (2014) 1344–1348, http://dx.doi.org/10.1021/tx500134g.
[12] F.J.B. Mendonça Junior, R.G. Lima-Neto, T.B. Oliveira, M.C.A. de Lima, I.R. Pitta, S.L. Galdino, et al., Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives, Lat. Am. J. Pharm. 30 (2011) 1492–1499.
[13] A.E.G.E. Amr, M.H. Sherif, M.G. Assy, M.A. Al-Omar, I. Ragab, Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-N- phenylbenzo[b] thiophene-3-carboxamide, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 5935–5942, http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.059.
[14] B.C.C. Souza, T.B. De Oliveira, T.M. Aquino, M.C.A. de Lima, I.R. Pitta, S.L. Galdino, et al., Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis, Acta Pharm. 62 (2012) 221–236, http://dx.doi.org/10.2478/v10007-012-0017-y.
[15] B. Lima, M.B. Agüero, J. Zygadlo, A. Tapia, C. Solis, A.R. de Arias, et al., Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*, J. Chil. Chem. Soc. 54 (2009) 68–72, http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072009000100016.
[16] Y. Huang, A. Dömling, The gewald multicomponent reaction, Mol. Divers 15 (2011) 3–33, http://dx.doi.org/10.1007/s11030-010-9229-6.
[17] P. Misra, T. Khaliq, A. Dixit, S. SenGupta, M. Samant, S. Kumari, et al., Antileishmanial activity mediated by apoptosis and structure-based target study of peganine hydrochloride dihydrate: an approach for rational drug design, J. Antimicrob. Chemother. 62 (2008) 998–1002, http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn319.

[18] K.A. da F. Rodrigues, L.V. Amorim, C.N. Dias, D.F.C. Moraes, S.M.P. Carneiro, F.A. de A. Carvalho, *Syzygium cumini* (L.) skeels essential oil and its major constituent α-pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation *in vitro*, J. Ethnopharmacol. 160 (2015) 32–40, http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.024.

[19] A.O. de Souza, F.P. Hemerly, A.C. Busollo, P.S. Melo, G.M.C. Machado, C.C. Miranda, et al., 3-[4′-bromo-(1,1′-biphenyl)-4-yl]-N, N-dimethyl-3-(2-thienyl)-2-propen-1-amine: synthesis, cytotoxicity, and leishmanicidal, trypanocidal and antimycobacterial activities, J. Antimicrob. Chemother. 50 (2002) 629–637, http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkf188.

[20] N. Gupta, N. Goyal, A.K. Rastogi, In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*, Trends Parasitol. 17 (2001) 150–153, http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01811-0.

[21] D.G. Valadares, M.C. Duarte, J.S. Oliveira, M.A. Chávez-Fumagalli, V.T. Martins, L.E. Costa, et al., Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species, Parasitol. Int. 60 (2011) 357–363, http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.001.

[22] P. Tripathi, V. Singh, S. Naik, Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 51 (2007) 229–242, http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00311.x.

[23] S. Kamhawi, Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends Parasitol. 22 (2006) 439–445, http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.012.

[24] H.T. Takahashi, E.A. Britta, R. Longhini, T. Ueda-Nakamura, J.C. Palazzo De Mello, C.V. Nakamura, Antileishmanial activity of 5-methyl-2,2′:5′,2′-terthiophene isolated from porophyllum ruderale is related to mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*, Planta Med. 79 (2013) 330–333, http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1328258.

[25] M. Noreen, N. Rasool, Y. Gull, F. ul H. Nasim, A.F. Zahoor, A. Yaqoob, et al., A facile synthesis of new 5-aryl-thiophenes bearing sulfonamide moiety via Pd(0)-catalyzed Suzuki-Miyaura cross coupling reactions and 5-bromothiophene-2-acetamide: as potent urease inhibitor, antibacterial agent and hemolytically active compounds, J. Saudi Chem. Soc. (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2014.04.007.

[26] S.M. Evans, A. Casartelli, E. Herreros, D.T. Minnick, C. Day, E. George, et al., Development of a high throughput *in vitro* toxicity screen predictive of high acute in vivo toxic potential, Toxicol. Vitr. (2001) 579–584, http://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00064-9.

[27] J.C. Villalobos-Rocha, L. Sánchez-Torres, B. Nogueda-Torres, A. Segura-Cabrera, C.A. García-Pérez, V. Bocanegra-García, et al., Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-leishmanial activity by quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives, Parasitol. Res. 113 (2014) 2027–2035, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-3850-8.

[28] R.K. Gundampati, M.V. Jagannadham, Molecular docking based inhibition of Trypanothione reductase activity by Taxifolin novel target for antileishmanial activity, J. Appl. Pharm. Sci. 2 (2012) 133–136, http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2012.21026.

[29] R.K. Verma, V.K. Prajapati, G.K. Verma, D. Chakraborty, S. Sundar, M. Rai, et al., Molecular docking and *in vitro* antileishmanial evaluation of chromene-2-thione analogues, ACS Med. Chem. Lett. 3 (2012) 243–247, http://dx.doi.org/10.1021/ml200280r.

[30] L. Scotti, H. Ishiki, F.J.B. Mendonca, M.S. Da Silva, M.T. Scotti, In-silico analyses of natural products on *Leishmania* enzyme targets, Mini Rev. Med. Chem. 15 (2015) 253–269.

[31] S.K. Venkatesan, A.K. Shukla, V.K. Dubey, Molecular docking studies of selected tricyclic and quinone derivatives on trypanothione reductase of *Leishmania infantum*, J. Comput. Chem. 31 (2010) 2463–2475, http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21538.

[32] C. Paris, P.M. Loiseau, C. Bories, J. Bréard, Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes, Antimicrob. Agents Chemother. 48 (2004) 852–859, http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.3.852-859.2004.

[33] D.G. Russell, P. Talamas-Rohana, *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience, Immunol. Today 10 (1989) 328–333, http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(89)90188-6.

[34] H. Kolodziej, A.F. Kiderlen, Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells, Phytochemistry (2005), http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.01.011.

[35] S. Gupta, V. Yardley, P. Vishwakarma, R. Shivahare, B. Sharma, D. Launay, et al., Nitroimidazo-oxazole compound DNDI-VL-2098: an orally effective preclinical drug candidate for the treatment of visceral leishmaniasis, J. Antimicrob. Chemother. 70 (2014) 518–527, http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku422.

[36] F.M. Amorim, Y.K.S. Rodrigues, T.P. Barbosa, P.L.N. Néris, J.P.A. Caldas, S.C.O. Sousa, et al., Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide, Parasitology (2012) 1–10, http://dx.doi.org/10.1017/S0031182012001291.

[37] A. Gumy, J.A. Louis, P. Launois, The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds, Int, J. Parasitol. 34 (2004) 433–444, http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.11.021.

[38] P.L. Jacob, J.A. Leite, A.K.A. Alves, Y.K.S. Rodrigues, F.M. Amorim, P.L.N. Néris, et al., Immunomodulatory activity of ouabain in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected Swiss mice, Parasitol. Res. 112 (2013) 1313–1321, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3146-9.

[39] R.S. Gomes, L.C.F. de Carvalho, R. de Souza Vasconcellos, J.L.R. Fietto, L.C.C. Afonso, E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation, Microbes Infect. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2014.12.009.

[40] L.P. Carvalho, S. Passos, A. Schriefer, E.M. Carvalho, Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis, Front. Immunol. 3 (2012), http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00301.

[41] T. Ueda-Nakamura, R.R. Mendonça-Filho, J.A. Morgado-Díaz, P. Korehisa Maza, B. Prado Dias Filho, D. Aparício Garcia Cortez, et al., Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*, Parasitol. Int. 55 (2006) 99–105, http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2005.10.006.

[42] M.F. Horta, B.P. Mendes, E.H. Roma, F.S.M. Noronha, J.P. MacDo, L.S. Oliveira, et al., Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis, J. Parasitol. Res. 2012 (2012), http://dx.doi.org/10.1155/2012/203818.

[43] A.I. Franscisco, G. de Q. Silveira, J.A.L.C. Resende, T.L. Balliano, V.R.S. Malta, A.V. Pinto, 1,2-Dihydr-oxy-2-(3-methyl-but-2-en-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-1H-indene-1-carboxylic acid monohydrate, Acta Crystallogr. Sect. E. Struct. Rep. Online 66 (2010) o341, http://dx.doi.org/10.1107/S1600536810000516.

[44] L. Scotti, E. Lima, M. da Silva, H. Ishiki, I. Oliveira Lima, F. Oliveira Pereira, et al., Docking and PLS studies on a set of thiophenes RNA polymerase inhibitors against *Staphylococcus aureus*, Curr. Top. Med. Chem. 14 (2013) 64–80, http://dx.doi.org/10.2174/1568026613666131113151347.

[45] T.P. Barbosa, S.C.O. Sousa, F.M. Amorim, Y.K.S. Rodrigues, P.A.C. De Assis, J.P.A. Caldas, et al., Design, synthesis and antileishmanial *in vitro* activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach, Bioorg. Med. Chem. 19 (2011) 4250–4256, http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.05.055.

[46] M.R. Oliveira, W.L. Tafuri, L.C.C. Afonso, M.A.P. Oliveira, J.R. Nicoli, E.C. Vieira, et al., Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions, Parasitology 131 (2005) 477–488, http://dx.doi.org/10.1017/S0031182005008073.

[47] F.P.L. Silva, P.A.C. De Assis, C.G.L. Junior, N.G. De Andrade, S.M.D. Da Cunha, M.R. Oliveira, et al., Synthesis, evaluation against *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity assays in macrophages of sixteen new congeners Morita-Baylis-Hillman adducts, Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 4295–4301, http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.06.036.

[48] K. Jain, A.K. Verma, P.R. Mishra, N.K. Jain, Surface engineered dendrimeric nanoconjugates for macrophage targeted delivery of amphotericin b: formulation development, *in vitro* and *in vivo* evaluation, Antimicrob. Agents Chemother. (2015), http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04213-14. AAC.04213–14.

[49] F.A. Marinho, K.C.S. Gonçalves, S.S.C. Oliveira, D.S. Gonçalves, F.P. Matteoli, S.H. Seabra, et al., The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in *Leishmania amazonensis* promastigotes,, PLoS One 9 (2014), http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087659.

APÊNDICE E

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Pharmaceutical Design, 2016, *22*, 5196-5203

REVIEW ARTICLE

Structure- and Ligand-Based Approaches to Evaluate Aporphynic Alkaloids from Annonaceae as Multi-Target Agent Against *Leishmania donovani*

Vitor Prates Lorenzo[1,2], Ana Silvia Suassuna Carneiro Lúcio[2], Luciana Scotti[2], Josean Fechine Tavares[2], José Maria Barbosa Filho[2], Tatjana Keesen de Souza Lima[2], Juliana da Câmara Rocha[2] and Marcus Tullius Scotti[2,*]

[1]*Chemistry Departament, Federal Institute of Sertão Pernambucano, Petrolina, Brazil;* [2]*Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*



Vitor Prates Lorenzo

ARTICLE HISTORY

Received: March 10, 2016
Accepted: May 12, 2016

DOI: 10.2174/1381612822666160513144853

Abstract: ***Background:*** Leishmaniasis is a neglected disease that affects 15 million people around the world. Many limitations are associated to the treatment as high cost and toxicity. Several classes of natural substances with proven leishmanicidal activity were reported in the literature. Phytochemsitry study of *Anaxagorea dolichocarpa* (Annonacea) reported the isolation of aporphine alkaloids.

Methods: In this study, we evaluate the potential activity of the azaphenanthrene alkaloids eupolaramine, imbiline 1, imbiline 4, sampangine, 3-metoxisampangine and 4-metoxisampangine, isolated from *A. dolichocarpa*, together with a homemade databank of 142 aporphynic alkaloids isolated from Annonaceae, through ligand-based and structure-based virtual screening (VS) against *Leishmania donovani*. A diverse set selected from CHEMBL databank of 1397 structures, with tested antileishmanial activity against promastigote *L. donovani*, were classified according pIC_{50} values in order to generate and validate Random Forest model that show higher statistical indices values. The structure of six different *L. donovani* enzymes were downloaded from PDB databank and alkaloids structures were submitted to molecular docking.

Results: From the six azaphenanthrene alkaloids, sampangine, 3-methoxy, and 4-methoxy were indicated as potential actives by the RF model. Docking results gave similar values for all six azaphenanthrene alkaloids. So, we performed *in vitro* tests with sampangine, imbiline 1, imbiline 4, and eupolaramine, which are available in our laboratory, and that show significant values of pIC_{50} (> 5.26).

Conclusion: Combined approach of VS allowed us to select that aporphynic alkaloid xyloguyelline as potential multitarget compound for leishmanial treatment, presenting activity against five strategic enzymes to treatment with probability of activity over 60% by RF model.

Keywords: Alkaloids, *Anaxagorea dolichocarpa*, Virtual Screening, Molecular Docking, Random Forest, *Leishmania donovani*, antileishmania activity.

1. INTRODUCTION

Parasites of the genus Leishmania are trypanosomatid protozoa that cause the neglected disease known as leishmaniasis, a tropical disease considered by the World Health Organization (WHO) as the second most important protozoal public disease, with extensive morbidity and mortality in most developing countries, infecting 15 million people around the world. These protozoan parasites cause a number of important human diseases, including cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis [1-4].

The treatment of leishmaniasis still remains based on the use of pentavalent antimony salts, sodium stibogluconate and meglumine antimoniate, as first-line drugs, or the use of amphotericin B and pentamidine (also formulated as liposomes) as second-line drugs, which often present high toxicity and severe side effects, and require long-term management, complicating the conclusion of treatment [5]. The pain associated with these types of medications at the injection site also affects the conclusion of the treatment, and in some cases liver and kidney failure are observed [4].

*Address correspondence to this author at the Department of Engineering, and the Environment, Federal University of Paraíba, 58051-970, Rio Tinto, Brazil; Tel/Fax: 55-83-99869-0415; E-mail: mtscotti@gmail.com

Even with many limitations regarding their use, such as (i) high cost, (ii) difficulty of administration, (iii) toxicity, and (iv) the development of resistance by parasite strains, there are not enough advances in the replacement of these drugs. Undoubtedly, these limitations represent obstacles for successful therapy, emphasizing the need to develop new drugs for the treatment of leishmaniasis [6-8]. Thus, the search for new and more effective chemotherapeutic agents against leishmaniasis with fewer or no side-effects continues, the rational design of new experimental antileishmanial drugs is an important goal [9].

Some diseases are better treated when several targets are achieved [10]. The multitarget drug is a key that can open multiple locks. Research by a multifunctional compound can follow two paths: comprehensive experimental analyses or initial use of a rational drug design aided by computer for a first screening and identification of potential targets, optimizing research and avoiding higher expenses [11] and aiding in the development of a single molecule able to interact with more than one target, called multitarget drugs. Models to predict the probability of biological activity with the multitarget approach are reported in the literature against different diseases such as Alzheimer [12], antiparasitic [13], anticancer [14], trypanossomal, and leishmanial [15].

1873-4286/16 $58.00+.00 © 2016 Bentham Science Publishers

Current Pharmaceutical Design

The literature describes several classes of natural substances with proven leishmanicidal activity in *in vitro* assays on promastigote and/or amastigote forms of Leishmania, such as: terpenes [16,17], chalcones [18], acetogenins [19], alkaloids [20], diterpeneacids [21], quinones, and phenolic derivatives [22].

Anaxagorea dolichocarpa is a species of the family Annonacea, belonging to the genus *Anaxagorea*, which includes about 26 species distributed in North, Central, and South America [23]. Among the known species, only five (*A. dolichocarpa*, *A. brevipes*, *A. luzonensis*, *A.* clavata, and A. *prinoides*) have been studied phytochemically, from which lignoids [24], xanthones [25], flavonoids [26], and alkaloids [27] were isolated. *Anaxagorea dolichocarpa* shows a wide geographical distribution, occurring from Costa Rica to Bolivia and in Brazil. It always grows in humid forests. Previous work with this species reported the isolation of the aporphine alkaloids anaxagoreine and asimilobine, the composition of the fruit's essential oil [28] and an antimicrobial activity test against *Staphylococcus aureus* [29].

In this study, we evaluate the activity of the alkaloids eupolaramine, imbiline 1, imbiline 4, and sampangine against *Leishmania donovani* and evaluate them through a ligand-based virtual screening using molecular descriptors and machine learning and molecular docking, with two alkaloids, 3-metoxisampangine and 4-metoxisampangine, also isolated from *Anaxagorea dolichocarpa* and a homemade databank of aporphynic alkaloids.

2. REVIEW OF THE STATE-OF-ART IN STRUCTURE AND LIGAND-BASED APPROACHES

Computer-aided drug design (CADD) is usually divided into structure- and ligand-based methods. Combination of structure-based (SB) and ligand-based (LB) approach is a good way to identify lead compounds in drug discovery process [30-34], working as a rational tool for investigation of novel hits. Integration of independent methodologies can enhance strengths and reduce the drawbacks of each individual method, resulting in a more successful CADD [35].

Likewise, SB and LB methods are widely used today to study various important medicinal and biomedical problems as cancer [36], malaria [37], angiogenesis [38].

Gozalbes *et al.* [36] used a combination of *in silico* techniques and experimental methods to identify new potential inhibitors against heparanase, a key enzyme involved in the dissemination of metastatic cancer cells. A databank of 27 known heparanase inhibitors as well as a commercial collection of drugs was applied to virtual screening. Results from docking and a phamacophore model were combined to rank compounds according their theoretical binding affinity. Three of the selected drug were found to bind to the active site, and some of selected compounds displayed binding affinities in the micromolar range.

Novel *Plasmodium falciparum* enoyl-ACP reductase as antimalarial were reported for Neves *et al.* [37], applying ligand- and structural approaches. The information provided by the combination of ligand- and structure based approaches, guided to structural modifications. Three compounds were resulted from the study with submicromolar range were selected and important chemical information was obtained.

Vascular endothelial growth factor receptor-2, (VEGFR-2), is a key element in angiogenesis. In this study developed by Ragno *et al.* [38], 3-D quantitative structure-activity relationship (3-D QSAR) were used to build a quantitative screening and pharmacophore model of the VEGFR-2 receptors for design of inhibitors with improved activities. The present study is the first generation of a wide-ranging computational medicinal chemistry application on VEGFR2 inhibitors.

Coi and Bianucci [39] used four 3D theoretical models, representing different conformation states of hERG K^+ channel, were built in order to simulate the channel when ligands are interacting with it, and the molecular docking was carried out using each one of the four models. A dataset of 59 compounds collected from literature with availability IC_{50} values was used in order to investigate ligands endowed of blocking activity and allow authors to get insights into the binding modes. Hydrophobic interactions were highlighted as one of the most important driving forces for the affinity of ligands.

SIRT1 is a deacetylase involved in various important metabolic pathways. Combined ligand-based, using pharmacophore model, and structure-based, molecular doking using protein structure from homology, was utilized for Vyas *et al.* [40], for identification of SIRT1 activators. Combination of methodologies identified active hits which may be good lead compounds to develop novel SIRT1 activators.

Wong *et al.* [41] used ligand- and structure-based virtual screening methods to combine multiple-target therapy with systems biology. The authors identified 28 significant proteins and ranked by summing their carcinogenesis relevance values. Then docking and pharmacophore modeling to do virtual-screening was performed. The first approach, authors identified the top 20 drugs for the 28 cancer proteins, and docking poses were analyzed to further interaction investigation. After screening for duplicates, 13 of these drugs could target 11 proteins simultaneously. In the second approach, 5 top proteins with highest carcinogenesis relevance values were used as target. These results could ability scientists to investigate combination of these drugs for multiple-target therapy for cancer. The authors conclude the paper believing that this will enhance the efficiency of therapeutic practice and lead new directions for cancer therapy.

Martiny *et al.* [42] developed an original *in silico* approach for the prediction of Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6), an enzyme responsible for metabolize about 30% of drugs. Combination of the knowledge of the protein structure and its molecular dynamic behavior in response to the binding of various ligands, and machine learning, were used to build the computational study. As result, three molecular dynamic-derived structures were identified as capable all together to better retrieve the active compounds compared with individual CYP2D6 conformation. Additionally, inhibition models based on classical molecular descriptors and predicted binding energies were able to predict CYP2D6 inhibition with an accuracy of 78% on the training set and 75% on the external validation set.

Prathipati and Mizuguchi [43] employed an integrated approach and developed a rapid protocol for binding mode and affinity predictions to three protein targets: Factor Xa, Spleen Tyrosine Kinase and tRNA (guanine-N(1))-methyl-transferase. Docking and workflow incorporates compound clustering and ligand and protein structure based pharmacophore modeling, followed by local docking, minimization, and scoring. Resulting poses were compared with cocrystallized structures, and predicted poses were related to the experimentally determined structures with a mean root-mean-square deviation value of 3.4 Å.

Pala *et al.* [44] conducted anticancer study utilizing a set of commercially available compounds aiming select EPH receptor A2 (EPHA2) antagonists through shape-similarity and docking calculations combination. A combined score, taking into account both ligand- and structure-based results, was then used to identify the most promising candidates. Two compounds, selected among the best-ranked ones, were identified as EPHA2 receptor antagonists with micromolar affinity.

Some studies were discussed in order to expose the importance of combine structure- and -ligand-based approaches in CADD. Corroborating, the reduction of costs in terms of time, animal sacrifice, and material resources with computational methods, contribute to make *in silico* methods become a promising goal in medicinal,

biological, physical and organic chemistry [45]. However, limitations are present, the development of methodologies and computational power direct to a popularization, contributing, as well as other methods, to drug discovery process.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Chemical

The dried and pulverized root (1,500 g) was subjected to maceration with 95% EtOH (3 × 5 L) for 72 h at room temperature. The EtOH solution was concentrated under vacuum, yielding 35 g of crude EtOH extract (CEE). The EtOH partitioned in the filter column using hexane (3 L), chloroform (1,5 L), and methanol (1,5 L). A fraction 3:7 (hexane:chloroform) weighing 1.0 g was subjected to column chromatography over silica gel using hexane, chloroform, and methanol, either pure or in binary mixtures. The fractions were obtained, analyzed by analytical thin layer chromatography (TLC), and purified using silica gel preparative TLC. Through this methodology, azaphenanthrene alkaloids: eupolauramine, sampangine, imbiline 1, imbiline 3, 3-methoxysampangine, and 4-methoxysampangine were isolated. The alkaloids were elucidated through ^{1}H NMR and ^{13}C 1-D and 2-D NMR.

3.2. Biological Activity

The parasite *Leishmania (Leishmania) donovani* (MHOM/ET/1967/HU3) in promastigote form was cultivated in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 20% bovine fetal serum, 1% male human urine, and antibiotics (penicillin 200 U/mL and streptomycin 0.1 mg/mL) (Gibco, CA) kept incubated in an biological oxygen demand (B.O.D.) incubator at 26 °C.

The colorimetric assay agent MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) is based on the dehydrogenase activity of cytosolic and mitochondrial enzymes that are able to reduce MTT (yellow coloration) and form a blue product, insoluble in water, a formazan salt. The MTT assay was used to evaluate the activity of Leishmania alkaloids eupolauramina, sampangina, imbiline 1, and 3, with determination of cell viability by calculating the IC_{50}.

In a 96-well plate was added 100 µL supplemented Schneider medium and about 1×10^{6} promastigotes/well of *L. donovani*. Subsequently, they were added to triplicate test substances previously diluted in supplemented Schneider medium to a final volume of 100 µL in each well at concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 6.25, and 3.125 µg/mL of each compound previously diluted in half with Schneider dimethyl sulfoxide (DMSO).

Then, the plate was incubated for 72 h in a B.O.D. oven at 26 °C. At the end of incubation, 10 µL of MTT diluted in PBS was added to a final concentration of 5 mg/mL. They were incubated for another 4 h in a B.O.D. greenhouse at 26 °C, and then 50 µL 10% SDS (sodium dodecylsulfate) (Vetec®) was added. The plate was left overnight for dissolution of the formazan, and finally the absorbance of each well was read using a spectrophotometer (Spectramax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 570 nm.

The negative control was performed in Schneider medium supplemented with 0.2% DMSO. The positive control was performed in the presence of amphotericin B as the reference drug. Assays were performed in triplicate and repeated three times on different days.

3.3. Dataset

From the ChEMBL database, we selected a diverse set of 1397 structures (https://www.ebi.ac.uk/chembl/), which had been screened (*in vitro*) to inhibit the promastigote *L. donovani*. The compounds were classified using values of $-\log IC_{50}$ (mol/L) = pIC_{50}, which led us to assign 776 actives ($pIC_{50} \geq 4.6$) and 438 inactives ($pIC_{50} \leq 4.3$). We used a border in the pIC_{50} values looking for better prediction results. In this case, IC_{50} represented the concentration required for 50% inhibition of promastigote *L. donovani*. The compounds with pIC_{50} values between 4.3 and 4.6 were excluded to minimize the border effect and improve the discriminant power of the generated models.

The dataset that includes sampangine, 3-metoxisampangine, 4-metoxisampangine, eupolauramine, imbiline 1, imbiline 3, and databank of 142 aporphynic alkaloids present in Annonaceae to build in our databank. For all structures, SMILES codes were used as input data to Marvin 14.9.1.0, 2014, ChemAxon (http://www.chemaxon.com). We used Standardizer software [JChem 14.9.1.0, 2014; ChemAxon (http://www.chemaxon.com)] to canonize structures, add hydrogens, perform aromatic form conversions, clean the molecular graph in three dimensions, and save compounds in sdf format [46].

3.4. Volsurf Descriptors

Three-dimensional structures (3-D) were used as input data in the Volsurf+ program v. 1.0.7 and were subjected to molecular interaction fields (MIFs) to generate descriptors using the following probes: N1 (amide nitrogen-hydrogen bond donor probe), O (carbonyl oxygen-hydrogen bond acceptor probe), OH2 (water probe), and DRY (hydrophobic probe) [47]. Additional non-MIF-derived descriptors were generated to create a total of 128 descriptors. Volsurf descriptors have been previously used to predict antileishmanial activity of natural products on enzymes and predict activity of alkaloids against human acetylcholinesterase [48,49].

3.5. Models

Knime 2.10.0 software (KNIME 2.10.0 the Konstanz Information Miner Copyright, 2003-2014, (www.knime.org) [50] was used to perform all of the following analyses. The descriptors and class variables were imported from the Volsurf+ program, v. 1.0.7, and the data were divided using the "Partitioning" node with the "stratified sample" option to create a training set and a test set, encompassing 80% and 20% of the compounds, respectively. Although the compounds were selected randomly, the same proportion of active and inactive samples was maintained in both sets. For internal validation, we employed cross-validation using 10 randomly selected, stratified groups, and the distributions according to activity class variables were found to be maintained in all validation groups and in the training set. Descriptors were selected, and a model was generated using the training set and the Random Forest (RF) algorithm [51], using the WEKA nodes [52]. The parameters selected for RF included the following settings: number of trees to build = 1900, seed for random number generator = 1909501934341. The internal and external performances of the selected models were analyzed for sensitivity (true positive rate, *i.e.*, active rate), specificity (true negative rate, *i.e.*, inactive rate), and accuracy (overall predictability). In addition, the sensitivity and specificity of the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve were found to describe the true performance with more clarity and accuracy. The plotted ROC curve shows the true positive (active) rate either versus the false positive rates or versus sensitivity (1: specificity). In a two-class classification, when a variable that is being investigated cannot be distinguished between the two groups (*i.e.*, when there is no difference between the two distributions), the area under the ROC curve equals 0.5, which is to say that the ROC curve will coincide with the diagonal. When there is a perfect separation of values between two groups (*i.e.*, no overlapping of distributions), the area under the ROC curve equals 1, which is to say that the ROC curve will reach the upper left corner of the plot [53].

3.6. Docking

The structure of *L. donovani* enzymes Topoisomerase I (TOPI) [54], *N*-myristoyltransferase (NMT) [55], cyclophilin (Cyp) [56], UMP synthase (UMPS) [57], *O*-acetylserine sulfhydrylase (OASS)

Table 1. Data of the tested enzymes.

Enzyme	PDB ID	Resolution (Å)	Source	Ligand
TOPI	2B9S	2.27	*L. donovani*	----------
NMT	2WUU	1.42	*L. donovani*	2-oxopentadecyl-CoA
Cyp	3EOV	2.60	*L. donovani*	cyclosporin A
UMPS	3QW4	3.00	*L. donovani*	----------
OASS	3SPX	1.79	*L. donovani*	di(hydroxyethyl) ether
MPK3	4O2Z	2.71	*L. donovani*	NVP-BBT594

[58], and mitogen-activated protein kinase 3 (MPK3) [59] downloaded from the Protein Data Bank (pdb) are summarized in Table **1** (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Alkaloid structures were submitted to molecular docking using the Molegro Virtual Docker, v. 6.0.1 (MVD). All of the water molecules were deleted from the enzyme structure, and the enzyme and compound structures were prepared using the same default parameter settings in the same software package. The docking procedure was performed using a GRID of 15 Å in radius and 0.30 Å in resolution to cover the ligand-binding site of the enzyme's structures. The Moldock score algorithm was used as the score function [60]. For NMT, Cyp, OASS, and MPK3, the binding site was the same as the ligand present in the pdb file, but for TOPI and UMPS the potential binding site was automatically selected using the cavity prediction algorithm of MVD.

4. RESULTS AND DISCUSSIONS

The Volsurf (v 1.0.7) program generated 128 descriptors that, together with the dependent variables (binary classification) that described whether the compounds were active (A) or inactive (I), were used as input data in the Knime program (v. 2.10.0) to generate the RF model. For all 1277 compounds that comprised the training data sets, the generation of all 128 descriptors by Volsurf+ was rapid, taking approximately 25 minutes using a computer with an i7 processor, running at 2.6 GHz, and equipped with 8 GB of RAM.

Table **2** summarizes the statistical indices of the RF model for the training, cross-validation, and test sets. For the training set, the learning machine program gave the same hit rates for the inactive compounds and active compounds, which were 100%. However, for the cross-validation and test sets, the RF model was better at predicting the active compounds; therefore, the specificity (true negative rate) was lower for the cross-validation and test sets (71.6% and 76.2%, respectively) than the sensitivity (true positive rate), which was measured to be 88.3% and 85.8%, respectively (Table **2**). The ROC plot that was generated for the test set, which plotted the true positive (active) rate against the false positive rates had an area under the curve (AUC) value of approximately 0.82, which is significantly higher than 0.5 (Fig. **1**). The Matthews Correlation Coefficient (MCC) values for training, cross-validation, and test sets were 0.995, 0.608, and 0.623, respectively. Because an MCC value of 1 represents a perfect prediction, 0 represents random prediction, and -1 represents total disagreement between prediction and observation, the RF model shows significant MCC values.

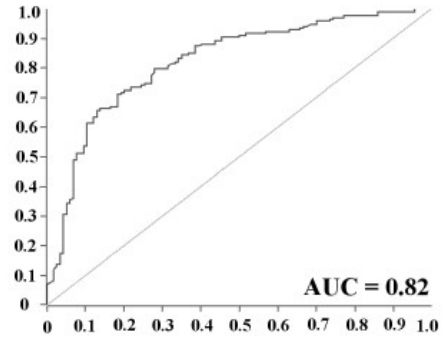


Fig. (1). ROC plot generated by the selected RF model for the test set and value of the area under the curve (AUC).

We evaluated the potential of the azaphenanthrene alkaloids present in *Anaxagorea dolichocarpa* as antileishmanial leads using the RF model and docking on selected *Leishmania* enzyme targets. The results presented in Table **3** indicate that these compounds could show activity. Imbiline 1 and imbiline 4 showed good performance against TOPI and MPK3, eupolaramine presented low energy binding against UMPS, OASS, and MPK3. Against NMT, 3-metoxisampangine and 4-metoxisampangine performed better among the natural alkaloids tested as well as imbiline 4 with OASS (Table **3**).

Table 2. Summary of training, internal cross-validation, test results, and corresponding match results, which were obtained using the RF algorithm on the total set of 1277 compounds (1021 were in the training set and 256 in the test set).

	Training			Validation		Test		
	Samples	Match	%Match	Match	%Match	Samples	Match	%Match
Active	616	616	100	544	88.3	155	133	85.8
Inactive	405	405	100	290	71.6	101	77	76.2
Overall	1021	1021	100	834	81.7	256	210	82.0

Table 3. Moldock score of best position of natural alkaloids in enzyme targets.

	TOPI[a]	NMT[b]	Cyp[c]	UMPS[d]	OASS[e]	MPK3[f]
eupolauramine	-93.00	-91.71	-84.81	-102.85	-104.14	-112.41
imbiline 1	-101.17	-71.09	-83.53	-69.56	-99.18	-94.95
imbiline 3	-105.85	-94.76	-91.72	-86.91	-108.43	-100.71
sampangine	-90.20	-94.71	-85.79	-84.20	-99.16	-90.77
3-methoxysampangine	-96.84	-95.56	-91.90	-86.79	-97.21	-91.98
4-methoxysampangine	-93.72	-97.91	-72.62	-80.72	-101.32	-93.93

[a]Topoisomerase I; [b]*N*-myristoyltransferase; [c]cyclophilin; [d]UMP synthase; [e]*O*-acetylserine sulfhydrylase; [f]mitogen-activated protein kinase 3.

From the six alkaloids, sampangine, 3-methoxy, and 4-methoxy were indicated as potential active structures against promastigote *L. donovani* using the RF mode. Docking results gave similar values for all six azaphenanthrene alkaloids. So, we performed *in vitro* tests with available compounds in our laboratory: sampangine, imbiline 3, imbiline 1, and eupolaramine. The results show significant values of pIC_{50} 5.59, 5.45, 5.32, and 5.26 against promastigote *L. donovani* (MHOM/ET/1967/HU3). Therefore, we evaluated a databank of 142 aporphynic alkaloids present in Annonaceae (Supplementary Material S1) to obtain a qualitative structure-activity relationship using a combined approach of virtual screening, structure-based, and ligand-based, in order to select compounds with potential higher antileishmanial activity.

A computational chemistry multitarget model to predict the results of experimental tests for *Leishmania* with significant success has been reported in the literature [12], so we used our *in silico* results of the alkaloids to select 10% structures that presented lower energy binding (15 compounds) from each enzyme. Looking for multitarget compounds, we selected alkaloids with activity against three or more enzymes, resulting in seven compounds (Fig. **2**). Aporphynic alkaloid **140** (xyloguyelline) presents activity against five enzymes: TOPI, NMT, UMPS, OASS, and MPK3. Two compounds show low Moldock score energies against four different enzymes: **41** (isoboldine) and **69** (O-methylcassyfiline), and another 4: **8** (bracteoline), **16** (corytuberine), **71** ((-)-N-methylduguevanine), and **92** ((+)-nordomesticine) against three enzymes. From these structures, we selected only the compounds that were classified as active in the RF model. Therefore, our methodology was to apply two screening approaches simultaneously: ligand-based screening, using the RF model generated using Volsurf descriptors from the dataset of 1277 compounds and structure-based screening using six enzymes. Fig. (**3**) summarizes the virtual screening methodology. The ligand-based approach of those seven compounds shows four of them as active (probability over 50%) **8**, **41**, **92**, and **140**, corroborating with docking studies. With the exception of **71**, the other two alkaloids, **69** and **16**, present percentages close to the active line, with values of 45.1% and 47.9%, respectively (Table **4**).

The analysis of activity of selected aporphynic alkaloids demonstrates an affinity of this group of alkaloids with the enzymes NMT and MPK3, where only **16** and **71** did not present a good interaction against NMT and MPK3, respectively. Exclusively, **92** and **140** show activity against UMPS. This suggests that this skeleton of alkaloids presents more affinity with NMT and MPK3 than with TOPI, Cyp, OASS, and UMPS (Table **4**).

Fig. (**4**) shows hydrogen-bond interactions between aporphynic alkaloid **140**'s best position in TOPI, NMT, UMPS, OASS, and MPK3. The phenolic hydroxyl plays an important role interacting with the site from all proteins in which **140** is active. The oxygens from 1,3-dioxolane interact with residues of TOPI, UMPS, and OASS, where in UMPS one oxygen atom interacts with three residues (Arg229, Ser228, and Gly230). The aromatic methoxyls, as well as the nitrogen atom, are also important in the binding process.

CONCLUSION

In this study, we have conducted a comparative ligand- and structure-based approach using Molegro Virtual Docking and machine learning RF to determine the antileishmanial potential of six azaphenanthrene and 142 aporphynic alkaloids present in Annonaceae. Four of the natural alkaloids tested presented significant activity *in vitro*. *In silico* study allowed us to suggest that aporphynic alkaloid **140** (xyloguyelline) be tested as a potential multitarget molecule for leishmanial treatment, presenting activity against five strategic enzymes to treatment with probability of activity over 60%.

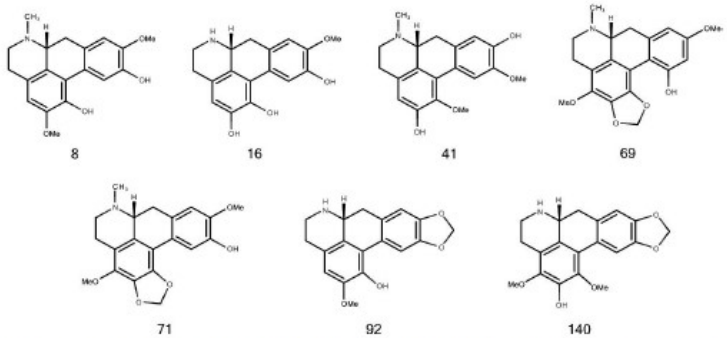


Fig. (2). Structure of aporphynic alkaloids from Annonaceae selected with potential activity against three or more enzymes of *Leishmania donovani*.

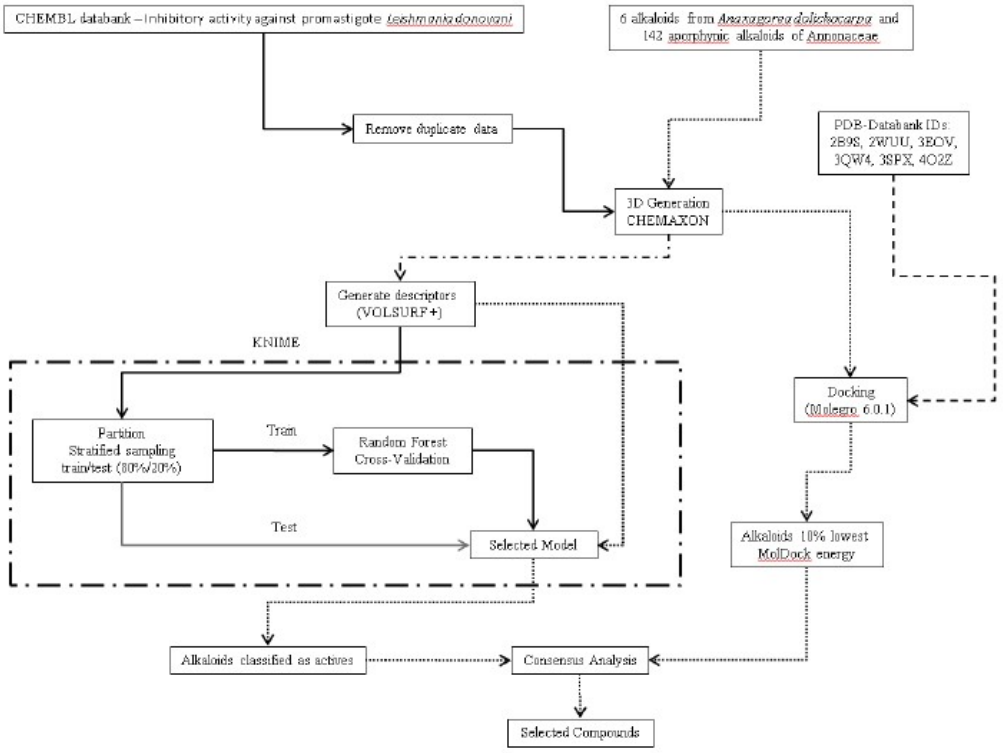


Fig. (3). Virtual-screening methodology used in this study. Solid black lines represent the set of 1277 compounds used to generate the RF model and to validate it (solid gray line-external test set). Black round dotted lines represent the alkaloid derivatives. Black dash-dot line represents both datasets (1277 compounds more 148 alkaloids). The black dash line represents the six enzyme structures from the PDB databank (2B9S, 2WUU, 3EOV, 3QW4, 3SPX, 4O2Z). The dash-dot border delimits the process performed in the KNIME software.

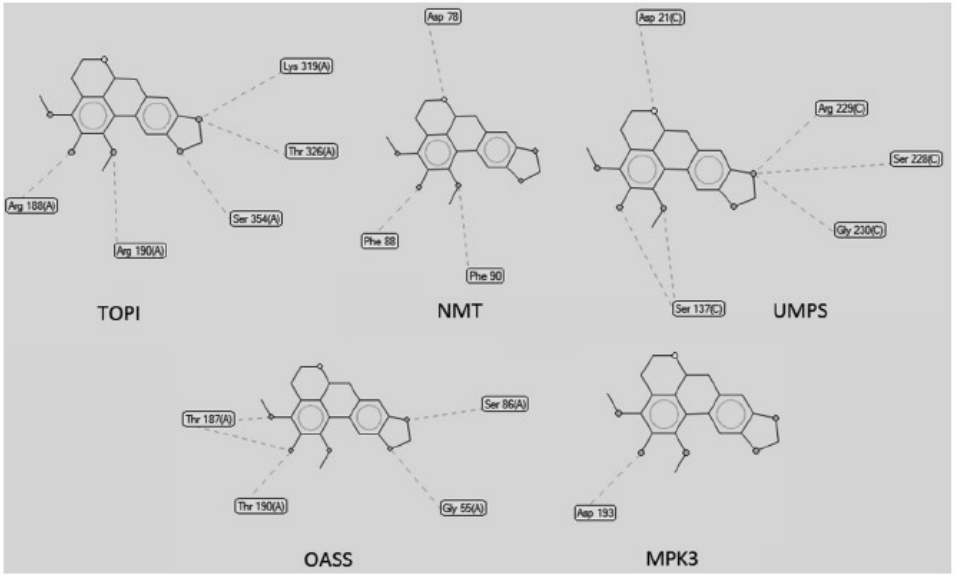


Fig. (4). Lowest-energy dock positions and energies of aporphynic alkaloid **140** with TOPI (-104.15), NMT (-126.47), UMPS (-131.95), OASS (-145.94), and MPK3 (-128.87). Dashed lines represent hydrogen-bond interactions.

Table 4. Activity of aporphynic alkaloids from Annonaceae with best performance in a docking study with each enzyme. P.A. (%) indicates the probability of activity from the ligand-based approach.

ID	TOPI	NMT	Cyp	UMPS	OASS	MPK3	P.A. (%)
8		X	X			X	57.6
16	X		X			X	47.9
41	X	X	X			X	56.3
69	X	X			X	X	45.1
71		X	X		X		39.6
92		X		X		X	55.4
140	X	X		X	X	X	60.2

LIST OF ABBREVIATIONS

AD = Alzheimer's disease

RF = Random Forest

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Brazilian National Research Council (CNPq) for financial support.

REFERENCES

[1] Loría-Cervera EN, Andrade-Narváez FJ. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. Rev Inst Med Trop 2014; 56: 1-11.

[2] Bernal FA, Coy-Barrera E. *In-silico* analyses of sesquiterpene-related compounds on selected Leishmania enzyme-based targets. Molecules 2014; 19: 5550-69.

[3] Teles CBG, Moreira-Dill LS, Silva AA, *et al*. A lupane-triterpene isolated from Combretum leprosum Mart. fruit extracts that interferes with the intracellular development of Leishmania (L.) amazonensis *in vitro*. Complement Alt Med 2015; 15: 165-75.

[4] Paes-Goncalves HP, Facundo VA, Santos DMF, *et al*. The leishmanicidal activity of a cyclopentenedione derivative isolated from the roots of a native Amazonian pepper (Piper carniconnectivum C. DC, Piperaceae). Rev Bras Farmacogn 2012; 22: 1018-23.

[5] Arboleda M, Jaramillo L, Ortiz D, Díaz A. Leishmaniasis cutánea y herpes zoster multidermatómico. Rev Chil Infectol 2013; 30: 680-2.

[6] Jebran A.F, Schleicher U, Steiner R, *et al*. Rapid healing of cutaneous Leishmaniasis by high-frequency electrocauterization and hydrogel wound care with or without DAC N-055: A randomized controlled phase IIa trial in Kabul. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8: 2694.

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

[8] Souza-Silva F, Bourguignon SC, Pereira BAS, *et al*. Epoxy-Lapachone has *in vitro* and *in vivo* anti-Leishmania (Leishmania) amazonensis effects and inhibits serine proteinase activity in this parasite. Antimicrob Agent Chemother 2015; 59: 1910-8.

[9] Chauhan N, Vidyarthi AS, Poddar R. Comparative analysis of different DNA-binding drugs for Leishmaniasis cure: A pharmacoinformatics approach. Chem Biol Drug Des 2012; 80: 54-63.

[10] Bolognesi LM. Multi-target-directed ligands as innovative tools to combat trypanosomatid diseases. Curr Top Med Chem 2011; 11(22): 2824-33.

[11] Lavecchia A, Di Giovanni C. Virtual screening strategies in drug discovery: A critical review. Curr Med Chem 2013; 20(23): 2839-60.

[12] García I, Fall Y, Gómez G, González-Díaz H. First computational chemistry multitarget model for anti-Alzheimer, anti-parasitic, anti-fungi, and anti-bacterial activity of GSK-3 inhibitors *in vitro*, *in vivo*, and in different cellular lines. Mol Divers 2011; 15: 561-7.

[13] Prado-Prado FJ, García-Mera X, González-Díaz H. Multi-target spectral moment QSAR versus ANN for antiparasitic drugs against different parasite species. Bioorg Med Chem 2010; 18: 2225-31.

[14] Speck-Planche A, Kleandrova VV, Luan F, Cordeiro MN. Multi-target drug discovery in anti-cancer therapy: fragment-based approach toward the design of potent and versatile anti-prostate cancer agents. Bioorg Med Chem 2011; 19: 6239-44.

[15] Cavalli A, Bolognesi ML. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against trypanosoma and leishmania. J Med Chem 2009; 52: 7339-59.

[16] Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, *et al*. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected ideases-Part I. Curr Med Chem 2012; 19: 2128-75.

[17] Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, *et al*. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected ideases-Part II. Curr Med Chem 2012; 19: 2176-2228.

[18] Zhai L, Chen M, Blom J, Theander TG, Christensen SB, Kharazmi A. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. J Antimicrob Chemother 1999; 43: 793-803.

[19] Grandic SR, Fourneau C, Laurens A, Bories C, Hocquemiller R, Loiseau PM. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. Biomed Pharmacother 2004; 58: 388-92.

[20] Silva FMA, Koolen HHF, Lima JPS, *et al*. Leishmanicidal activity of fractions rich in aporphine alkaloids from Amazonian Unonopsis species. Rev Bras Farmacogn 2012; 22: 1368-71.

[21] Santos AO, Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Veiga-Júnior VF, Nakamura CV. Antileishmanial activity of diterpeneacids in copaiba oil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108: 59-64.

[22] Bacab MJC, Rodriguez LMP. Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat Prod Rep 2001; 18: 674-88.

[23] Maas PJM, Westra LYT. Studies in Annonaceae II. A monograph of the genus Anaxagorea A. St. Hil. Part 2. Bot Jahrb Syst 1985; 105: 145-204.

[24] Diaz AMP. Neolignans from anaxagorea clavata. Phytochemistry 1997; 44: 345-6.

[25] Gonda R, Takeda T, Akiyama T. Studies on the constituents of Anaxagorea luzonensis A. Gray III. Nat Med 2002; 56: 10-2.

[26] Gonda R, Takeda T, Akiyama T. Studies on the constituents of Anaxagorea luzonensis A. Gray Chem Pharm Bull 2000; 48: 1219-22.

[27] Hocquemiller R, Rasamizafy S, Moretti C, Jacquemin H, Cavé A. Anaxagoreine, a new alkaloid isolated from two species of the genus Anaxagorea. Planta Med 1981; 41: 48-50.

[28] Andrade EHA, Oliveira J, Zoghbi MG. Volatiles of Anaxagorea dolichocarpa Spreng. & Sandw. and Annona densicoma Mart. growing wild in the state of Pará, Brazil. Flavour Frag J 2007; 22: 158-60.

[29] Chiappeta ADA, Mello JF. Higher plants with biological activity: Plants of Pernambuco. Rev Inst Antibiot Univ Fed Pernambuco Recife 1984; 11: 99-111.

APÊNDICE F

NATURAL PRODUCT RESEARCH, 2018
https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1448813

Taylor & Francis

SHORT COMMUNICATION

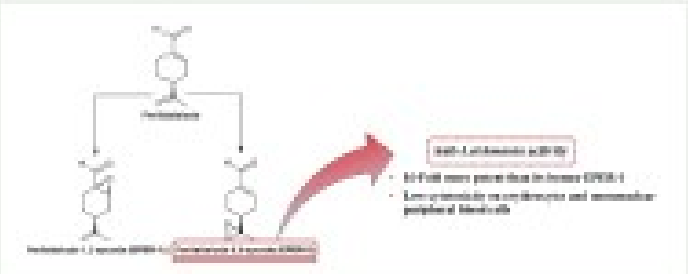
Anti-*Leishmania* and cytotoxic activities of perillaldehyde epoxide synthetic positional isomers

Tatjana Souza Lima Kaseven[a], Larisse Virgolino da Silva[a], Juliana da Câmara Rocha[a], Luciana Nalone Andrade[b], Tamires Cardoso Lima[c] and Damião Pergentino de Sousa[d]

[a]Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; [b]Institute of Technology and Research (ITP), University Tiradentes, Aracaju, Brazil; [c]Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Brazil; [d]Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

ABSTRACT

Leishmaniasis belongs to a complex of zoonotic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is considered a major public health problem. Several essential oil chemical components have inhibitory effect against protozoa, including *Leishmania donovani*. Thus, the aim of this study was to evaluate for the first time the anti-*Leishmania* activity of two *p*-menthane monoterpene isomers (EPER-1: perillaldehyde 1,2-epoxide and EPER-2: perillaldehyde 8,9-epoxide) against *L. donovani* promastigotes as well as evaluating cytotoxic effect on mononuclear peripheral blood cells. Results of anti-*Leishmania* assay revealed that EPER-2 (IC_{50} = 3.8 μg.mL^{-1}) was 16-fold more potent than its isomer EPER-1 (IC_{50} = 64.6 μg.mL^{-1}). In contrast to PBMC cells, EPER-2 was not cytotoxic (IC_{50} > 400 μg.mL^{-1}) when compared to positive control. These data suggest that the disposition of epoxide group into the *p*-menthane skeleton affects the anti-*Leishmania* activity, being that the presence of the exocyclic epoxide group considerably increased potency. Thus, it was possible to observe that the location of the epoxide group into the *p*-menthane skeleton resulted in different potencies.



ARTICLE HISTORY
Received 21 January 2018
Accepted 28 February 2018

KEYWORDS
Monoterpene; natural products; *Leishmania*; antiparasitic activity

CONTACT Damião Pergentino de Sousa saurudam@yahoo.com
Supplemental data for this article can be accessed at https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1448813.

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

1. Introduction

Leishmaniasis is considered the second most important parasitic zoonosis in humans after malaria and is one of the main neglected tropical diseases. This parasitic infection comes three different clinical presentations (visceral, cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis) and is caused by protozoans of *Leishmania* genus (Masmoudi et al. 2013; World Health Organization 2016). The *Leishmania donovani* species complex is the causative agent of visceral leishmaniasis worldwide, but atypical *L. donovani* strains can cause cutaneous leishmaniasis. According to the World Health Organization information, the visceral leishmaniasis is endemic in 75 countries with an estimated 50,000–90,000 new cases occurring each year (World Health Organization 2016; Adriaensen et al. 2017). The zoonotic visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum* and mainly prevalent in the Mediterranean basin and in South America. While in the Indian subcontinent and in East Africa the anthroponotic visceral leishmaniasis is the prevalent. This disease is caused by *L. donovani* (Adriaensen et al. 2017).

At present, there is no an effective vaccine to prevent the leishmaniasis. Its treatment is based on the pharmacological therapy with two classes of drugs: antimonial and non-antimonial compounds (including Pentamidine and Amphotericin B) (Haldar et al. 2011; Kobets et al. 2012). However, there are several limitations related to current medications, such as long courses of treatment (up to 30 days), partial effectiveness (30–98% cure), adverse drug events, high financial cost (drug price and hospital support/hospitalization) and the emergence of resistant strains (Croft et al. 2006; Kobets et al. 2012). In this context, the search for the new natural products has been encouraged to expand the therapeutical arsenal for leishmaniasis, since actual treatments are related to severity toxicity and therapeutic failure.

The compounds perillaldehyde 1,2-epoxide (**EPER-1**) and perillaldehyde 8,9-epoxide (**EPER-2**) are synthetic derivatives of the perillaldehyde, a monoterpene aldehyde commonly found in essential oil of *Perilla frutescens* (Igarashi and Miyazaki 2013). Several essential oils and their chemical components have been shown to be active against protozoan parasites, including different *Leishmania* species (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis*) (Monzote et al. 2007; Mohammad et al. 2014; Ramos et al. 2014). For example, Silva and collaborators revealed the leishmanicidal activity of a series of essential oil constituents against *L. amazonensis* promastigotes, being thymol and carvacrol the most bioactive compounds (Silva et al. 2017). Thus, the present study aimed to evaluate for the first time the anti-*Leishmania* activity of the monoterpene derivatives **EPER-1** and **EPER-2** against *L. donovani* promastigotes, one of the principal parasite responsible for visceral leishmaniasis (Mitra 2015). Further, it was investigated the cytotoxic effect of most bioactive compound on Mononuclear Peripheral Blood Cells (PBMC).

2. Results and discussion

In present investigation, two positional isomers of the perillaldehyde epoxide (**EPER-1** and **EPER-2**) were synthesised in our laboratory and subjected to anti-*Leishmania* activity assay on *L. donovani* promastigotes (Figure S1). Bioassay results revealed that both **EPER-1** and **EPER-2** were found to have anti-*Leishmania* activity against *L. donovani* promastigotes and this effect was directly proportional to concentration of the test substances. **EPER-2** was 16-fold more potent than compound **EPER-1**, with IC_{50} values of 3.87 and 64.6 $\mu g.mL^{-1}$, respectively (Table S1).

The compounds **EPER-1** and **EPER-2** are p-menthane monoterpenes structurally correlated to perillaldehyde. They are positional isomers, presenting in their structures the same functional groups, an aldehyde and an epoxide. The difference between **EPER-1** and **EPER-2** is the disposition of the epoxide group into the p-menthane skeleton. In compound **EPER-1**, the epoxide group is endocyclic, whereas in **EPER-2** the same group is exocyclic. This structural difference seems to play an important role in the anti-*Leishmania* effect, once that the presence of the exocyclic epoxide group considerably increased potency. Despite the constant growth of entities conducting researches on therapeutic potential from natural products against *Leishmania*, there are many substances with potential to become anti-*Leishmania* drugs and that still need to be investigated. The synthesis of chemical analogues and Structure Activity Relationship (SAR) studies are commonly employed to identify the structural parts that are important for biological activity as well as what structural modifications are adequate to potentiate this bioactivity (De Sousa et al. 2008; Lima et al. 2014; Silva et al. 2017).

In study conducted by Andrade et al. (2015, 2016), a high cytotoxic potential of **EPER-1** and **EPER-2** was observed against three human tumor cell lines, demonstrating percentage inhibition of cell proliferation between 95.66 and 99.89% and IC_{50} values of 2.68–3.92 and 1.03–1.75 $\mu g.mL^{-1}$, respectively. In addition, **EPER-2** showed antitumor activity *in vivo* against tumor sarcoma 180, with a significant inhibition of tumor mass growth of 38.4 and 58.7% at doses of 100 and 200 $mg.kg^{-1}.day^{-1}$.

Essential oils and their chemical constituents have displayed great potential in the field of biomedicine, being effective against a diverse range of protozoan parasites, including *Leishmania* species (Mohammad et al. 2014; Ramos et al. 2014). For example, Farias-Junior et al. (2012) investigated *in vitro* leishmanicidal effects of a carvacrol- and a thymol-rich essential oil from leaves of *Lippia sidoides* Cham. Both essential oils revealed significant leishmanicidal activity against *L. chagasi* promastigotes. Further, the monoterpenes thymol and carvacrol also demonstrated leishmanicidal effect, and carvacrol was the most bioactive.

As compound **EPER-2** (IC_{50} = 3.87 $\mu g.mL^{-1}$) was the most bioactive that **EPER-1** (IC_{50} = 64.6 $\mu g.mL^{-1}$) for anti-*Leishmania* activity, **EPER-2** was evaluated for cytotoxicity in human erythrocytes using a hemolysis assay (Table S2). In this assay, **EPER-2** appeared to be nontoxic for human blood type O+ erythrocytes at lower and the higher concentration, exhibiting HC_{50} > 400 $\mu g.mL^{-1}$. Similarly, Meglumine Antimoniate also exhibited low toxicity for erythrocytes (HC_{50} = 429.5 $\mu g.mL^{-1}$). Amphotericin B, on the contrary, showed a lower HC_{50} value (10.73 $\mu g.mL^{-1}$). These assays were performed at the same concentrations of these different compounds as in the promastigote assay. These results suggest that compound **EPER-2** possesses anti-*Leishmania* potential activity and is much less toxic against the host than Amphotericin B. In mononuclear peripheral blood cells (PBMC) assay (Table S3), **EPER-2** was no cytotoxic (IC_{50} > 400 $\mu g.mL^{-1}$) at the lower tested concentration (3.87 $\mu g.mL^{-1}$) when compared to positive control Amphotericin B (IC_{50} = 0.722 $\mu g.mL^{-1}$). However, at the higher concentration (4 × IC_{50} = 15.48 $\mu g.mL^{-1}$), this compound was cytotoxic on mononuclear peripheral blood cells (IC_{50} = 10.73 $\mu g.mL^{-1}$). This result is very important, since compounds may be toxic for the parasites e nontoxic to normal cells, principally the cells from imune system.

In order to compare the cytotoxic effects of the compound **EPER-2** and Amphotericin B against human erythrocytes, PBMC and the parasite, it was determined the Selectivity Index

(SI). Selectivity Index was determined as the ratio of CC_{50} (mononuclear peripheral blood cells) to IC_{50} (promastigotes) and/or the ratio of HC_{50} (human erythrocytes) to IC_{50} (promastigotes). The SI is used to estimate the therapeutic window of a substance, identifying drug candidates for further studies (Pires et al. 2014). **EPER-2** was 103.5-fold less toxic for human erythrocytes than for the parasite. However, this compound presented a lower SI (SI > 4.13) for mononuclear peripheral blood cells. Further, **EPER-2** (SI = 103.5) was much more selective than Amphotericin B (SI = 13.9) for human erythrocytes. For mononuclear peripheral blood cells, SI values of **EPER-2** (SI > 4.13) and Amphotericin B (SI > 4.81) were similar. SI values < 1 are considered to be more toxic to the host cell than to the parasite (Table S4).

3. Conclusion

Our study revealed that **EPER-2** monoterpene was 16-fold more potent than its isomer **EPER-1** for anti-*Leishmania* activity and without toxicity to red blood cells and peripheral blood mononuclear cells. In addition, it was possible to observe that arrangement of the epoxy group in *p*-menthane skeleton resulted in different potencies, suggesting that appropriate structural modifications may potentiate the anti-*Leishmania* activity. However, additional studies are needed to evaluate the activity of these compounds against amastigote forms as well as their action mechanism.

Supplementary material

Experimental details relating to this paper are available in the supplementary material.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Brazilian agencies: CNPq, CAPES and FAPITEC/SE.

References

Adriaensen W, Dorlo TPC, Vanham G, Kestens L, Kaye PM, Grierson JV. 2017. Immunomodulatory therapy of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients. Front Immunol. 8:1943.

Andrade LN, Lima TC, Amaral RG, Pessoa CO, Moraes Filho MO, Soares BM, Nascimento LG, Carvalho AA, de Sousa DP. 2015. Evaluation of the cytotoxicity of structurally correlated *p*-menthane derivatives. Molecules. 20:13264–13280.

Andrade LN, Amaral R, Dória GAA, Fonseca CS, Silva TKM, Albuquerque Júnior RLC, Thomazzi SM, Nascimento LG, Carvalho AA, De Sousa D. 2016. *In vivo* antitumor activity and toxicological evaluations of perillaldehyde 8,9-epoxide, a derivative of perillyl alcohol. Int J Mol Sci. 1:1–11.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 19:111–126.

De Sousa DP, Júnior GA, Andrade LN, Calasans FR, Nunes XP, Barbosa-Filho JM, Batista JS. 2008. Structure and spasmolytic activity relationships of monoterpene analogues found in many aromatic plants. Z Naturforsch C. 63:808–812.

Farias-Junior PA, Rios MC, Moura TA, Almeida RP, Alves PB, Blank AF, Fernandes RP, Scher R. 2012. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Biol Res. 45:399–402.

Haldar AK, Sen P, Roy S. 2011. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. Mol Biol Int. 2011:1–23.
Igarashi M, Miyazaki Y. 2013. A review on bioactivities of Perilla: progress in research on the functions of Perilla as medicine and food. Evid Based Complement Alternat Med. 2013:925342.
Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. 2012. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. Curr Med Chem. 19:1443–1474.
Lima TC, da Silva TK, Silva FL, Barbosa-Filho JM, Marques MO, Santos RL, Cavalcanti SC, de Sousa DP. 2014. Larvicidal activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. Chemosphere. 104:37–43.
Masmoudi A, Hariz W, Marrakchi S, Amouri M, Turki H. 2013. Old world cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. J Dermatol Case Rep. 7:31–41.
Mitra P. 2015. Pathogenicity of *Leishmania donovani* is associated with the high expression of a group low molecular weight proteins. Trop Parasitol. 5:106–117.
Mohammad I, Dinkar S, Farhat A. 2014. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*. J Med Microbiol. 63:74–85.
Monzote L, García M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. 2007. In vitro activity of an essential oil against *Leishmania donovani*. Phytother Res. 21:1055–1058.
Pires CT, Brenzan MA, Scodro RB, Cortez DA, Lopes LD, Siqueira VL, Cardoso RF. 2014. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity of *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 109:324–329.
Ramos EH, Moraes MM, Nerys LL, Nascimento SC, Militão GC, de Figueiredo RC, da Câmara CA, Silva TG. 2014. Chemical composition, leishmanicidal and cytotoxic activities of the essential oils from *Mangifera indica* L. var. Rosa and Espada. Biomed Res Int. 2014:734946.
Silva ARST, Scher R, Santos FV, Ferreira SR, Cavalcanti SCH, Correa CB, Bueno LL, Alves RJ, Souza DR, Fujiwara RT, Dolabella SS. 2017. Leishmanicidal activity and structure-activity relationships of essential oil constituents. Molecules. 16:22.
World Health Organization. 2016. Leishmaniasis fact sheet. Available from: http://www.bcq.usp.br/fotos/manual_referencias.pdf.