



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS ALIMENTOS E NUTRIÇÃO - FACFAN

Curso de Farmácia

Rafael Francisco Rosalem

**Atividade antileishmania *in vitro* de análogos isoxazólicos
clorados derivados das neolignan veraguensina, grandisina
e machilina G**

Campo Grande – MS 2023

**Atividade antileishmania *in vitro* de análogos isoxazólicos
clorados derivados das neolignanas veraguensina, grandisina
e machilina G**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito final
para graduação no Curso de Farmácia da UFMS.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Cesar de Morais Baroni

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aos meus familiares, professores, amigos que me apoiaram ao longo desta jornada acadêmica. Sem o amor, incentivo e paciência de vocês, este trabalho não seria possível. Agradeço do fundo do meu coração por estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTO

Dedico este trabalho, inicialmente, ao Laboratório de Síntese e Química Medicinal (LASQUIM) e ao Laboratório de Parasitologia Humana (INBIO), que proporcionaram a estrutura necessária para a realização dos ensaios.

Devoto este trabalho também ao meu orientador, Professor Doutor Adriano Baroni, que depositou sua confiança em mim ao oferecer-me uma vaga como PIBIC. Ele foi fundamental para estimular meu interesse na atividade biológica e me incentivou a seguir nessa linha de pesquisa. Além disso, ele me acompanhou desde o início, oferecendo todo o apoio e atenção necessários.

Tributo também à minha coorientadora, Doutora Amarith das Neves, que, com grande dedicação e zelo, acompanhou-me desde o início da minha primeira iniciação científica até a conclusão da graduação. Ela me proporcionou todo o conhecimento teórico e técnico necessário para a realização de todas as etapas dos ensaios, além de ter me apoiado em todos os experimentos exigidos para a finalização e conclusão deste trabalho.

Também dedico esta pesquisa à técnica de laboratório do LASQUIM, Doutora Cristiane Yuriko Kawasoko, que prestou uma ajuda inestimável na escrita, formatação e correção deste TCC. Ela foi solícita e atenciosa em todos os momentos.

Tributo também este trabalho, para as pessoas que mais me apoiaram ao longo da graduação, minha família, Andréia Francisco Rosalem e Marcus Vinicius Rosalem, que desde minha entrada na Universidade, mesmo estando longe, me deram todo apoio para que eu pudesse crescer como pessoa e acadêmico. Também dedico a minha avó, Célia Terezinha Francisco, que sempre intercedeu meu nome em suas orações me afastando de todo e qualquer mal.

Dedico também a minhas irmãs Lorena Francisco Rosalem e Laura Francisco Rosalem, a minha amiga Pietra, que me indicou para o meu orientador, também aos meus amigos Lorena, João, Lucas, Gabrielle, Dennis e Maira que sempre me ajudaram nos piores momentos, também, a minha namorada, Gabriela Batista Farias, e toda a família dela, em que eles sempre me apoiaram e não me deixaram desistir em nenhum momento, por mais difícil que fosse.

RESUMO

A leishmaniose cutânea (LC) é a manifestação clínica mais comum da leishmaniose, com consequências sociais, econômicas e psicológicas, afetando cerca de 1,5 milhão de pessoas anualmente. Os tratamentos atuais, com os antimoniais pentavalentes inicialmente e em caso de ineficácia do primeiro, a pentamidina e anfotericina B lipossomal, apresentam diversos efeitos adversos como alta toxicidade. Assim, a necessidade de novos agentes para tratar a LC é proeminente. Neste trabalho, descrevemos a atividade biológica de 5 novos análogos de cloroisoxazol inspirados na estrutura de neolignanas tetraidrofurânicas veraguensina, grandisina e machilina G, sendo eles **4a**, **4c**, **4i**, **4g** e **4e**. Experimentos *in vitro* avaliaram a atividade antileishmania contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*; e citotoxicidade com macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*. Os resultados mostraram que **4e** foi ativo contra amastigotas com valor de IC₅₀ semelhante ao controle tratado com anfotericina (IC₅₀= 2,2 ± 0,4 µM e IC₅₀= 2,0 ± 0,1, respectivamente) e com índice de seletividade para amastigotas de 22,7, superior aos medicamentos de referência testados.

Palavras-chave: amastigotas; *L.amazonensis*; macrófagos peritoneais, núcleo isoxazol.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common clinical manifestation of leishmaniasis, with social, economic, and psychological consequences, affecting approximately 1.5 million people annually. Current treatments, initially with pentavalent antimonials and, in case of first-line treatment inefficacy, pentamidine and liposomal amphotericin B, exhibit several adverse effects, such as high toxicity. Therefore, the need for new agents to treat CL is prominent. In this study, we describe the biological activity of five new chloro-isoxazole analogs inspired by the structure of tetrahydrofuran neolignans veraguensin, grandisin, and machilin G, namely **4a**, **4c**, **4i**, **4g**, and **4e**. *In vitro* experiments assessed the anti-leishmania activity against intracellular amastigote forms of *L. amazonensis* and cytotoxicity with peritoneal macrophages infected with *L. amazonensis*. The results showed that **4e** was active against amastigotes with an IC_{50} value similar to the control treated with amphotericin ($IC_{50} = 2.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$ and $IC_{50} = 2.0 \pm 0.1$, respectively) and with a selectivity index for amastigotes of 22.7, higher than the tested reference drugs.

Keywords: amastigotes; *L. amazonensis*; peritoneal macrophages; isoxazole nucleus.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Síntese dos análogos isoxazólicos cloro-substituídos 4.....	12
3.2 Ensaio <i>in vitro</i> de atividade antileishmania contra formas amastigotas de	12
3.2.1 Camundongos	12
3.2.2 Parasitas	12
3.2.3 Macrófagos peritoneais	13
3.2.4 Tratamento de macrófagos infectados	13
3.2.5 Citotoxicidade <i>in vitro</i> em macrófagos peritoneais.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5. CONCLUSÃO	20
6. REFERÊNCIAS	21
7. APÊNDICE	25

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença negligenciada causada por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. As principais manifestações clínicas são as formas cutânea, mucocutânea e visceral. A leishmaniose cutânea afeta aproximadamente 1 milhão de pessoas em todo o mundo¹. Nas Américas, as principais espécies responsáveis por causar a doença são: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, and *L. guyanensis*.^{2,3}

Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira linha utilizados no tratamento. Medicamentos de segunda linha (anfotericina B e sua formulação lipossomal, pentamidina, paromomicina e miltefosina) são outras opções para diferentes esquemas terapêuticos.¹ Portanto, a farmacoterapia da leishmaniose apresenta diversas limitações, como efeitos adversos, toxicidade e resistência do parasita.⁴ Nesse contexto, pesquisas visando encontrar novos compostos bioativos são consideradas relevantes e necessárias.

Os compostos sintéticos podem desempenhar um papel relevante quando combinados com a abordagem fenotípica, que é uma estratégia de descoberta de medicamentos que fornece informações pré-clínicas *in vitro* por meio da triagem biológica de bibliotecas de compostos.^{5,6} Consequentemente, os dados dos ensaios biológicos fornecem informações para investigar a relação estrutura-atividade (SAR) dos compostos e impulsionar o processo de *design* de medicamentos de um sucesso para otimizar a liderança.⁷⁻⁹

A construção de bibliotecas de compostos para descoberta de medicamentos considera os produtos naturais como estruturas privilegiadas inspiradoras para novas modificações devido às suas diversas atividades biológicas.¹⁰ Neste contexto, a estrutura apresentada em neolignanas veraguensina **1a**, grandisina **1b** e machilina G **1c** (figura 1) pode fornecer uma biblioteca de compostos com potencial antileishmania, uma vez que foi relatado anteriormente que essas neolignanas exibem essa atividade.¹¹

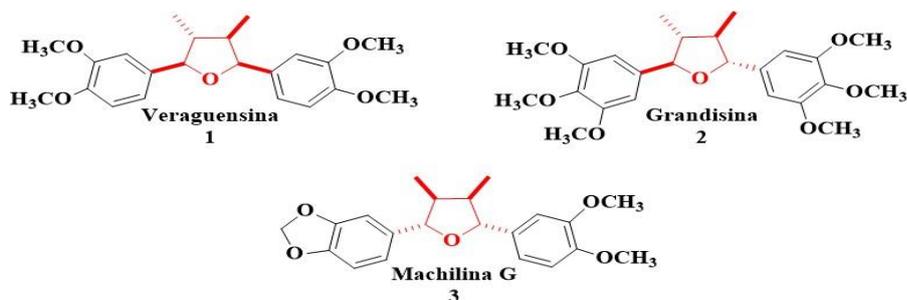


Figura 1. Estruturas das neolignanas tetrahidrofurânicas veraguensina **1**, grandisina **2** e machilina G **3**.

Além disso, o núcleo heterocíclico é amplamente utilizado no *pipeline design* de fármacos¹² e estudos anteriores mostraram a substituição bioisostérica bem-sucedida entre núcleos de tetrahydrofurano, triazol e isoxazol.¹³⁻¹⁷ Nosso grupo de pesquisa conduziu estudos SAR que revelaram derivados de triazol 2 e isoxazol 3 substituídos por grupo trimetoxila foi mais ativo contra formas amastigotas de *L. Amazonensis*.

Os estudos SAR também demonstraram diferenças na potência entre isômeros posicionais, como **2c** e **2d** (análogos de triazol) e **3c** e **3d** (análogos de isoxazol).¹³⁻¹⁶ O análogo de isoxazol mais ativo à base de neolignana **3c** (IC₅₀= 0,4 µM) mostrou efeito terapêutico de 98,5% em camundongos induzidos com leishmaniose cutânea experimental, de forma semelhante ao medicamento de referência glucantime (figura 2)¹⁸.

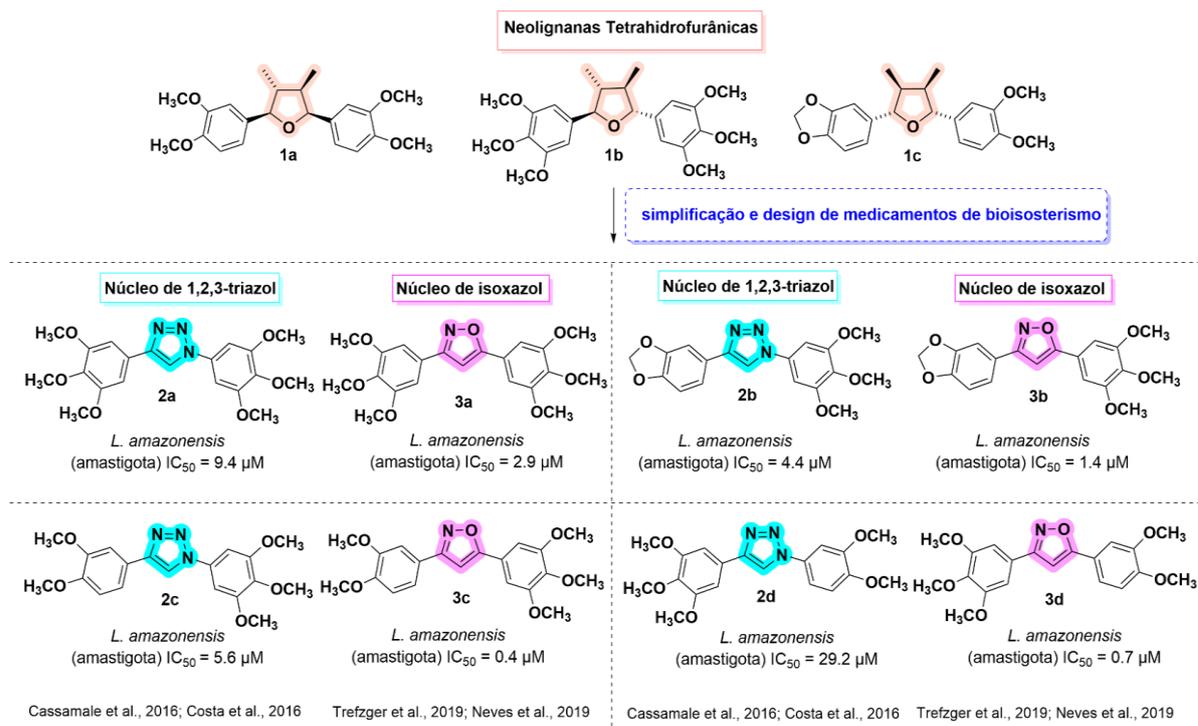


Figura 2. Atividade antileishmanial de 1,2,3-triazóis e isoxazóis inspirados nas neolignana tetrahydrofurânicas

Durante o processo de síntese de isoxazóis tipo **3**, nosso grupo de pesquisa obteve por acaso quatro subprodutos cloro substituídos **4** em proporção menor (15-19%), que despertaram nossa curiosidade quanto à sua potencial aplicação biológica antileishmaniana (Figura 3).

Nosso interesse em derivados substituídos por cloro é justificado pela combinação de características desejáveis desse halogênio em “*drug design*”. Além da otimização farmacocinética, como melhoria da estabilidade metabólica e melhoria da permeabilidade da

membrana através da melhoria da lipofilicidade, as estruturas contendo cloro também podem aumentar a potência em alguns casos.¹⁹⁻²¹ O volume espacial pode levar ao fácil acesso a bolsas de ligação mais profundas no alvo molecular (bolsas hidrofóbicas), resultando em aumento de forças de interação resultando em compostos mais potentes.²²

Além disso, o átomo de cloro combina a propriedade de aceitar ligações de hidrogênio e sua característica única conhecida como ligação de halogênio, que é a capacidade de interagir com átomos ricos em elétrons com pares solitários de elétrons e sistemas π ricos em elétrons.²³ O átomo de cloro também exibe as propriedades dos átomos de flúor (retirada de elétrons e estabilidade metabólica), de substituintes metila (lipofilicidade, interações de Van der Waals e, efeitos estéricos) e átomo de bromo (ligação de halogênio), mas com a vantagem adicional de ter um peso molecular mais baixo que este último.²⁴

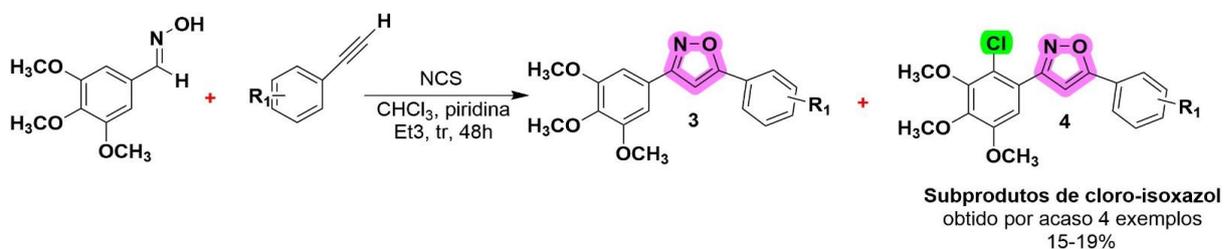


Figure 3. Análogos de isoxazol e cloro-isoxazol

Assim, devido a necessidade urgente de descobrir opções terapêuticas novas e mais seguras para tratar a leishmaniose, e encorajados pelos resultados obtidos os análogos análogos de heterociclos em nossa jornada de descoberta de medicamentos, decidimos expandir o número de análogos de cloro-isoxazóis inspirado nas neolignanas veraguensina **1a**, grandisina **1b** e machilina G **1c** que foram previamente obtidas por acaso e investigar a atividade antileishmania *in vitro* desses novos análogos de do tipo 4 contra *L. amazonensis* (Figura 4).

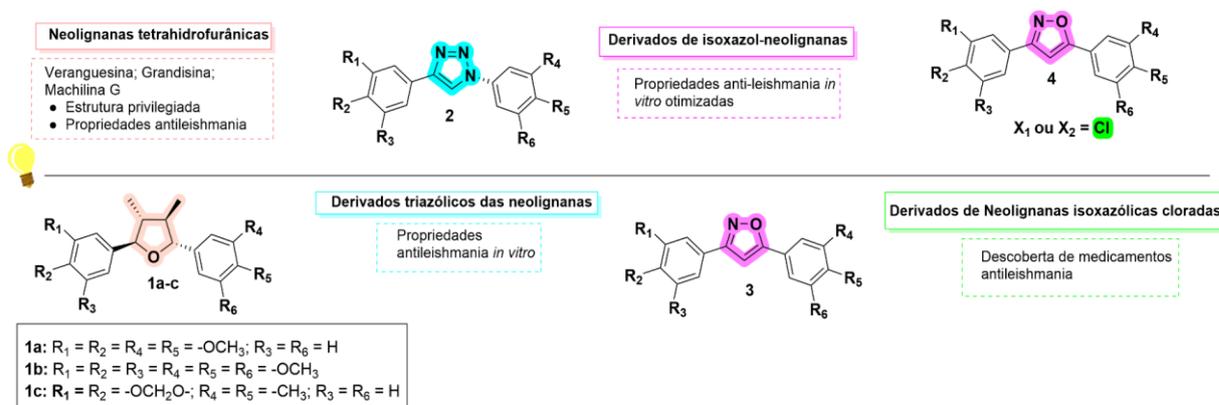


Figura 4. Descoberta de drogas de agentes antileishmania à base de neolignanas: estrutura de tetrahidrofurano neolignanas 1a-c, estrutura de derivados de triazol 2, estrutura de derivados de isoxazol 3 e estrutura de derivados de cloro-isoxazol 4.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade biológica *in vitro* dos 5 análogos isoxazólicos: **4a, 4c, 4i, 4g, e 4e.**

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a atividade biológica *in vitro* dos 5 compostos isoxazólicos clorados contra as formas amastigotas intracelulares do parasita *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (cepa IFLA/BR/1967/PH8), utilizando os parâmetros de Concentração Mínima Inibitória 50% (IC₅₀), Índice de Seletividade (IS) e Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese dos análogos isoxazólicos cloro-substituídos 4

Os análogos isoxazólicos cloro-substituído 4 foram sintetizados e purificados no Laboratório de Química Farmacêutica (LASQUIM) da UFMS através de metodologias descritas na literatura. A caracterização e confirmação da estrutura química foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H), Carbono (¹³C) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS). A pureza foi determinada por HPLC e todos os análogos apresentaram pureza > 95%.

3.2 Ensaios *in vitro* de atividade antileishmania contra formas amastigotas de *L. amazonensis*

3.2.1 Camundongos

Camundongos fêmeas BALB/c (com idade de 6 a 8 semanas, aproximadamente 30 g cada) foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS, Campo Grande-MS, Brasil). Os animais foram mantidos em mini-isoladores acoplados a uma estante ventilada (Alesco), em condições específicas livres de patógenos, a 25 °C±1 °C, com ciclos de luz/escuro de 12 horas, e com acesso livre a alimento (Nuvital) e água. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (número de protocolo 1.071/2019) e segue as condições e procedimentos experimentais necessários.

3.2.2 Parasitas

Leishmania (*Leishmania*) *amazonensis* (cepa IFLA/BR/1967/PH8) foi rotineiramente isolada das lesões de camundongos BALB/c infectados e mantida *in vitro* na forma de promastigotas a 26 °C em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS, Sigma-Aldrich), 10.000 U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich) e 10 mg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich), com um máximo de vinte passagens em cultura. Parasitas na fase de crescimento estacionária foram usados para realizar o ensaio anti-amastigota *in vitro*. Além disso, as formas amastigotas intracelulares foram obtidas infectando uma cultura de macrófagos peritoneais murinos com as formas promastigotas.

Fonte: Pan American Health Organization. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas. Washington, D.C.: PAHO; 2019

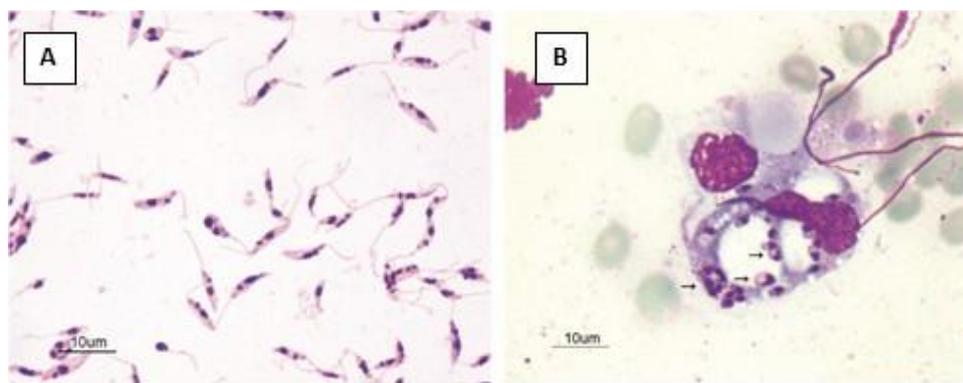


Figura 5. Formas evolutivas do *L. amazonensis*, em que
a. Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*
b. Formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*

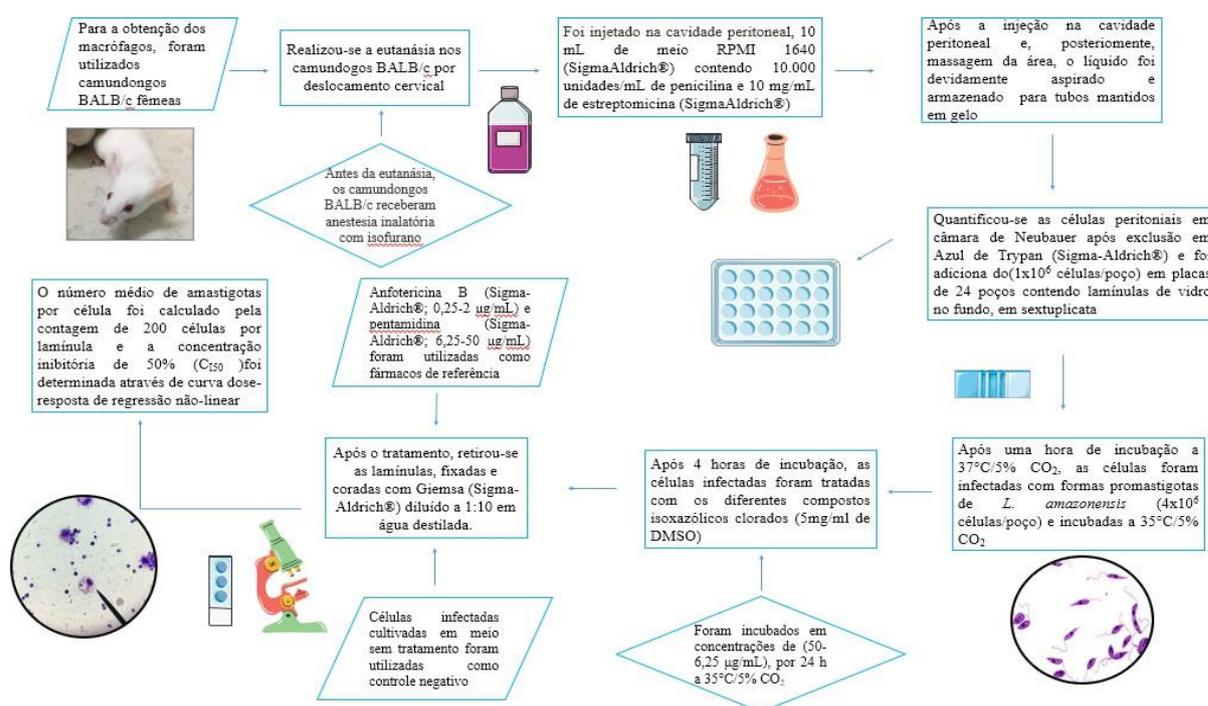
3.2.3 Macrófagos peritoneais

Após a eutanásia dos animais, os macrófagos peritoneais foram obtidos de acordo com os critérios do conselho de ética animal. Dez mililitros de meio RPMI 1640 gelado (Sigma-Aldrich), suplementado com 10.000 U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich) e 10 mg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich), foram injetados na cavidade peritoneal. Após uma massagem na área abdominal, os macrófagos peritoneais foram liberados. Em seguida, o líquido peritoneal foi aspirado e transferido para um frasco Erlenmeyer mantido sobre gelo, evitando que as células aderissem às superfícies. As células foram quantificadas usando uma câmara de Neubauer após exclusão celular com coloração de azul de tripano (Sigma-Aldrich) ¹³.

3.2.4 Tratamento de macrófagos infectados

Macrófagos peritoneais (1×10^6 células/poço) em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 1% de soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich) foram adicionados a placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro redondas (13 mm) no fundo, em seis repetições. As placas foram incubadas por uma hora a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ para aderência, a qual foi confirmada usando um microscópio invertido. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Sigma-Aldrich). Após isso, os macrófagos aderentes foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de crescimento (4×10^6 parasitas/ml) e incubados a 35 °C/5% CO₂. Em seguida, os parasitas livres foram removidos por lavagem com PBS duas vezes (Sigma-Aldrich). Após quatro horas, as células infectadas foram tratadas por 24 horas com análogos sintéticos de cloroisoxazol **4a**, **4c**, **4i**, **4g** e **4e** (6,25 - 12,5 - 25 - 50 µg/ml). Pentamidina e anfotericina B (Sigma-

Aldrich; 6,25 - 12,5 - 25 - 50 $\mu\text{g/ml}$) foram usados como medicamentos de referência. Células não tratadas foram usadas como controle negativo. Após o tratamento, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS (Sigma-Aldrich) duas vezes, fixadas com solução de Bouin (Sigma-Aldrich), lavadas com etanol a 70% e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich) diluída na proporção de 1:10 em água destilada. As lamínulas foram removidas e lavadas em um sistema de desidratação com acetona a 100% (Sigma-Aldrich); 70% de acetona e 30% de xileno (Sigma-Aldrich); 50% de acetona e 50% de xileno (Sigma-Aldrich); 30% de acetona e 70% de xileno (Sigma-Aldrich); 100% de xileno (Sigma-Aldrich). O número total de amastigotas foi determinado contando 200 células por lamínula em seis repetições, em um microscópio óptico. O valor da concentração inibitória de cinquenta por cento (IC_{50}) foi calculado usando uma curva de regressão não linear com o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O esquema geral da do ensaio foi elucidado no fluxograma abaixo (Esquema 1).



Esquema 1. Fluxograma geral do ensaio de IC_{50}

3.2.5 Citotoxicidade *in vitro* em macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais BALB/c (1×10^6 células/poço) em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 1% de soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich) foram adicionados a placas de 96 poços em cinco repetições, após a quantificação em câmara de Neubauer. As

placas foram incubadas por 24 horas a 36 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ para aderência, o que foi confirmado usando um microscópio invertido. Em seguida, o sobrenadante foi descartado. Após isso, os macrófagos aderentes foram tratados com os análogos de cloroisoxazol por método de diluição em série (250,0 µg/ml – 3,9 µg/ml) e incubados a 35 °C/5% CO₂ por 48 horas. A viabilidade foi analisada pelo método MTT. Doxorrubicina (Sigma-Aldrich) foi usado como controle de morte em concentrações de 250-3,9 µg/ml; DMSO (Sigma-Aldrich) foi usado como controle negativo na concentração necessária para solubilizar a maior concentração das amostras de teste e não interferiu na viabilidade celular, e anfotericina B (250,0 µg/ml – 3,9 µg/ml) foi usado como droga antileishmaniose de referência. A concentração que inibiu 50% do crescimento celular (CC₅₀) foi calculada usando uma regressão sigmoidal da curva dose-resposta com o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Investigação pré-clínica antileishmania *in vitro*

A atividade de novos derivados de cloro-isoxazol foi testada *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos peritoneais BALB/c para determinar o índice de seletividade dos análogos do cloro-isoxazol (Tabela 1).

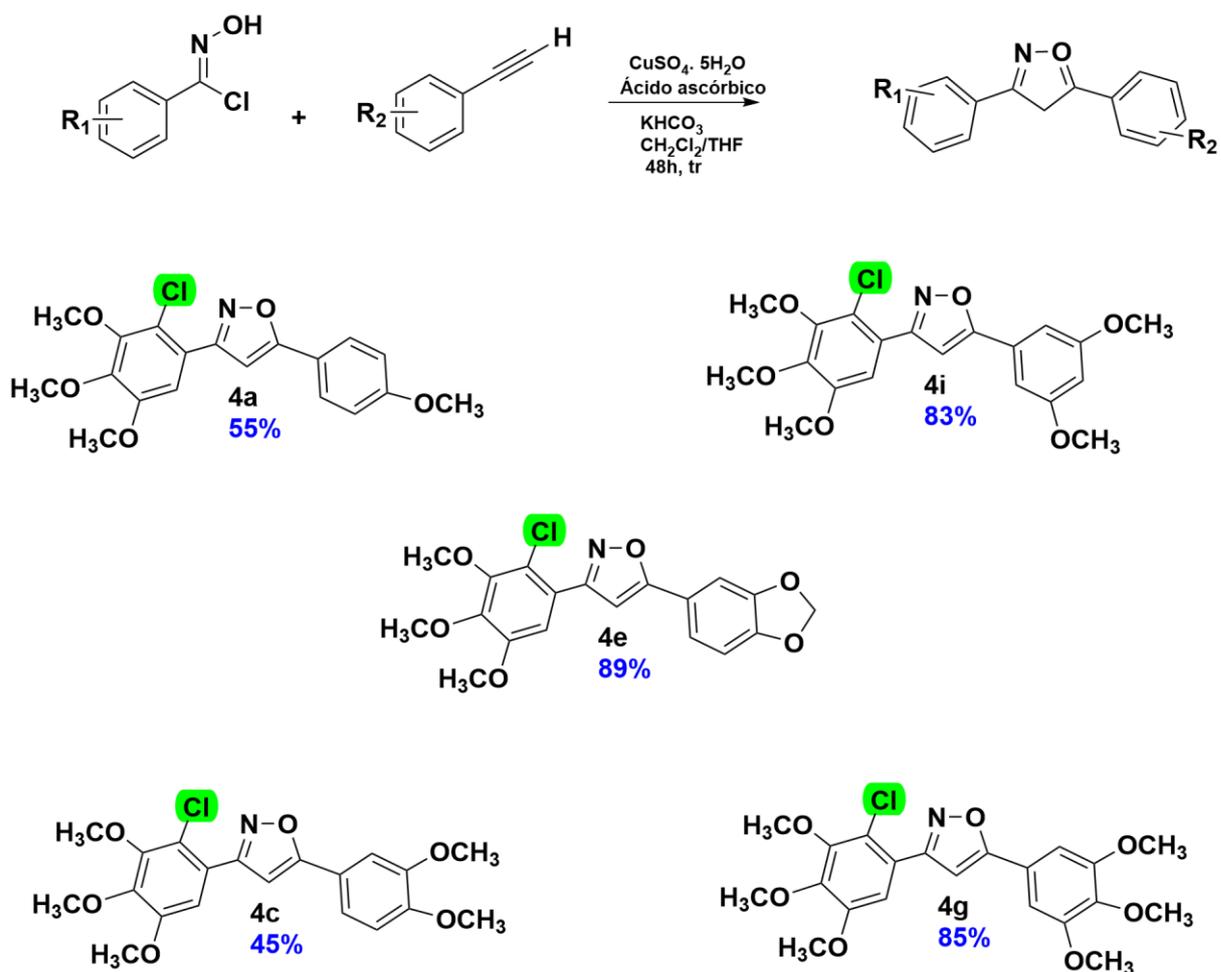


Figura 6. Procedimento geral para a síntese de análogos de cloro-isoxazol 4.

50	Compostos	CC ^a	<i>L. amazonensis</i>	SI ^e
			amastigotas intracelulares	
			IC ₅₀ (μM±SD) ^d	
	4^a	9.6 ± 1.2	10.9 ± 0.06	0.8
	4c	26.7 ± 3.8	31.7 ± 0.4	0.8
	4e	50.1 ± 1.2	2.2 ± 0.4	22.7
	4g	7.0 ± 1.5	21.8 ± 0.2	0.3
	4i	28.0 ± 2.5	19.3 ± 0.1	1.5
	Pentamidine^f	23.2 ± 0.3	16.3 ± 0.2	1.4
	AmB^g	12.8 ± 0.7	2.0 ± 0.1	6.4
	Grandisina 1b^h	33.4 ± 1.3	21.1 ± 0.2	1.6
	Triazol 2bⁱ	23.5 ± 0.8	23.4 ± 0.3	1.0
	Isoxazol 3b^j	33.6 ± 1.1	1.6 ± 0.3	21.0
	Doxorrubicina^k	2.4 ± 6.8	Nd	Nd

Tabela 1. Índices antileishmânicos, de citotoxicidade e de seletividade de novos derivados de neolignanas de cloro-isoxazol.

A atividade antileishmanial de derivados de cloro-isoxazol foi avaliada contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* após 72 e 24 horas. A citotoxicidade foi realizada em macrófagos peritoneais BALB/c. O índice de seletividade (SI) foi calculado como os valores CC₅₀/IC₅₀ para as formas amastigotas. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Abreviações: CC₅₀ = concentração citotóxica média; IC₅₀ = concentração inibitória média; SI = índice de seletividade; SD = desvio padrão. Fármacos de referência para *L. amazonensis*. AmB = anfotericina B usada como fármaco de referência para *L. amazonensis*; grandisina; derivado de triazol 2b; derivado de isoxazol 6' 3b (com substituintes de metilenodioxí e trimetoxi nos anéis A e B, respectivamente); e controle positivo, doxorrubicina em macrófagos peritoneais. Nd = resultados não determinados.

Os valores de IC₅₀, CC₅₀ e IS dos análogos isoxazólicos clorados estão descritos na (tabela 1), incluindo os valores dos fármacos de referência para utilizados no tratamento de *L. amazonensis* como parâmetro comparativo.

O análogo **4a** (R₁-R₃= -OCH₃, X₁ = -Cl, R₅= -OCH₃; CC₅₀= 9,6), apresentou uma atividade de IC₅₀= 10.9 µM contra as formas amastigotas do *L. amazonensis*, sendo aproximadamente 1,5 vezes mais potente que a Pentamidina (16,3 µM), um dos fármacos de referência usados no trabalho. Em relação a toxicidade celular, o valor obtido foi de CC₅₀ = 9.6, se demonstrou mais tóxico em macrófagos peritoniais que a pentamidina (CC₅₀= 23,2) e anfotericina B (CC₅₀= 12,8) e em relação derivados triazol (CC₅₀= 23.5) e isoxazol (CC₅₀= 33.6) descritos na figura 1.

O composto **4c** (R₁-R₃= -OCH₃, X₁= -Cl, R₄ e R₅= -OCH₃), dispôs de uma atividade de IC₅₀= 31.7 µM, considerada baixa contra as formas amastigotas intracelulares do *L. amazonensis*, em relações aos compostos usados como referência Pentamidina (16,3 µM) e Anfotericina B (2.0 µM). Além disso, apresentou uma citotoxicidade celular de CC₅₀= 26.7 µM, superior a pentamidina (CC₅₀= 23,2 µM), anfotericina B (CC₅₀= 12,8 µM) e o triazol (CC₅₀= 23.5 µM), em relação aos macrófagos peritoniais, sendo então, menos tóxicos que eles.

O composto **4i** (R₁-R₃= -OCH₃, X₁= -Cl, R₄ e R₆= -OCH₃), teve uma atividade de IC₅₀ de = 19.3 µM, contra as formas amastigotas, sendo 1,64 vezes mais potente que o análogo **4c** (IC₅₀= 31.7 µM), mas em relação aos de referência, se mostrou menos ativo que a Pentamidina (16,3 µM) e Anfotericina B (2.0 µM). Além disso, em relação a citotoxicidade celular, se obteve (CC₅₀ = 28.1), portanto, menos tóxico que a pentamidina (CC₅₀= 23,2) e anfotericina B (CC₅₀= 12,8) e o triazol (CC₅₀= 23.5).

O análogo **4g** (R₁-R₃= -OCH₃, X₁= -Cl, R₄-R₆= -OCH₃), mostrou uma atividade de (IC₅₀= 21.8 µM), 1,45 vezes mais ativo que o análogo **4c** e menos ativo que o análogo **4i**, e que os fármacos de referência pentamidina (IC₅₀ = 16.3 µM), e anfotericina B (IC₅₀ = 2.0 µM). Em relação a citotoxicidade celular, o resultado foi de (CC₅₀ = 7.0 µM), se demonstrando mais tóxico que todos os análogos e compostos citados.

O análogo **4e** (R₁-R₃= -OCH₃, X₁= -Cl, R₄ e R₅= -OCH₂O-) é o grande destaque dessa série apresentando uma atividade IC₅₀ = 2.2 µM contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*, que em relação aos fármacos usados na terapia farmacológica da leishmaniose, foi 7,4 vezes mais ativo que a pentamidina (IC₅₀ = 16.3 µM) e equipotente a Anfotericina B lipossomal (IC₅₀ = 2.0 µM), que é o fármaco mais potente utilizado atualmente para o tratamento de Leishmaniose. Além disso, o composto **4e** exibiu menor toxicidade em macrófagos

peritoneais e maior índice de seletividade ($CC_{50} = 50,1 \mu\text{M}$, $SI = 22,7$) do que a pentamidina ($CC_{50} = 23,2 \mu\text{M}$) e anfotericina B ($CC_{50} = 12,8 \mu\text{M}$). Essas descobertas indicam o **4e** como um potencial composto líder para futuros estudos *in vivo* antileishmania.

5. CONCLUSÃO

A investigação pré-clínica desenvolvida no presente trabalho mostrou que o análogo **4e** ($IC_{50} = 2.2 \mu M$) foi o mais ativo, dentre os 5 compostos testados contra as formas de amastigotas do *L. amazonensis* **4e** foi oito vezes mais ativo que a pentamidina ($IC_{50} = 16.3 \mu M$) e atividade antileishmania equipotente à anfotericina B ($IC_{50} = 2.0 \mu M$). Assim, podemos concluir que o composto **4e** é um excelente candidato para futuros estudos em ensaios *in vivo* (Figura 6).

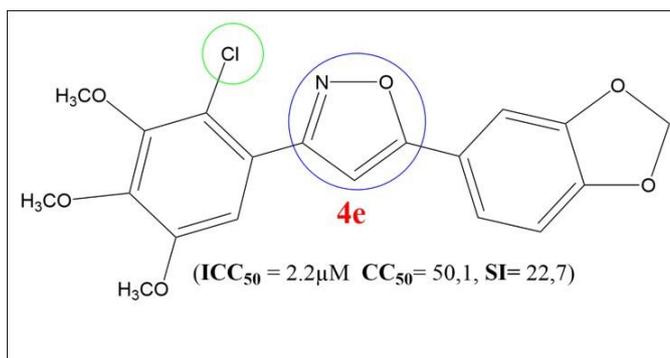


Figura 6. Estrutura química do composto **4e**.

6. REFERÊNCIAS

- (1) WHO, W. H. O. *Leishmaniasis*. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed 2022-03-15).
- (2) WHO. *Leishmaniasis*. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- (3) OPAS. *Leishmanioses: Informe Epidemiológico Das Américas, 2021*. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>.
- (4) Oliveira, L. F.; Schubach, A. O.; Martins, M. M.; Passos, S. L.; Oliveira, R. V.; Marzochi, M. C.; Andrade, C. A. Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. *Acta Tropica* **2011**, *118* (2), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>.
- (5) Field, M. C.; Horn, D.; Fairlamb, A. H.; Ferguson, M. A. J.; Gray, D. W.; Read, K. D.; De Rycker, M.; Torrie, L. S.; Wyatt, P. G.; Wyllie, S.; Gilbert, I. H. Anti-Trypanosomatid Drug Discovery: An Ongoing Challenge and a Continuing Need. *Nat Rev Microbiol* **2017**, *15* (4), 217–231. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.193>.
- (6) Hendrickx, S.; Caljon, G.; Maes, L. Need for Sustainable Approaches in Antileishmanial Drug Discovery. *Parasitol Res* **2019**, *118* (10), 2743–2752. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06443-2>.
- (7) Gilbert, I. H. Drug Discovery for Neglected Diseases: Molecular Target-Based and Phenotypic Approaches. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (20), 7719–7726. <https://doi.org/10.1021/jm400362b>.
- (8) Gilbert, I. H.; Leroy, D.; Frearson, J. A. Finding New Hits in Neglected Disease Projects: Target or Phenotypic Based Screening? *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, *11* (10), 1284–1291.
- (9) Moffat, J. G.; Vincent, F.; Lee, J. A.; Eder, J.; Prunotto, M. Opportunities and Challenges in Phenotypic Drug Discovery: An Industry Perspective. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16* (8), 531–543. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.111>.
- (10) Mathur, S.; Hoskins, C. Drug Development: Lessons from Nature. *Biomedical Reports* **2017**, *6* (6), 612–614. <https://doi.org/10.3892/br.2017.909>.
- (11) da Silva Filho, A. A.; Costa, E. S.; Cunha, W. R.; Silva, M. L. A. e; Nanayakkara, N. P. D.; Bastos, J. K. *In vitro* Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans Isolated from *Nectandra Megapotamica* (Lauraceae). *Phytotherapy Research* **2008**, *22* (10), 1307–1310. <https://doi.org/10.1002/ptr.2486>.
- (12) Heravi, M. M.; Zadsirjan, V. Prescribed Drugs Containing Nitrogen Heterocycles: An

Overview. *RSC Adv.* **2020**, *10* (72), 44247–44311. <https://doi.org/10.1039/D0RA09198G>.

(13) das Neves, A. R.; Trefzger, O. S.; Barbosa, N. V.; Honorato, A. M.; Carvalho, D. B.; Moslaves, I. S.; Kadri, M. C. T.; Yoshida, N. C.; Kato, M. J.; Arruda, C. C. P.; Baroni, A. C. M. Effect of Isoxazole Derivatives of Tetrahydrofuran Neolignans on Intracellular Amastigotes of *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*: A Structure–Activity Relationship Comparative Study with Triazole-Neolignan-Based Compounds. *Chemical Biology & Drug Design* **2019**, *94* (6), 2004–2012. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13609>.

(14) Trefzger, O. S.; das Neves, A. R.; Barbosa, N. V.; Carvalho, D. B.; Pereira, I. C.; Perdomo, R. T.; Matos, M. F. C.; Yoshida, N. C.; Kato, M. J.; de Albuquerque, S.; Arruda, C. C. P.; Baroni, A. C. M. Design, Synthesis and Antitrypanosomatid Activities of 3,5-Diaryl-Isoxazole Analogues Based on Neolignans Veraguensin, Grandisin and Machilin G. *Chemical Biology & Drug Design* **2019**, *93* (3), 313–324. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13417>.

(15) Cassamale, T. B.; Costa, E. C.; Carvalho, D. B.; Cassemiro, N. S.; Tomazela, C. C.; Marques, M. C. S.; Ojeda, M.; Matos, M. F. C.; Albuquerque, S.; Arruda, C. C. P.; Baroni, A. C. M. Synthesis and Antitrypanosomatid Activity of 1,4-Diaryl-1,2,3-Triazole Analogues of Neolignans Veraguensin, Grandisin and Machilin G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 1217–1228. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160017>.

(16) Costa, E. C.; Cassamale, T. B.; Carvalho, D. B.; Bosquiroli, L. S. S.; Ojeda, M.; Ximenes, T. V.; Matos, M. F. C.; Kadri, M. C. T.; Baroni, A. C. M.; Arruda, C. C. P. Antileishmanial Activity and Structure-Activity Relationship of Triazolic Compounds Derived from the Neolignans Grandisin, Veraguensin, and Machilin G. *Molecules* **2016**, *21* (6), 802. <https://doi.org/10.3390/molecules21060802>.

(17) Trefzger, O. S.; Barbosa, N. V.; Scapolatempo, R. L.; das Neves, A. R.; Ortale, M. L. F. S.; Carvalho, D. B.; Honorato, A. M.; Fragoso, M. R.; Shuiguemoto, C. Y. K.; Perdomo, R. T.; Matos, M. F. C.; Chang, M. R.; Arruda, C. C. P.; Baroni, A. C. M. Design, Synthesis, Antileishmanial, and Antifungal Biological Evaluation of Novel 3,5-Disubstituted Isoxazole Compounds Based on 5-Nitrofurans Scaffolds. *Archiv der Pharmazie* **2020**, *353* (2), 1900241. <https://doi.org/10.1002/ardp.201900241>.

(18) das Neves, A. R.; Carvalho, D. B.; Silva, F.; Rosalem, R. F.; Pelizaro, B. I.; Castilho, P. F.; Oliveira, K. M. P.; Cassemiro, N. S.; Pessatto, L. R.; Paredes-Gamero, E. J.; Piranda, E. M.; Silva, D. B.; Arruda, C. C. P.; Baroni, A. C. M. In Vivo Antileishmanial Effect of 3,5-Diaryl-Isoxazole Analogues Based on Veraguensin, Grandisin, and Machilin G: A Glance at a Preclinical Study. *ACS Infect. Dis.* **2023**, *9* (5), 1150–1159. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00090>.

- (19) Hernandez, M. Z.; Cavalcanti, S. M. T.; Moreira, D. R. M.; de Azevedo Junior, W. F.; Leite, A. C. L. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. *Curr Drug Targets* **2010**, *11* (3), 303–314. <https://doi.org/10.2174/138945010790711996>.
- (20) Shrestha, A.; Jin Oh, H.; Kim, M. J.; Pun, N. T.; Magar, T. B. T.; Bist, G.; Choi, H.; Park, P.-H.; Lee, E.-S. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Study of Halogen Containing 2-Benzylidene-1-Indanone Derivatives for Inhibition of LPS-Stimulated ROS Production in RAW 264.7 Macrophages. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *133*, 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.049>.
- (21) Siegal, G.; Ab, E.; Schultz, J. Integration of Fragment Screening and Library Design. *Drug Discovery Today* **2007**, *12* (23), 1032–1039. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.08.005>.
- (22) Fang, W.-Y.; Ravindar, L.; Rakesh, K. P.; Manukumar, H. M.; Shantharam, C. S.; Alharbi, N. S.; Qin, H.-L. Synthetic Approaches and Pharmaceutical Applications of Chloro-Containing Molecules for Drug Discovery: A Critical Review. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *173*, 117–153. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.063>.
- (23) Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joerger, A. C.; Boeckler, F. M. Principles and Applications of Halogen Bonding in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (4), 1363–1388. <https://doi.org/10.1021/jm3012068>.
- (24) Chiodi, D.; Ishihara, Y. “Magic Chloro”: Profound Effects of the Chlorine Atom in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (8), 5305–5331. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c02015>.
- (25) Vieira, A. A.; Bryk, F. R.; Conte, G.; Bortoluzzi, A. J.; Gallardo, H. 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction Applied to Synthesis of New Unsymmetric Liquid Crystal Compounds-Based Isoxazole. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (8), 905–908. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.12.021>.
- (26) Li, S.-S.; Wu, L.; Qin, L.; Zhu, Y.-Q.; Su, F.; Xu, Y.-J.; Dong, L. Iridium(III)-Catalyzed Tandem [3 + 2] Annulation: Synthesis of Spirocyclic Phosphoramidate Derivatives. *Org. Lett.* **2016**, *18* (17), 4214–4217. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01895>.
- (27) Carvalho, D. B.; Costa, P. A. N.; Portapilla, G. B.; das Neves, A. R.; Shiguemoto, C. Y. K.; Pelizaro, B. I.; Silva, F.; Piranda, E. M.; Arruda, C. C. P.; Gaspari, P. D. M.; Cardoso, I. A.; Luccas, P. H.; Nonato, M. C.; Lopes, N. P.; de Albuquerque, S.; Baroni, A. C. M. Design, Synthesis and Antitrypanosomatid Activity of 2-Nitroimidazole-3,5-Disubstituted Isoxazole Compounds Based on Benzimidazole. *European Journal of*

Medicinal Chemistry **2023**, *260*, 115451. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115451>.

(28) Fernandes, A. P.; Coelho, E. A. F.; Machado-Coelho, G. L. L.; Grimaldi, G.; Gazzinelli, R. T. Making an Anti-Amastigote Vaccine for Visceral Leishmaniasis: Rational, Update and Perspectives. *Curr Opin Microbiol* **2012**, *15* (4), 476–485. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.05.002>.

7. APÊNDICE

O presente trabalho faz parte dos resultados publicados na *ACS infectious diseases* **2023**, *9*, 1150-1123, DOI: 10.1021/acsinfecdis.3c00090.

The screenshot displays the ACS Publications website interface. At the top, there is a navigation bar with the ACS logo and 'ACS Publications' text. Below this is a search bar and user options like 'My Activity' and 'Publications'. A central advertisement area contains the text 'Anúncio fechado por Google'. The main content area features the article title 'In Vivo Antileishmanial Effect of 3,5-Diaryl-isoxazole Analogues Based on Veraguensin, Grandisin, and Machilin G: A Glance at a Preclinical Study' by Amarith R. das Neves et al. The article's metrics are shown as 242 Article Views, 0 Altmetric, and 0 Citations. There are buttons for 'PDF (3 MB)', 'Access Through Your Institution', 'More Access Options', and 'Supporting Info (1)'. A small image of a green fluorescent ring is visible on the right side of the article preview.

RETURN TO ISSUE | < PREV ARTICLE NEXT >

In Vivo Antileishmanial Effect of 3,5-Diaryl-isoxazole Analogues Based on Veraguensin, Grandisin, and Machilin G: A Glance at a Preclinical Study

Amarith R. das Neves, Diego B. Carvalho, Fernanda Silva, Rafael F. Rosalem, Bruno I. Pelizaro, Pamela F. Castilho, Kelly M. P. Oliveira, Nadia S. Cassemiro, Lucas R. Pessatto, Edgar J. Paredes-Gamero, Eliane M. Piranda, Denise B. Silva, Carla C. P. Arruda, and Adriano C. M. Baroni*

Cite this: *ACS Infect. Dis.* 2023, *9*, 5, 1150–1159
Publication Date: April 27, 2023
https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00090
Copyright © 2023 American Chemical Society
[Request reuse permissions](#)

Article Views: 242 | Altmetric: - | Citations: -
LEARN ABOUT THESE METRICS

Share | Add to | Export

PDF (3 MB) | Access Through Your Institution | More Access Options | Supporting Info (1) »

SUBJECTS: Assays, Infectious diseases, Lesions, Parasites, Rodent models