

WEMERSON AQUILES DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DO ÁCIDO  
CINÂMICO SOBRE *Leishmania braziliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M543a  
2016 Menezes, Wemerson Aquiles de, 1984-  
Avaliação da ação leishmanicida de derivados do ácido  
cinâmico sobre *Leishmania braziliensis* / Wemerson Aquiles de  
Menezes. – Viçosa, MG, 2016.  
xii, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.38-45.

1. Leishmaniose. 2. Ácido cinâmico. 3. *Leishmania  
braziliensis*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular  
e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 616.9364

WEMERSON AQUILES DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DO ÁCIDO  
CINÂMICO SOBRE *Leishmania braziliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de novembro de 2016.

---

Róbson Ricardo Teixeira

---

Cláudia Vânia Miranda de Oliveira

---

Juliana Lopes Rangel Fietto  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus primeiramente que é o autor e consumidor da minha fé, a quem merece toda honra e glória. Por ter me sustentado com Sua infinita graça, misericórdia, fidelidade e por ter possibilitado a realização desse sonho gerado com muita fé e determinação.

À minha amada mãe Sylvania por todo amor e por nunca medir esforços para me ver bem e feliz. Meu amor pela senhora é indescritível.

Às minhas irmãs Sirdy e Ley que sempre tiveram um carinho enorme por mim, por orarem pela minha vida e celebrar comigo cada vitória conquistada. Amo vocês!

À minha orientadora Juliana Fietto por ter confiado este trabalho a mim e por ter me acolhido tão bem desde a primeira vez em que nos vimos. Obrigado também pela oportunidade que me proporcionou de trabalhar em seu laboratório e pelos ensinamentos. Não teria outra orientadora melhor.

À minha grande amiga Cláudia que é um dos melhores presentes que Deus me deu nesse tempo que vivi em Viçosa. Obrigado por cada palavra de ânimo, encorajamento, confiança e demonstrações de carinho. Sou muito grato a Deus pelos momentos que passamos no laboratório e fora dele. Pelos ensinamentos a cada experimento que fizemos juntos e paciência em responder as inúmeras perguntas que eu fazia. Te guardo em meu coração e levarei nossa amizade com muito amor para sempre.

À Myrian que também me auxiliou várias vezes e pela amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Infectologia Molecular Animal e Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho. Não citarei nomes para não cometer a injustiça de esquecer alguém.

Ao professor Róbson Ricardo e suas alunas Michelle e Déborah que sintetizaram e gentilmente cederam os compostos utilizados nesse trabalho.

Ao senhor Waldir, técnico do Laboratório de Infectologia Molecular Animal que preparou por muitas vezes os materiais que utilizei nos experimentos.

Ao professor Luciano Fietto e seus alunos do Laboratório de Biotecnologia Molecular que permitiram a utilização de equipamentos e materiais durante a realização dos experimentos.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise.

A todos os amigos que conheci na Igreja Batista Sião especialmente o pastor André e Ivone pelo acolhimento, a todos da “Célula” de sexta-feira a noite que fizeram minha estadia em Viçosa espetacular. Vocês chegaram pra ficar na minha vida.

Aos professores do Departamento de Biologia Geral, Departamento de Biologia Celular e Estrutural e Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelos ensinamentos nas disciplinas.

À Universidade Federal de Viçosa.

À Beth, secretária do Departamento de Biologia Celular e Estrutural.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante a realização do curso.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 As leishmanioses: Aspectos gerais.....	1
1.2 O ácido cinâmico .....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana.....	9
2.2 O ciclo biológico do parasito .....	11
2.3 Green Fluorescent Protein (GFP) .....	13
2.4 Fármacos utilizados no tratamento de Leishmanioses .....	13
3 JUSTIFICATIVA.....	17
4 OBJETIVO GERAL.....	18
4.1 Objetivos específicos .....	18
5 MATERIAL E MÉTODOS .....	19
5.1 Cultivo de parasitos .....	19
5.2 Cultivo de macrófagos .....	20
5.3 Compostos derivados do ácido cinâmico.....	21
5.4 Teste de solubilidade dos compostos em meio RPMI 1640 .....	21
5.5 Utilização da resazurina.....	22
5.6 Curva de crescimento de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> M2904 GFP.....	22
5.7 Ensaio de citotoxicidade de derivados do ácido cinâmico em macrófagos RAW 264.7 .....	23

5.8 Ensaio de citotoxicidade de derivados do ácido cinâmico em promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> M2904 GFP .....	24
5.9 Ensaio <i>in vitro</i> de infecção de macrófagos por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> M2904 GFP .....	25
5.10 Análise de dados .....	27
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
6.1 Teste de solubilidade de compostos em meio RPMI 1640 .....	28
6.2 Curva de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> M2904 GFP .....	29
6.3 Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em macrófagos RAW 264.7 .....	30
6.4 Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> M2904 GFP .....	32
6.5 Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em amastigotas intracelulares de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> no ensaio <i>in vitro</i> de infecção em macrófagos RAW 264.7 .....	34
7 CONCLUSÃO .....	37
REFERÊNCIAS .....	38
ANEXO I .....	46

## LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figura 1: Fórmula estrutural do ácido cinâmico .....	3
Figura 2: Distribuição geográfica da Leishmaniose cutânea no mundo .....	10
Figura 3: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> ssp .....	12
Gráfico 1: Curva de crescimento de <i>L. (Viannia) braziliensis</i> M2904 GFP ..	29
Gráfico 2: Avaliação de efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em macrófagos da linhagem RAW 264.7 .....	31
Gráfico 3: Avaliação de efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em macrófagos da linhagem RAW 264.7 .....	31
Gráfico 4: Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em promastigotas de <i>L. (Viannia) braziliensis</i> cepa M2904 GFP .....	32
Gráfico 5: Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em promastigotas de <i>L. (Viannia) braziliensis</i> cepa M2904 GFP .....	33
Gráfico 6: Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em amastigotas intracelular de <i>L. (Viannia) braziliensis</i> em macrófagos da linhagem RAW 264.7 .....	35
Gráfico 7: Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em amastigotas intracelular de <i>L. (Viannia) braziliensis</i> em macrófagos da linhagem RAW 264.7 .....	35
Tabela 1: Compostos solúveis em meio aquoso .....	4
Tabela 2: Compostos solúveis em meio aquoso .....	5
Tabela 3: Compostos solúveis em meio aquoso .....	6
Tabela 4: Compostos solúveis em meio aquoso .....	7
Tabela 5: Compostos solúveis em meio aquoso .....	8
Tabela 6: Fórmulas estruturais dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses .....	16
Tabela 7: Compostos solúveis e insolúveis em meio aquoso .....	28

Tabela 8: Dias relacionados à fase de crescimento em que os parasitos foram obtidos para a realização dos experimentos.....	30
Tabela 9: Compostos insolúveis em meio aquoso.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO: Dimetilsulfóxido

GFP: Green Fluorescent Protein

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

PBS: Phosphate Buffered Saline

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

UFV: Universidade Federal de Viçosa

WHO: World Health Organization

$\mu\text{L}$ : Microlitro

$\mu\text{M}$ : Micromolar

## RESUMO

MENEZES, Wemerson Aquiles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2016. **Avaliação da ação leishmanicida de derivados do ácido cinâmico sobre *Leishmania braziliensis***. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto.

As Leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e suas manifestações clínicas podem ser do tipo Leishmaniose Cutânea, Leishmaniose Mucocutânea e Leishmaniose Visceral. Constitui importante problema de saúde pública sendo endêmicas em 88 países com aproximadamente 12 milhões de infectados. Para o tratamento são utilizados os antimoniais pentavalentes e como medicação alternativa, a Anfotericina B e Pentamidina. O arsenal terapêutico é bastante limitado, vários medicamentos têm efeitos colaterais significativos e os parasitos muitas vezes são resistentes às drogas disponíveis. Baseado na necessidade do desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das Leishmanioses, neste presente trabalho foi testado o potencial leishmanicida de trinta e um compostos derivados do ácido cinâmico contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*, agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana no Novo Mundo. Dentre esses compostos, vinte e um contém o núcleo 1,2,3-triazólico e quatro contém uma porção izobenzofuranona. A triagem inicial foi feita em macrófagos utilizando os compostos na concentração de 10  $\mu$ M e nenhum deles apresentou efeito tóxico. No ensaio de citotoxicidade direta sobre formas promastigotas, após 48 horas, um deles, o (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila, identificado como S2, apresentou taxa de 52,25% de inibição de crescimento dos parasitos, valor aproximado do efeito da droga controle Anfotericina B (46,62%). Em ensaios de infecção do parasito em macrófagos, após 72 horas, quatro compostos: Cinamato de (1-(2,5-diclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila (MP05), Cinamato de (1-(2,4,6-triclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila (MP06), Cinamato de (1-(4-metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila (MP25) e novamente o (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila (S2), inibiram a sobrevivência de amastigotas em

78,98%, 80,12%, 76% e 70,89% respectivamente. Conforme os resultados obtidos, tais compostos mostram-se potenciais para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.

## ABSTRACT

MENEZES, Wemerson Aquiles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2016. **Evaluation of the leishmanicidal action of cinnamic acid derivatives on *Leishmania braziliensis***. Advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Leishmaniasis are parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and its clinical manifestations may be of the Cutaneous Leishmaniasis type, Mucocutaneous Leishmaniasis and Visceral Leishmaniasis. It is an important public health problem and it has been endemic in 88 countries with approximately 12 million infected people. For the treatment, pentavalent antimonials are used and as an alternative medication, they use amphotericin B and pentamidine. The therapeutic arsenal is quite limited, several drugs have significant side effects and the parasites are often resistant to the available drugs. Based on the need for the development of new drugs for the treatment of Leishmaniasis, in this present work the leishmanicidal potential of thirty-one acid cinnamic derived compounds against *Leishmania (Viannia) braziliensis*, etiological agent of American Cutaneous Leishmaniasis in the New World, was tested. Among these compounds, twenty-one contains the 1,2,3-triazole nucleus and four contains an isobenzofuranone portion. Initial screening was done on macrophages by using the compounds at the concentration of 10  $\mu$ M and none of them showed a toxic effect. In the direct cytotoxicity assay on promastigote forms, after 48 hours, one of them, (E) -3- (3,4,5-trimethoxyphenyl) acrylate 3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl, identified as S2, presented a 52.25% rate of inhibition of parasite growth, the approximate value of the control drug Amphotericin B (46.62%). In parasite infection trials on macrophages, after 72 hours, four compounds: (1- (2,5-Dichlorobenzyl) -1H-1,2,3-triazol-4-yl) methyl cinnamate (MP05), Cinnamate (1- (2,4,6-trichlorobenzyl) -1H-1,2,3-triazol-4-yl) methylamine (MP06), 1- (4-Methoxybenzyl) -1H-1,2,3- 4-yl) methylamine (MP25) and (E) -3- (3,4,5-trimethoxyphenyl) acrylate 3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl (E2) refrained the survival of amastigotes in 78.98%, 80.12%, 76% and 70.89% respectively. According to the obtained

results, such compounds are shown to be potential for the treatment of American Cutaneous Leishmaniasis.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 As Leishmanioses: aspectos gerais

Os protozoários do gênero *Leishmania*, pertencem à ordem *Kinetoplastida* e à família Trypanosomatidae. Eles são organismos unicelulares, digenéticos e encontram-se nas formas promastigota, alongados com flagelados livres ou aderidos no trato digestório dos hospedeiros invertebrados e podem ser ainda amastigotas, parasitos intracelulares obrigatórios de formato arredondado e sem flagelo (Michalick & Ribeiro, 2011). Estes protozoários são transmitidos através da picada de insetos fêmeas do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Neuber, 2008).

Para definir as espécies do gênero *Leishmania*, Laison e Shaw (1987) propuseram uma classificação em que reúnem os parasitos de répteis em um gênero separado e a organização de espécies que parasitam o homem em dois subgêneros:

- 1- o subgênero *Leishmania* em que o desenvolvimento nos insetos vetores se limitam nas regiões média e anterior do intestino, como por exemplo, *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*;
- 2- o subgênero *Viannia* cujos parasitos do homem e de outros mamíferos se apresentam no inseto a forma promastigota livre e que migra da região posterior para as regiões média e anterior do intestino, por exemplo, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) panamensis* (Michalick & Ribeiro, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, mais de 20 espécies de *Leishmania* são infecciosas para os seres humanos (WHO, 2016) e a transmissão das leishmanioses envolve diferentes espécies de insetos fêmeas de flebotomíneos e hospedeiros mamíferos, sendo que o homem é considerado hospedeiro acidental (Gontijo & Carvalho, 2003).

As leishmanioses são doenças parasitárias que ocorriam no meio silvestre, mas devido as ações antrópicas na natureza sua distribuição geográfica foi ampliada e atualmente ocorrem de forma endêmica nas regiões urbanas e periurbanas facilitando sua propagação entre humanos (Marzochi *et al.*, 2009; Colla-Jacques *et al.*, 2010).

Em relação às manifestações clínicas as leishmanioses podem se apresentar das seguintes formas: a leishmaniose visceral que é conhecida como calazar sendo considerada a forma mais grave da doença, a leishmaniose cutânea que é considerada a mais comum e a leishmaniose mucocutânea (WHO, 2016).

As leishmanioses constituem um grande problema de saúde pública (Rotureau, 2006) e como inúmeras outras doenças tropicais, elas são consideradas doenças negligenciadas (Lima, 2007). De forma geral, geram custos muito elevados ao sistema de saúde, pois, são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade e morbidade humana nos países que se encontram em desenvolvimento (Lindoso & Lindoso, 2009).

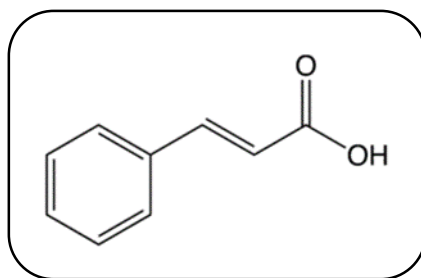
A dificuldade de combater os flebotomíneos e a ausência de vacinas eficazes contra leishmanioses torna o tratamento medicamentoso como sendo a única alternativa de combate a esses agravos de saúde, porém, o arsenal quimioterápico disponível para o tratamento é escasso, seus efeitos colaterais são altos, sua eficácia é limitada, além disso os parasitos podem se tornar resistentes aos quimioterápicos (Lindoso & Lindoso, 2009).

Com isso, na busca por contribuir para o tratamento da leishmaniose, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial leishmanicida de diferentes compostos derivados do ácido cinâmico (Figura 1) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa M2904 GFP, que é um dos agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. Foram testados 31 compostos, sendo que 21 dentre eles possuem o núcleo 1,2,3-triazólico e 4 possuem uma porção isobenzofuranona.

## 1.2 O ácido cinâmico

Também denominado ácido 3-fenil-2-propenóico, o ácido cinâmico está presente em muitos vegetais (Sharma, 2011; Sova, 2012) como grãos de café, mate, cacau, maçãs, peras, frutas cítricas, uva, espinafre, beterraba, alcachofra, batata, tomate, aipo, feijão fava (Clifford, 1999). Ele pertence à classe das auxinas que são hormônios vegetais responsáveis pela regulação do crescimento e diferenciação celular (DE *et al.*, 2011).

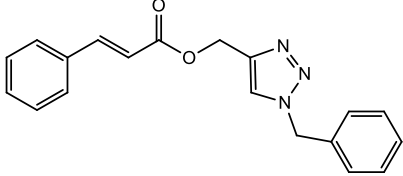
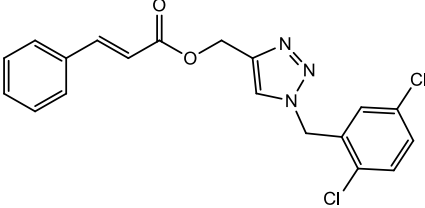
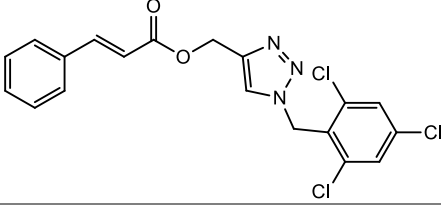
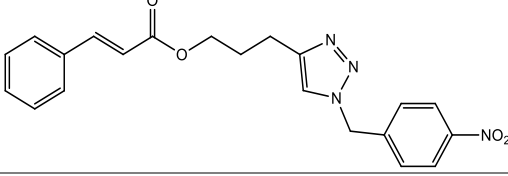
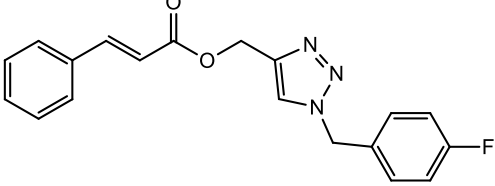
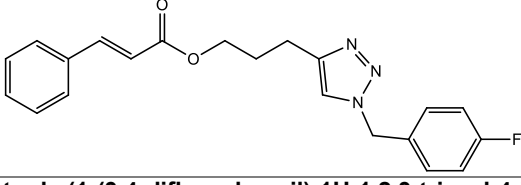
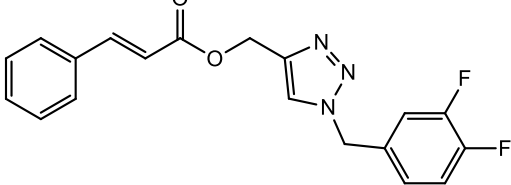
Além disso, o ácido cinâmico e os seus derivados desempenham importante papel na produção de fármacos (Sharma, 2011) devido às suas atividades biológicas as quais pode-se citar seus efeitos citotóxicos contra células tumorais (Lee *et al.*, 2003; DE *et al.*, 2011) além de atividade antibacteriana, antifúngica e leishmanicida (Chiriac *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2006 ).



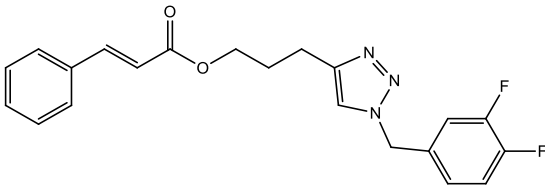
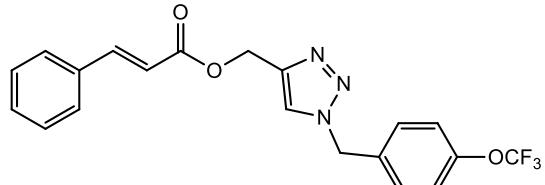
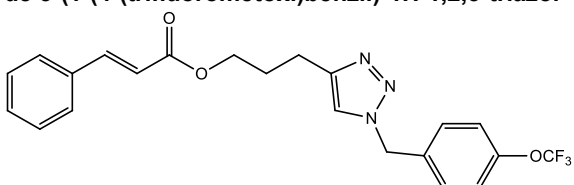
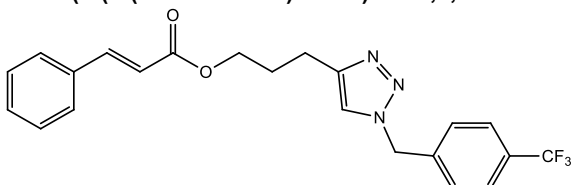
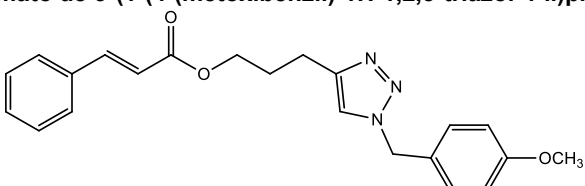
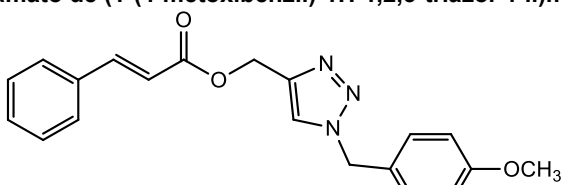
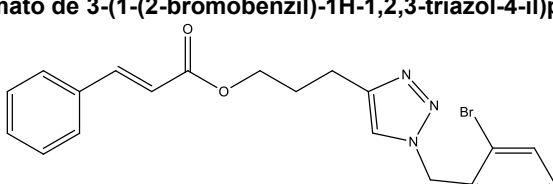
**Figura 1: Fórmula estrutural do ácido cinâmico. Fonte:** Sova, 2012.

Nas tabelas a seguir estão representados os nomes, as fórmulas estruturais e os códigos dos quais são identificados todos os compostos utilizados neste trabalho.

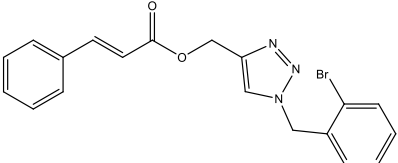
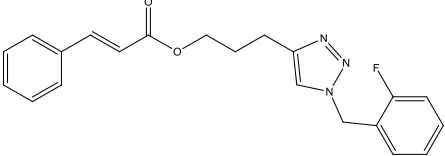
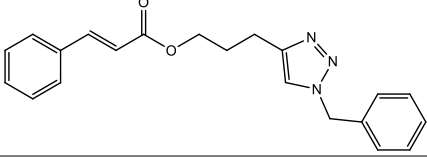
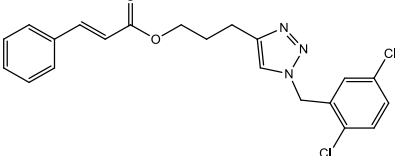
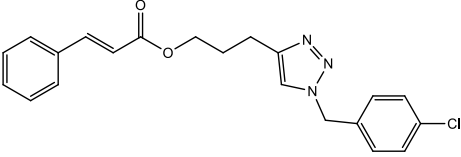
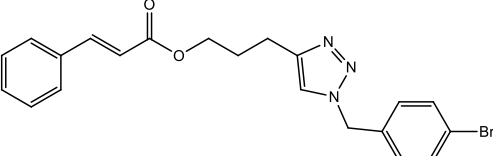
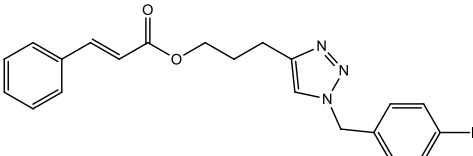
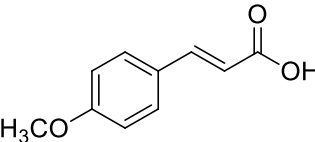
**Tabela 1: Compostos solúveis em meio aquoso**

Nome e fórmula estrutural dos compostos	Código
Cinamato de (1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP04
	
Cinamato de (1-(2,5-diclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP05
	
Cinamato de (1-(2,4,6-triclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP06
	
Cinamato de 3-(1-(4-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	MP10
	
Cinamato de (1-(4-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP14
	
Cinamato de 3-(1-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	MP15
	
Cinamato de (1-(3,4-difluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP16
	

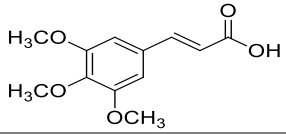
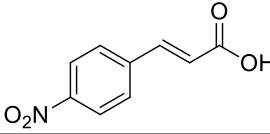
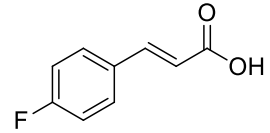
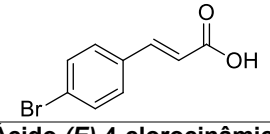
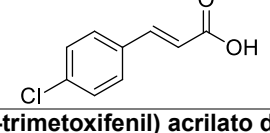
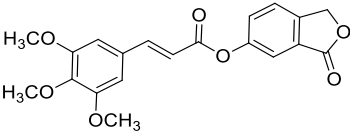
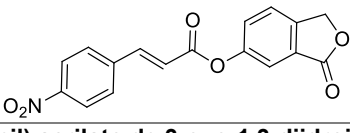
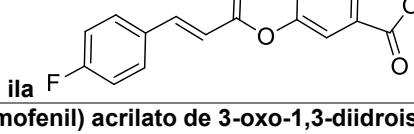
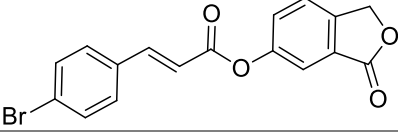
**Tabela 2: Compostos solúveis em meio aquoso**

Nome e fórmula estrutural dos compostos	Código
Cinamato de 3-(1-(3,4-difluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	MP17
 <p>The structure shows a cinnamate ester group (trans-3-phenylacrylate) attached to the 4-position of a 1,2,3-triazole ring. The 1-position of the triazole is substituted with a benzyl group that has fluorine atoms at the 3 and 4 positions of the phenyl ring.</p>	MP17
Cinamato de (1-(4-(trifluorometoxi)benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP18
 <p>The structure shows a cinnamate ester group attached to the 4-position of a 1,2,3-triazole ring. The 1-position of the triazole is substituted with a benzyl group that has a trifluoromethoxy group (-OCF<sub>3</sub>) at the 4-position of the phenyl ring.</p>	MP18
Cinamato de 3-(1-(4-(trifluorometoxi)benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	MP19
 <p>The structure shows a cinnamate ester group attached to the 4-position of a 1,2,3-triazole ring. The 1-position of the triazole is substituted with a benzyl group that has a trifluoromethoxy group (-OCF<sub>3</sub>) at the 4-position of the phenyl ring.</p>	MP19
Cinamato de 3-(1-(4-(trifluorometil)benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	MP21
 <p>The structure shows a cinnamate ester group attached to the 4-position of a 1,2,3-triazole ring. The 1-position of the triazole is substituted with a benzyl group that has a trifluoromethyl group (-CF<sub>3</sub>) at the 4-position of the phenyl ring.</p>	MP21
Cinamato de 3-(1-(4-(metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	MP24
 <p>The structure shows a cinnamate ester group attached to the 4-position of a 1,2,3-triazole ring. The 1-position of the triazole is substituted with a benzyl group that has a methoxy group (-OCH<sub>3</sub>) at the 4-position of the phenyl ring.</p>	MP24
Cinamato de (1-(4-metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP25
 <p>The structure shows a cinnamate ester group attached to the 4-position of a 1,2,3-triazole ring. The 1-position of the triazole is substituted with a benzyl group that has a methoxy group (-OCH<sub>3</sub>) at the 4-position of the phenyl ring.</p>	MP25
Cinamato de 3-(1-(2-bromobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	MP30
 <p>The structure shows a cinnamate ester group attached to the 4-position of a 1,2,3-triazole ring. The 1-position of the triazole is substituted with a benzyl group that has a bromine atom at the 2-position of the phenyl ring.</p>	MP30

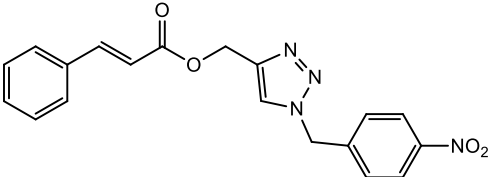
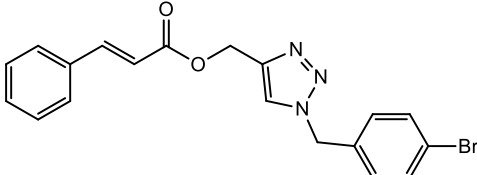
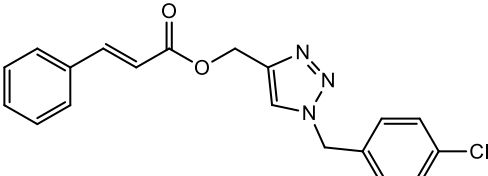
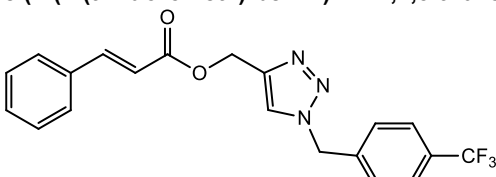
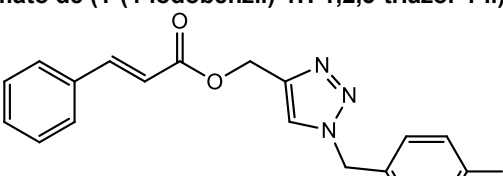
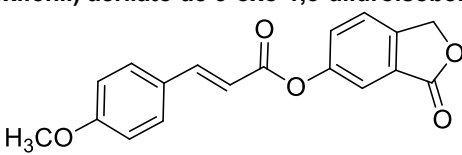
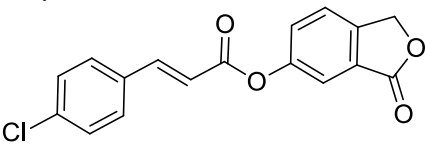
**Tabela 3: Compostos solúveis em meio aquoso**

Nome e fórmula estrutural dos compostos	Código
Cinamato de (1-(2-bromobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP31
	MP31
Cinamato de 3-(1-(2-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	MP33
	MP33
Cinamato de 3-(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	JFA 02
	JFA 02
Cinamato de 3-(1-(2,5-diclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	JFA 03
	JFA 03
Cinamato de 3-(1-(4-clorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	JFA 04
	JFA 04
Cinamato de 3-(1-(4-bromobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	JFA 05
	JFA 05
Cinamato de 3-(1-(4-iodobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propila	JFA 06
	JFA 06
Ácido (E)-4-metoxicinâmico	K1
	K1

**Tabela 4: Compostos solúveis em meio aquoso**

Nome e fórmula estrutural dos compostos	Código
<p>Ácido (<i>E</i>)-3,4,5-trimetoxicinâmico</p> 	K2
<p>Ácido (<i>E</i>)-4-nitrocinnâmico</p> 	K6
<p>Ácido (<i>E</i>)-4-fluorocinnâmico</p> 	K7
<p>Ácido (<i>E</i>)-4-bromocinnâmico</p> 	K9
<p>Ácido (<i>E</i>)-4-clorocinnâmico</p> 	K10
<p>(<i>E</i>)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila</p> 	S2
<p>(<i>E</i>)-3-(4-nitrofenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila</p> 	S6
<p>(<i>E</i>)-3-(4-fluorofenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila</p> 	S7
<p>(<i>E</i>)-3-(4-bromofenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila</p> 	S9

**Tabela 5: Compostos solúveis em meio aquoso**

Nome e fórmula estrutural dos compostos	Código
Cinamato de (1-(4-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP07
	
Cinamato de (1-(4-bromobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP08
	
Cinamato de (1-(4-clorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP09
	
Cinamato de (1-(4-(trifluorometil)-benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP20
	
Cinamato de (1-(4-iodobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila	MP29
	
(E)-3-(4-metoxifenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila	S1
	
(E)-3-(4-clorofenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila	S10
	

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

As leishmanioses são doenças parasitárias endêmicas em 88 países de quatro continentes. Afetam aproximadamente 12 milhões de indivíduos, contabilizam anualmente cerca de 2 milhões de casos novos e 70 mil óbitos (WHO, 2010). A maior incidência dessas doenças ocorre em áreas mais pobres das regiões endêmicas (Davies *et al.*, 2003) e está associada ao deslocamento da população, condições precárias de habitação, sistema imunológico fraco e falta de recursos (WHO, 2016).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a Leishmaniose Cutânea é a mais amplamente distribuída com cerca de um terço dos casos ocorrendo nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Ásia Ocidental e Ásia Central (Figura 1). Juntamente com o Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Peru, Índia, Bangladesh e Nepal, o Brasil integra o grupo de países que concentra 90% de todos os casos registrados de leishmanioses (Gontijo & Carvalho, 2003; Mishra *et al.*, 2009, WHO, 2016).

Na América Latina, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma zoonose de alta prevalência, com incidência em todas as faixas etárias e acomete homens e mulheres semelhantemente (Desjeux, 2001).

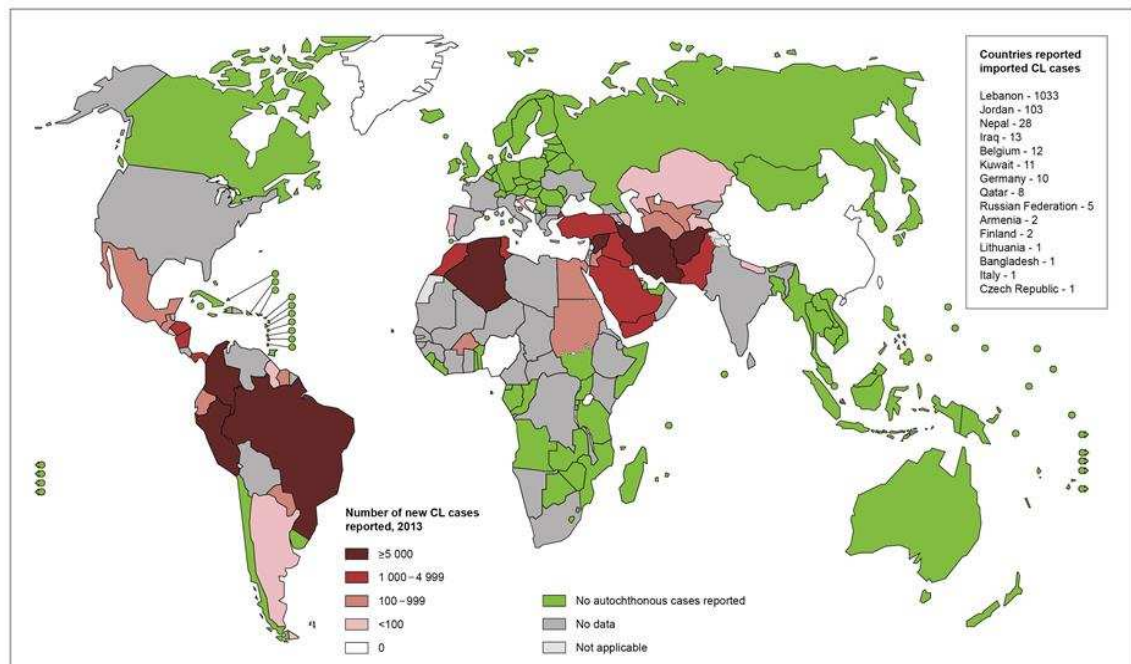
No Brasil, é uma doença infecto-parasitária causada por uma variedade de espécies de *Leishmania* das quais se destacam a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Leishmania) amazonenses* (Reis & Gontijo, 2011). Grande parte das infecções ocorre entre animais silvestres, normalmente roedores, mas os ciclos de transmissão estão se adaptando ao peridomicílio e com isso, se espalhando para áreas não endêmicas (Desjeux 2001, Gontijo & Carvalho 2003, Lindoso, 2009).

Quanto aos aspectos clínicos, a Leishmaniose Tegumentar Americana pode ser caracterizada por úlceras que se apresentam de forma localizada ou com lesões distribuídas pelo corpo (Rey, 2008).

Apesar de a maioria dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana se apresentar de forma cutânea, a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, pode ocasionar também a forma mucocutânea (Lindoso, 2009), que acomete a região urofagiana principalmente o septo nasal e possui natureza metastática, ocasionando a destruição de mucosas e cartilagem (Rey, 2008).

As medidas de prevenção da doença são muito importantes e dentre elas pode-se destacar: o combate à população de flebotomíneos, atividades de educação em saúde (Gontijo & Carvalho, 2003), utilização de telas de proteção contra insetos em janelas, uso de repelentes e a construção de residências com certa distância das matas (Desjeux, 1996).

**Figura 1: Distribuição geográfica da Leishmaniose cutânea no mundo.**



**Fonte:** [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_2013\\_CL.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_CL.png).  
Acesso em 05 de Setembro de 2016.

## 2.2 O ciclo biológico do parasito

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios, digenéticos (heteróxeos) e são, portanto, encontrados na forma promastigota livre no interior do trato digestivo ou aderidos ao epitélio intestinal dos hospedeiros invertebrados e na forma amastigota, no interior das células do hospedeiro vertebrado (Sacks & Kamhawi, 2001), principalmente nos macrófagos residentes na pele (Reis & Gontijo 2011).

A infecção do vetor ocorre quando a fêmea do flebotomíneo pica o vertebrado ao exercer o repasto sanguíneo ingerindo macrófagos parasitados por formas amastigotas (Figura 2). Durante o percurso pelo trato digestivo anterior ou ao chegarem ao estômago, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas.

O sangue ingerido é envolvido por uma membrana peritrófica secretada pelas células estomacais do inseto e no interior dessa membrana, as amastigotas sofrem divisão binária e posteriormente se transformam em promastigotas procíclicas que também se multiplicam por sucessivos processos de divisão binária.

Após três ou quatro dias, essa membrana peritrófica se rompe e as formas promastigotas tornam-se livres. Dirigem-se então, para o intestino posterior se estabelecendo na região do piloro e íleo onde permanecem aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal por meio de hemidesmossomos. Após essa etapa no intestino posterior, elas migram em direção à faringe e pelo processo denominado metaciclogênese, elas se transformam em formas promastigotas metacíclicas infectantes (Reis & Gontijo, 2011).

Já a infecção do hospedeiro vertebrado ocorre durante a alimentação da fêmea do flebotomíneo infectada. Como a porção anterior do tubo digestivo do inseto se encontra repleta de parasitos flagelados na forma promastigota metacíclica, ao ingerir o sangue, eles são regurgitados no local da picada e infectam o hospedeiro vertebrado.

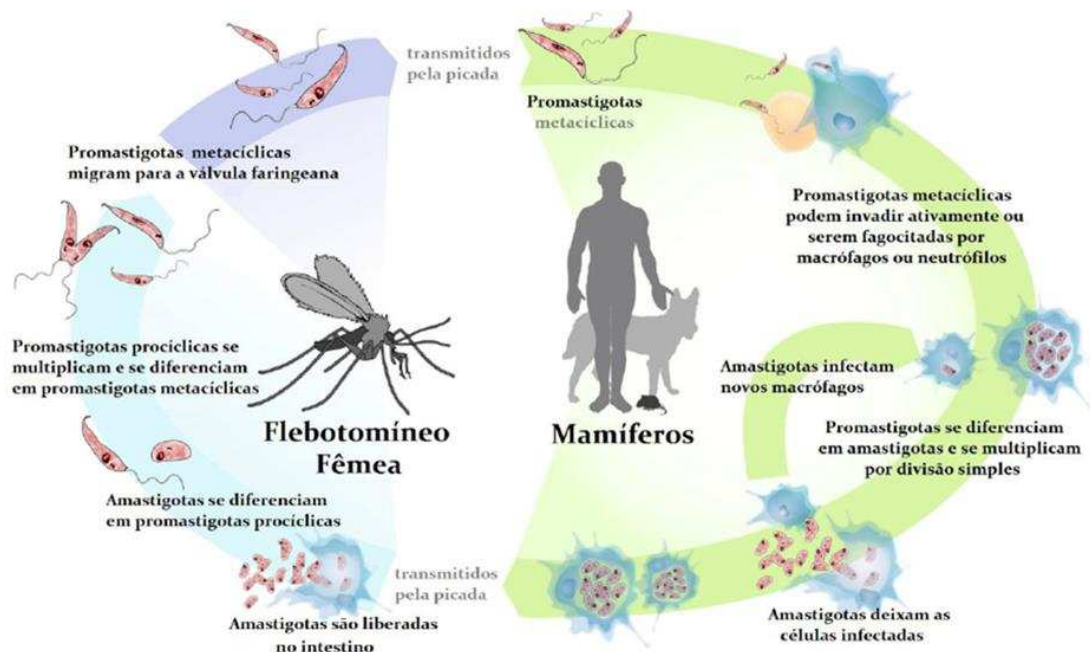
Essas promastigotas interagem com a membrana dos macrófagos que estendem seus pseudópodes e envolvem o parasito, introduzindo-o para dentro do vacúolo fagocitário. Ali, eles sofrem diversas mudanças

bioquímicas, fisiológicas e morfológicas diferenciando-se em formas amastigotas, arredondadas e com flagelo retraído (Reis & Gontijo, 2011).

Posteriormente, ocorre a fusão do vacúolo fagocitário com os lisossomos, originando o vacúolo fagolisossomal, no qual o parasito permanece em um ambiente hostil, que contém enzimas lisossomais, metabólitos reativos do oxigênio, citocinas e produção de óxido nítrico (Cunningham, 2002).

Adaptada para sobreviver neste ambiente, a *Leishmania* é capaz de inibir diversos mecanismos de defesa celular responsáveis por causar a destruição do parasito e então se multiplica por divisão binária ocupando todo o citoplasma até levar a ruptura da célula infectada e liberar formas amastigotas no tecido que serão fagocitadas por outros macrófagos (Peters, 2008) e iniciará no local da picada, um processo inflamatório (Reis & Gontijo, 2011).

**Figura 2: Ciclo biológico da *Leishmania ssp.***



**Fonte:** [www.canalciencia.ibict.br/pesquisa0295\\_A\\_caminho\\_da\\_cura\\_da\\_leishmaniose\\_visceral\\_canina.html](http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_visceral_canina.html). Acesso em 05 de Novembro de 2016.

### 2.3 Green Fluorescent Protein (GFP)

A Green Fluorescent Protein (GFP), descoberta em 1961 pelos pesquisadores Shimomura e Johnson, foi isolada do cnidário *Aequorea victoria*, uma espécie de água-viva (Shimomura, 2009).

É uma proteína composta por 238 aminoácidos (Chalfie *et al.*, 1994) que tem sido expressa em fungos, bactérias, plantas, protozoários e mamíferos (Yang *et al.*, 1996). Quando expressa nas células de qualquer um desses organismos, produz fluorescência verde após a excitação das células por luz azul ou ultravioleta (Misteli & Spector, 1997).

A fusão da GFP ao genoma da *Leishmania*, facilitou o monitoramento de ensaios *in vitro* e *in vivo* de infecção desse parasito para a avaliação de fármacos leishmanicidas (HA *et al.* 1996; Singh & Dube, 2004; Souza *et al.*, 2007) tornando vantajoso o uso de *Leishmania* expressando GFP pelo fato de ser um método que permite medir a intensidade de fluorescência emitida (Kamau *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2003).

Os parasitos utilizados neste trabalho são da espécie *Leishmania braziliensis* GFP cepa M2904 (Bastos *et al.* 2017).

### 2.4 Fármacos utilizados no tratamento de Leishmanioses

As drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (Tabela 6), inclusive contra Leishmaniose Tegumentar Americana, são os antimoniais pentavalentes (Reis & Gontijo, 2011), porém, a eficácia desses fármacos depende de alguns fatores como: a espécie de *Leishmania* e da resistência do parasito ao medicamento, faixa etária, disseminação e localização da lesão, toxicidade ao fármaco e também o estado imunológico do paciente (Gonzalez *et al.*, 2008).

Atualmente são utilizados os seguintes fármacos: Glucantime, um antimonial pentavalente com vários efeitos colaterais (Balanã-Fource *et al.*, 1998), a Paromomicina, que consiste em um aminoglicosídeo de formulações tópica e parenteral, sendo que a administração parenteral é mais eficiente, a Pentamidina, cujos mecanismos de ação incluem a alteração

morfológica do citoesqueleto, fragmentação da mitocôndria e interferência na síntese do DNA do parasito (David & Craft, 2009).

A Anfotericina B também é utilizada no tratamento. É um antibiótico macrolídeo do grupo de antimicrobianos quimicamente constituídos por um anel macrocíclico de lactona, ao qual ligam-se um ou mais açúcares e cuja ação baseia-se no metabolismo de esteróis de *Leishmania* e fungos. Os macrolídeos ligam-se aos esteróis e criam poros na membrana, mudando a permeabilidade celular, que levam à morte do parasito (Balaña-Fouce *et al.*, 1998; Croft *et al.*, 2006) e que também causa vários efeitos colaterais ao paciente (Mishra *et al.*, 2007).

Outro medicamento, que originalmente é utilizado no tratamento de câncer, foi liberado para o uso em pacientes com leishmaniose, é um lisofosfolípido chamado Miltefosina, que na Índia mostra excelentes resultados no tratamento da leishmaniose visceral (Croft *et al.*, 2006), induzindo a morte do parasito por apoptose (Croft *et al.*, 1996; Mishra *et al.*, 2007). Sabe-se ainda que os antifúngicos como cetoconazol e fluconazol também possuem atividade leishmanicida (Croft *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2008).

Os antimoniais pentavalentes são administrados de forma intramuscular, podendo ainda ser endovenoso ou local, porém, apresenta limitações para pacientes cardíacos porque provoca alterações eletrocardiográficas e para gestantes pois são abortivos (Reis & Gontijo, 2011).

Mesmo os antimoniais pentavalentes sendo os fármacos de primeira escolha para a maioria dos casos de leishmaniose, eles apresentam várias desvantagens para o tratamento como por exemplo, após sua administração é necessário um período entre 21 a 28 dias para que esses medicamentos se acumulem nos tecidos (Chulay *et al.*, 1988).

Além disso, o seu potencial tóxico para o fígado, coração e rins aliado a efeitos colaterais como dores musculares, leva o paciente à redução, interrupção ou abandono da quimioterapia antes do seu término (Demicheli *et al.*, 2005). Com isso, as drogas e os cuidados médicos necessários causados pelos efeitos colaterais, elevam o custo do tratamento (Croft *et al.*, 2006).

Deve-se também levar em conta que grande parte dos casos ocorre em áreas de difícil acesso, o que dificulta tanto a aplicação da droga como o monitoramento de seus efeitos colaterais (Berman, 1997).

**Tabela 6: Fórmulas estruturais dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.**

	<p>Isetionato de pentamidina</p>
<p>Lomidina</p>	
	<p>Anfotericina B</p>
	<p>Fungizone</p>
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	<p>Miltefosine</p>
	<p>Paromomicina</p>
	<p>Humatin</p>
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\   \\ \text{HCOH} \\   \\ \text{HOCH} \\   \\ \text{HCOH} \\   \\ \text{HCOH} \\   \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^-$	<p>Antimoniato de N-metilglucamina</p> <p>Glucantime<sup>®</sup>; Antimoniato de meglumina</p>

Fonte: Rath et al., 2003.

### 3 JUSTIFICATIVA

A quimioterapia é considerada o pilar para o controle da maioria das doenças parasitárias como é o caso das leishmanioses principalmente por não se dispor de vacinas (Kouni, 2003) e possuir o arsenal terapêutico muito limitado.

Apesar do tratamento ter como base os antimoniais pentavalentes, eles apresentam alto custo e alta toxicidade. Deve-se levar em consideração também os diversos efeitos colaterais por exemplo: distúrbios gastrointestinais, cefaleias, alterações renais e hepáticas, erupção cutânea dentre outras (Nogueira & Sampaio, 2001).

Essas drogas são também contraindicadas para recém-nascidos, gestantes e idosos (Mayrink *et al.*, 2006).

O uso dos medicamentos disponíveis apresenta também como desvantagem o aumento de cepas resistentes aos antimoniais e a outros medicamentos (Rath *et al.*, 2003).

Como segunda escolha, em casos não responsivos aos antimoniais, são utilizados fármacos como a Anfotericina B e a Pentamidina.

Baseado nesse contexto, é muito importante a busca por novos medicamentos que facilitam o tratamento de todas as formas de leishmaniose.

## 4 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal, testar compostos derivados do ácido cinâmico quanto a ação leishmanicida que possam ser usados para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.

### 4.1 Objetivos específicos:

- Testar a citotoxicidade dos compostos em Macrófagos RAW 264.7;
- Testar os compostos quanto a ação citotóxica direta contra promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* M2904 GFP;
- Testar os compostos quanto a ação leishmanicida anti-amastigota em infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania (Viannia) braziliensis* M2904 GFP.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Cultivo de parasitos

Os parasitos utilizados neste trabalho foram *Leishmania (Viannia) braziliensis* GFP cepa M2904. Eles foram mantidos no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

A cada 4 dias, a cultura de promastigotas *in vitro* era homogeneizada com pipeta graduada de vidro, uma alíquota era retirada e feita uma diluição de 1:10 em Formalina 4% e os parasitos eram contados em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz (Leica) com objetivas invertidas. Após a contagem, a concentração era ajustada para  $1 \times 10^5$  parasitos por mL.

A cultura era mantida com 10 mL de meio de cultura Grace's Insect Medium (Gibco) pH 6,5 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), Penicilina (2mg/mL) e L-Glutamina (200 mM). Os parasitos eram acondicionados em garrafas acrílicas estéreis (25 cm<sup>3</sup>), descartáveis e mantidos em estufa na temperatura de 25 °C.

Os parasitos foram congelados em fase exponencial na concentração de  $2,5 \times 10^6$  parasitos por mL, centrifugados a 3000 rpm, 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado suspenso em meio de congelamento contendo 7,5% de DMSO e meio de cultura Grace's Insect Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foi estocado por 2 horas a -4 °C, 24 horas a -20 °C e posteriormente armazenado em nitrogênio líquido.

O descongelamento consistia em retirar do nitrogênio líquido o microtubo contendo os parasitos e deixá-lo em temperatura ambiente por até uma hora que em seguida eram inoculados em 10 mL de meio de cultura Grace's Insect Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e mantido em estufa a 25 °C. Os parasitos eram utilizados em experimentos a partir da 3<sup>a</sup> passagem após o descongelamento e até mais ou menos a 20<sup>a</sup> passagem observando que a fluorescência manteve-se estável durante todas essas passagens celulares.

## 5.2 Cultivo de macrófagos

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram mantidos em meio de cultura de células RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), Penicilina (2 mg/ mL), L-Glutamina (200 mM), Hepes (1M) e Bicarbonato de Sódio (Sigma).

Para manutenção da cultura, eram retirados 8 mL do meio RPMI e descartados ficando 2 mL no interior da garrafa. Com o auxílio de um espalhador de células, estas eram desprendidas da parede da garrafa. Após desprender as células, era homogeneizado com pipeta de vidro e transferido para um falcon.

Em seguida, uma alíquota da cultura era retirada e diluída em Tampão Fosfato Salino (PBS) e Azul de Trypan 4% para avaliação da viabilidade celular. As células eram contadas em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio de luz (Leica) com objetivas invertidas.

Após a contagem, a concentração das células era ajustada para  $1 \times 10^5$  células por mL, inoculada *in vitro* em 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e em seguida, acondicionada em garrafa acrílica estéril (75 cm<sup>3</sup>), descartável e mantida em estufa úmida a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Esse procedimento era repetido a cada 4 dias.

Foram congeladas  $2,5 \times 10^6$  células por mL, centrifugadas a 1200 rpm, 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado suspenso em meio de congelamento contendo 6% de DMSO e meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foi estocado por 2 horas a -4 °C, 24 horas a -20 °C e posteriormente armazenado em nitrogênio líquido.

O descongelamento consistia em retirar do nitrogênio líquido o microtubo contendo os macrófagos e deixá-lo em temperatura ambiente por até uma hora, em seguida era inoculado em 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantido em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Os macrófagos eram utilizados nos experimentos à partir da segunda ou terceira semana após o descongelamento.

### **5.3 Compostos derivados do ácido cinâmico**

Os compostos utilizados nesse trabalho foram sintetizados no Laboratório de Química Supramolecular e Biomimética do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa e gentilmente cedidos pelo professor Dr. Róbson Ricardo Teixeira.

Os compostos chegaram ao nosso laboratório na forma sólida, acondicionados em tubos eppendorfs e para serem testados, foram diluídos em Dimetilsulfóxido 100% (DMSO) ficando na concentração estoque de 10 mM, devidamente identificados e congelados a -20 °C. Para o uso, uma alíquota foi diluída 5x novamente em Dimetilsulfóxido 100% (DMSO) passando para a concentração de 2mM e em todos os ensaios, foi utilizado 1 µL (descrito a seguir) ficando então na concentração final de 10µM.

Neste trabalho foram testados 31 compostos derivados do ácido cinâmico, sendo que 21 deles contém núcleo triazólico e 4 contém uma porção isobenzoforanona. A fórmula estrutural de todos os compostos foi demonstrada na introdução deste trabalho.

### **5.4 Teste de solubilidade dos compostos em meio RPMI 1640**

Ao diluir os compostos para armazená-los em estoque, observou-se que alguns dos mesmos precipitavam em meio aquoso, portanto, foi realizado um teste de solubilidade dos 38 compostos disponibilizados.

Em uma placa de 96 poços foram pipetados 200 µL de meio de cultura RPMI 1640. Determinou-se como controle o poço em que continha somente meio de cultura, nos demais, foi pipetado 1µL de cada composto diluído em DMSO 100% (Dimetilsulfóxido) a 2mM (a mesma quantidade e concentração final utilizada nos ensaios - 10 µM) e posteriormente a placa foi incubada em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

A presença ou não de cristais formados foi analisada ao microscópio de luz (Leica) em 24, 48 e 72 horas. Após as 72 horas de incubação, os compostos que permaneceram cristalizados, foram descartados não sendo utilizados nos experimentos.

## 5.5 Utilização de resazurina

A resazurina (Alamar Blue®) é um corante de indicação da proliferação e viabilidade celular, ensaios de citotoxicidade e determinação da função mitocondrial. Baseia-se na redução química desse reagente para resofurin, resultado do metabolismo das células que se dá por meio de reação de oxirredução onde o corante passa da cor azul, forma oxidada e não fluorescente, para a cor rosa, forma reduzida e fluorescente (O'brien *et al.*, 2000; Rolón *et al.*, 2006).

A absorvância pode ser medida em comprimentos de onda diferentes, nos experimentos deste trabalho eram de 570 e 600 nm (Alunda *et al.*, 2013).

O experimento em que se usou resazurina está descrito a seguir no ensaio de citotoxicidade de derivados do ácido cinâmico em macrófagos da linhagem RAW 264.7.

## 5.6 Curva de crescimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* M2904 GFP

Foram preparadas 3 amostras separadamente em garrafas acrílicas de 25 cm<sup>3</sup>, estéreis, descartáveis, contendo em cada uma 10 mL de meio de cultura Grace (Gibco). No primeiro dia, foram inoculados  $1 \times 10^5$  parasitos por mL em cada cultura e foi acompanhado o crescimento destes durante 10 dias consecutivos.

A partir do segundo dia, uma alíquota de cada cultura era retirada, diluída em Formalina 4% e feitas 3 contagens por cultura em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz (Leica) com objetivas invertidas. Em seguida, era calculada a média do número encontrado de parasitos entre as 3 culturas.

## **5.7 Ensaio de citotoxicidade de derivados do ácido cinâmico em macrófagos RAW 264.7**

Os macrófagos se encontravam aderidos na parede da garrafa de cultivo juntamente com o volume de 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Foram retirados 8 mL do meio e descartados e para desprendê-los foi utilizado um espalhador de células.

Após desprendidas as células, com o auxílio de uma pipeta graduada de vidro, foi adicionado 8 mL novamente de meio de cultura novo, homogeneizado e transferido para um falcon de 50 mL de volume. Em seguida, uma alíquota da cultura foi diluída em Tampão Fosfato Salino (PBS) e Azul de Trypan 4%. As células foram contadas em câmara de Neubauer. Foram utilizadas para os experimentos, placas de 96 poços e foram montadas duas placas, uma para análise com 24 horas e uma para 48 horas.

Após serem contados os macrófagos, a concentração foi ajustada para  $1 \times 10^5$  ou 100.000 células por poço para montagem da placa de 24 horas e  $0,5 \times 10^5$  ou 50.000 células por poço para montagem da placa de 48 horas.

Foram distribuídos de forma homogênea em toda a placa com volume final de 200  $\mu$ L em cada poço, em quadruplicata, contendo os macrófagos e o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Em seguida, a placa foi incubada na estufa úmida a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Completadas as 24 horas, os 200 $\mu$ L de meio RPMI foram removidos de toda a placa, descartados e adicionado o mesmo volume de meio de cultura novo. Em seguida, foram adicionados os compostos, sendo que o desenho experimental da placa foi feito em quadruplicata contendo como controle positivo a Anfotericina B (3,4  $\mu$ M), DMSO como controle negativo (1  $\mu$ L por poço em quadruplicata) cuja concentração final era 0,5% e 1  $\mu$ L de cada composto por poço. A placa foi incubada novamente na estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 23 horas, foi adicionado 20 $\mu$ L de Resazurina (1 mM) em cada poço e a absorbância foi medida por três horas consecutivas (1 hora após

adição de Resazurina, 2 horas e 3 horas, respectivamente) em comprimentos de onda diferentes (570 e 600 nm) em leitor de microplacas (Spectramax) até que o corante fosse completamente reduzido. O ensaio aqui descrito foi repetido por pelo menos uma vez.

### **5.8 Ensaio de citotoxicidade de derivados do ácido cinâmico em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* M2904 GFP**

Os parasitos previamente transfectados com a construção pLExsys-egfp-sat2 (Jena Bioscience) para expressar fluorescência (Bastos *et al.*, 2017), se encontravam em fase exponencial de crescimento (4<sup>o</sup> dia) acondicionados em garrafas acrílicas de 25 cm<sup>3</sup>.

Toda a cultura da garrafa (10 mL) foi transferida para um falcon de 50 mL e centrifugada a 3000 rpm, 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi homogeneizado em 10 mL de meio de cultura Grace's Insect Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado.

Uma alíquota foi retirada e feita diluição em Formalina 4% e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz (Leica) com objetivas invertidas.

Após a contagem, a concentração foi ajustada para  $2,5 \times 10^5$  parasitos por poço e distribuídos na placa de 96 poços, em quadruplicata, sendo o volume total destes de 200 µL.

Posteriormente, foram adicionados os compostos (1 µL por poço em quadruplicata), como controle positivo foi utilizada a Anfotericina B (3,4 µM) e como controle negativo o DMSO (0,5%). Após a montagem do experimento, a placa foi incubada em estufa a 25 °C por 24, 48 e 72 horas respectivamente.

Completados cada tempo, a cultura em cada poço foi homogeneizada com pipeta multicanal e medida a absorbância em leitor de microplaca (Spectramax) em comprimentos de ondas de 490 nm de excitação e 520 nm de emissão. Este ensaio foi repetido por pelo menos uma vez.

## **5.9 Ensaio *in vitro* de infecção em macrófagos por *Leishmania (Viannia) braziliensis* M2904 GFP**

Para os ensaios de infecção de macrófagos RAW 264.7 por promastigotas de *L.(Viannia) braziliensis* M2904 GFP, foi necessário ter parasitos em fase promastigota metacíclica e para isso, eles foram cultivados em Grace's Insect Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado até a fase estacionária onde estas formas estão presentes. Para isto, os parasitos foram cultivados por 7 dias em garrafa acrílica de 75 cm<sup>3</sup>.

Inicialmente, foram adicionados os macrófagos em placa de 96 poços contendo  $1 \times 10^5$  ou 100.000 células em cada poço e o volume total de 200 µL de meio RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Feito isso, a placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> afim de que ocorresse adesão dos macrófagos nela.

Após as 24 horas, a cultura de parasitos foi transferida para um falcon de 50 mL e centrifugada a 3000 rpm, 4 °C durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 10 mL de meio RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Uma alíquota foi retirada e feita a diluição de 1:10 em Formalina 4% e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. Após a contagem, a concentração foi ajustada para  $15 \times 10^5$  ou 1.500.000 parasitos por poço.

O meio RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino da placa contendo os macrófagos nela aderidos foi retirado, descartado e em seguida, os parasitos foram distribuídos na placa, sendo o volume total (Meio RPMI + parasitos + macrófagos) de 200 µL por poço. Posteriormente, a placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para que os parasitos fossem fagocitados pelos macrófagos.

No dia seguinte, os parasitos já se encontravam em fase amastigota no interior dos macrófagos, foram então retirados os 200 µL de meio RPMI de cada poço e descartados. Feito isso, iniciou-se o processo de lavagem para retirar os parasitos que se encontravam livres e fora dos macrófagos. Para a lavagem foi utilizado meio RPMI gelado (suplementado apenas com Penicilina na concentração de 2 mg/ mL).

O processo de lavagem consistiu em adicionar 100  $\mu\text{L}$  de RPMI em cada poço, pipetar por 3 vezes e em seguida descartá-lo. Repetiu-se esse processo por 3 a 5 vezes descartando o meio de lavagem e em seguida adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de meio RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino e novamente a placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

Após 24 horas, o meio RPMI de cada poço foi retirado e descartado. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  por poço de meio RPMI novo suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e em seguida, 1  $\mu\text{L}$  de cada composto para concentração final de 10  $\mu\text{M}$ . O ensaio foi feito em quadruplicata e como controle positivo foi utilizada a Anfotericina B (3,4  $\mu\text{M}$ ) e como controle negativo, o DMSO no volume de 1  $\mu\text{L}$  por poço para a concentração final de 0,5%.

Novamente a placa foi incubada em estufa a 37 °C por um período de 48 horas para a ação dos compostos. Completadas as 48 horas, fez-se nova lavagem de cada poço com RPMI base a fim de retirar os resíduos dos compostos. O processo de lavagem foi o mesmo feito anteriormente. Em seguida, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de RPMI suplementado com 0,05% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e aguardou-se por até 1 hora para que a membrana dos macrófagos fossem rompidas liberando então os parasitos em fase amastigota.

Observou-se ao microscópio o rompimento das membranas das células e concluída essa etapa, adicionou-se mais 150  $\mu\text{L}$  de meio Grace em cada poço completando então 200  $\mu\text{L}$  no total e incubou-se a placa em estufa a 25 °C por pelo menos 48 horas ou até 5 dias afim de que os parasitos se recuperassem possibilitando determinar a ação dos compostos sobre os amastigotas.

A cultura em cada poço foi homogeneizada com pipeta multicanal e a absorbância foi medida em leitor de microplaca (Spectramax) em comprimentos de ondas de 490 nm de excitação e 520 nm de emissão. O ensaio foi repetido por pelo menos uma vez.

### **5.10 Análise dos dados**

Não foi feita análise estatística, apenas a média entre 8 valores obtidos para cada composto após medir a absorbância em dois experimentos realizados de forma independente. Para o cálculo dessas médias foi utilizado o programa Graph Pad Prism versão 5.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Teste de solubilidade de compostos em meio RPMI 1640

A presença ou não de cristais formados por cada composto foi analisada ao microscópio de luz (Leica) em 24, 48 e 72 horas, o mesmo período previamente determinado para duração dos ensaios realizados. Após 72 horas de incubação em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, os compostos que permaneceram cristalizados, foram descartados não sendo utilizados nos experimentos. A tabela 7 mostra o código de cada composto solúvel e insolúvel em meio de cultura RPMI.

Na tabela 9, em anexo no final desse trabalho, estão representados o nome, a fórmula estrutural e o código dos compostos insolúveis em meio aquoso.

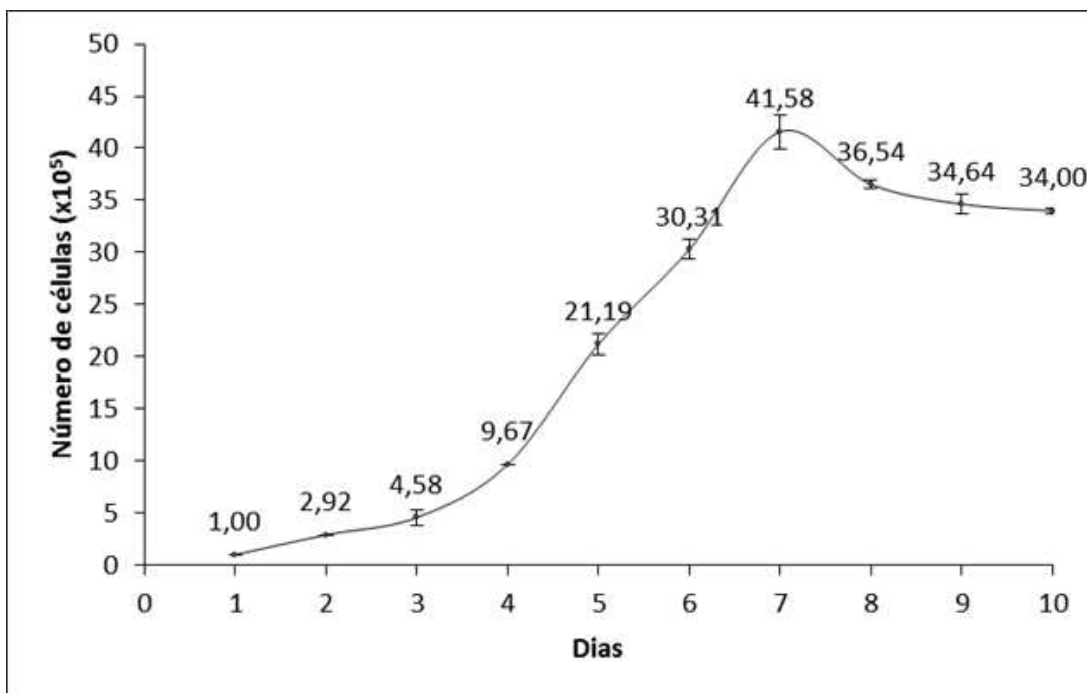
**Tabela 7: Compostos solúveis e insolúveis em meio aquoso.** Os compostos foram adicionados em meio RPMI 1640 e mantidos em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas.

Compostos disponibilizados			
Solúveis em meio aquoso		Insolúveis em meio aquoso	
MP04	MP24	K1	MP07
MP05	MP25	K2	MP08
MP06	MP30	K6	MP09
MP10	MP31	K7	MP20
MP14	MP33	K9	MP29
MP15	JFA02	K10	S1
MP16	JFA03	S2	S10
MP17	JFA04	S6	
MP18	JFA05	S7	
MP19	JFA06	S9	
MP21			

## 6.2 Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* M2907 GFP

A curva de crescimento foi utilizada para determinar as fases lag, logarítmica e estacionária de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa M2904 GFP. Para então poder usar os parasitos de fase logarítmica nos testes de ação direta dos compostos sobre promastigotas totais e os parasitos em fase estacionária para realizar os ensaios de infecção.

Os parasitos foram contados durante 10 dias consecutivos, como descrito anteriormente. De acordo com o gráfico 1, a fase lag foi do 1º ao 3º dia, período considerado de adaptação dos parasitos ao meio de cultura, a fase logarítmica foi do 4º até o 7º dia, período de alto metabolismo e proliferação exponencial e a fase estacionária do 7º ao 10º dia, em que se observa o início da ocorrência de morte celular entre o 7º e 8º dia.



**Gráfico 1: Curva de crescimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* M2904 GFP.** Os parasitos foram cultivados em meio de cultura Grace's Insect Medium (Gibco). O experimento foi realizado em triplicata.

A coleta de parasitos para os ensaios de citotoxicidade em promastigotas e infecção em macrófagos foi realizada conforme apresentado na tabela 8.

**Tabela 8: Dias relacionados à fase de crescimento em que os parasitos foram obtidos para a realização dos experimentos.**

<b><i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> cepa M2904-GFP</b>		
<b>Fase logarítmica</b>	<b>Ensaio em promastigota</b>	<b>Ensaio de infecção</b>
<b>Dia de crescimento</b>	<b>4°</b>	<b>7°</b>

Conforme observado no gráfico 1 e na tabela 8, os experimentos foram realizados utilizando os parasitos no meio da fase de crescimento exponencial (4° dia) ou em final de fase logarítmica e início da fase estacionária (7° dia).

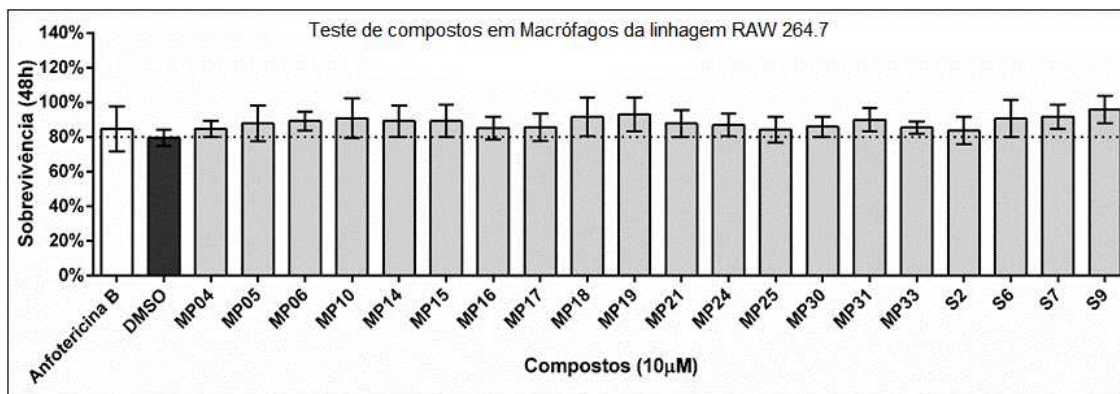
### **6.3 Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em macrófagos RAW 264.7**

Os macrófagos são as principais células a serem infectadas por *Leishmania*, com isso, a primeira investigação feita em relação à ação dos compostos disponibilizados, foi a citotoxicidade destes em macrófagos da linhagem RAW 264.7.

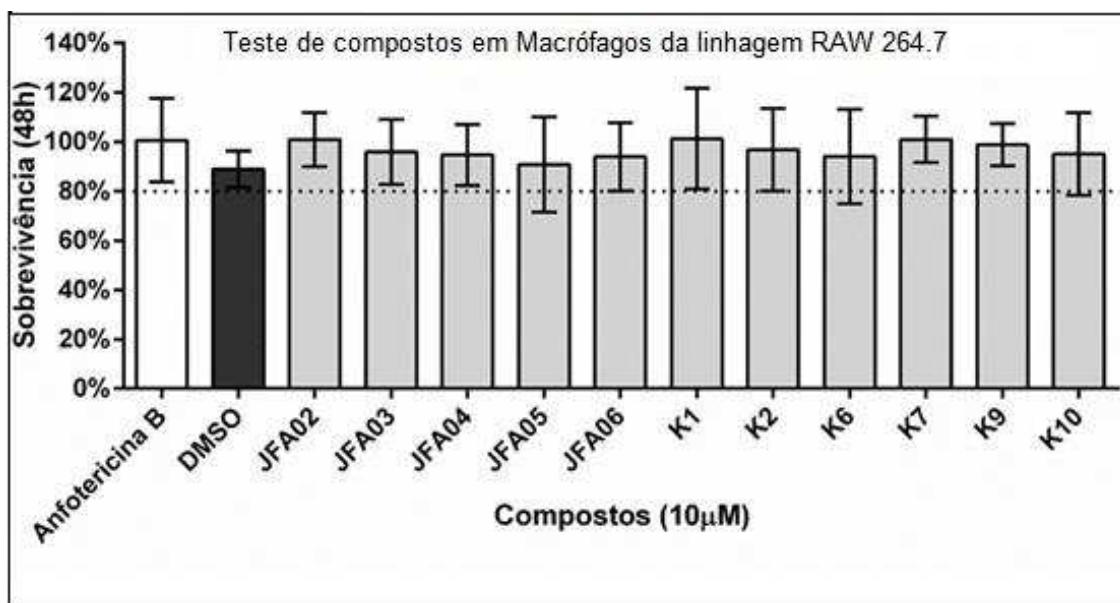
Foram testados os 31 compostos e obtiveram-se resultados esperados.

Como demonstram os gráficos 2 e 3, na concentração de 10µM e por um período de 48 horas de exposição aos compostos, estes apresentaram pouco ou nenhum efeito tóxico para as células.

Observa-se que houve uma taxa de mais de 80% de sobrevivência dos macrófagos quando tratados e expostos aos compostos. O mesmo resultado que se observa para os grupos não tratados, expostos à droga controle positivo Anfotericina B e ao controle negativo DMSO.



**Gráfico 2: Avaliação de efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em macrófagos da linhagem RAW 264.7**



**Gráfico 3: Avaliação de efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em macrófagos da linhagem RAW 264.7**

#### 6.4 Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* M2904 GFP

Os efeitos citotóxicos antiproliferativos dos compostos derivados do ácido cinâmico sobre promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram acompanhados por 24, 48 e 72 horas.

O composto (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila, identificado como S2, possui uma porção isobenzofuranona em sua fórmula estrutural (Tabela 4) e como mostra o gráfico 4, após 48 horas de contato com os parasitos, ele foi capaz de inibir em 52,25% o crescimento dos parasitos em fase promastigota, resultado semelhante ao efeito da droga controle Anfotericina B, que neste ensaio inibiu o crescimento em média de 46,62%.

Esse resultado quando comparado à avaliação da atividade leishmanicida de isobenzofuranona sobre promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* feita por Pereira *et al.* (2015) demonstra que está em conformidade, pois, observaram que após 24 horas de tratamento houve redução de mais de 50% de viabilidade parasitária. Isso reforça a hipótese de que isobenzofuranonas possuem ação leishmanicida.

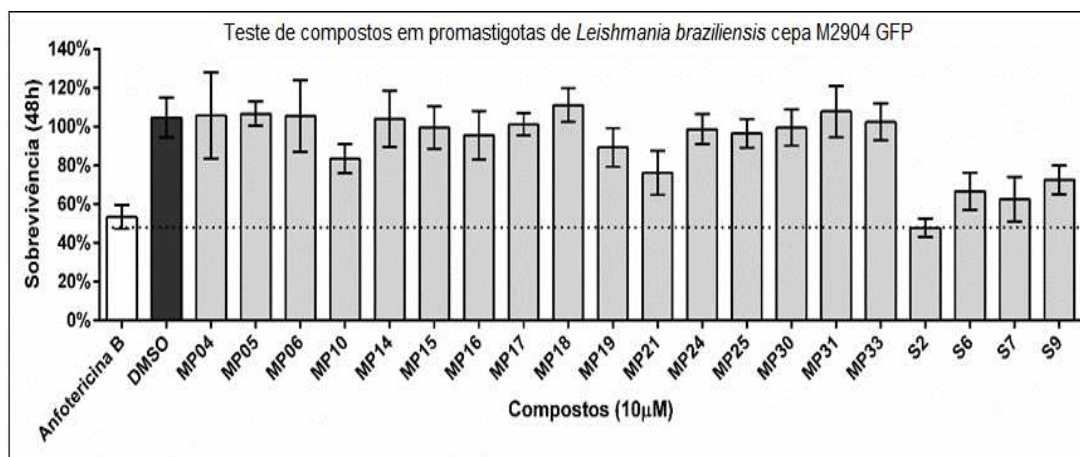


Gráfico 4: Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa M2904 GFP.

De acordo com o gráfico 5, após 48 horas os demais compostos não demonstraram nenhum efeito tóxico ao manterem contato com os parasitos em fase promastigota.

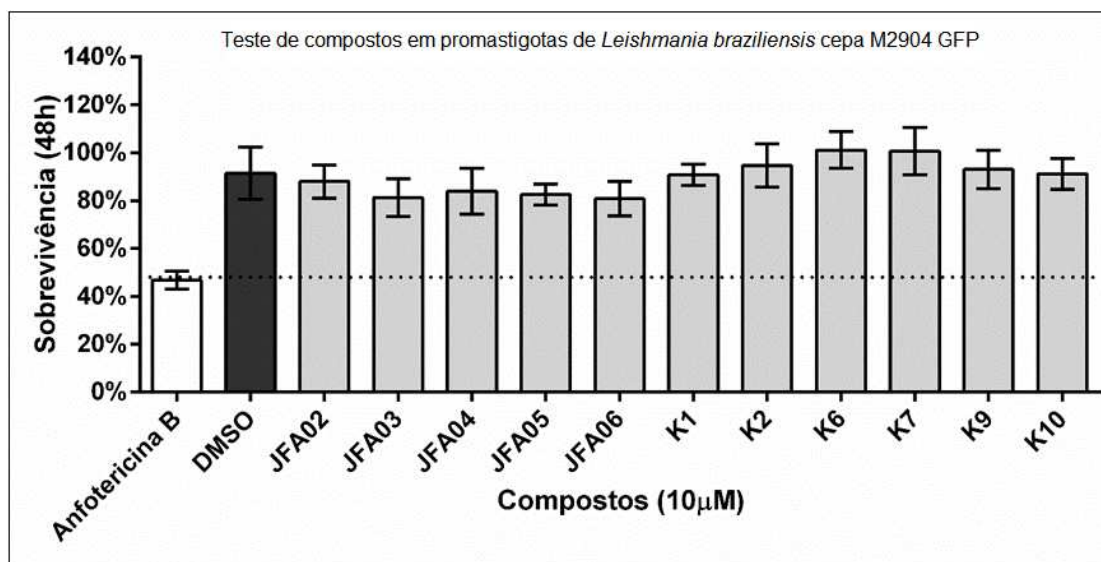


Gráfico 5: Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa M2904 GFP.

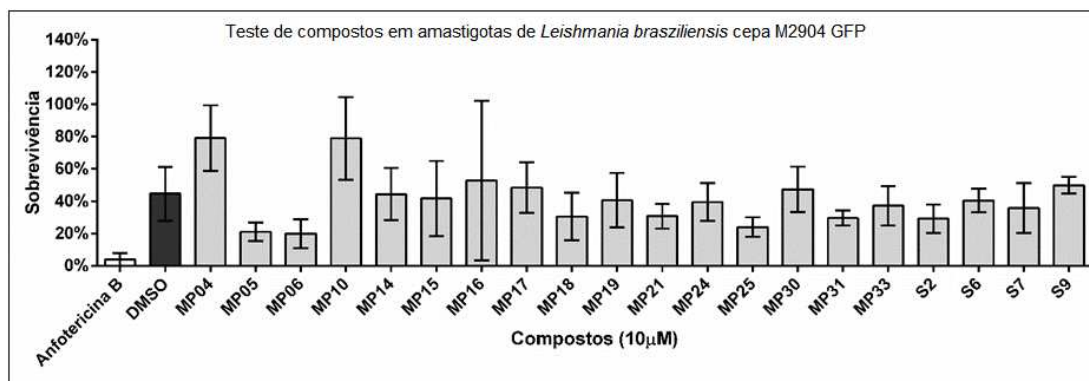
## **6.5 Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em amastigotas intracelulares de *Leishmania (viannia) braziliensis* no ensaio *in vitro* de infecção em macrófagos RAW 264.7**

Para cada macrófago foram inoculados 15 parasitos em início de fase promastigota estacionária onde se encontram promastigotas totais (formas procíclicas e formas metacíclicas). Após 24 horas de exposição, a maioria deles se encontravam no interior dos macrófagos em forma amastigota. Então foram adicionados os compostos na concentração de 10 µM e a avaliação do efeito foi feita após 48 horas.

Como mostra o gráfico 6, os resultados foram diferentes dos observados nos ensaios em promastigotas.

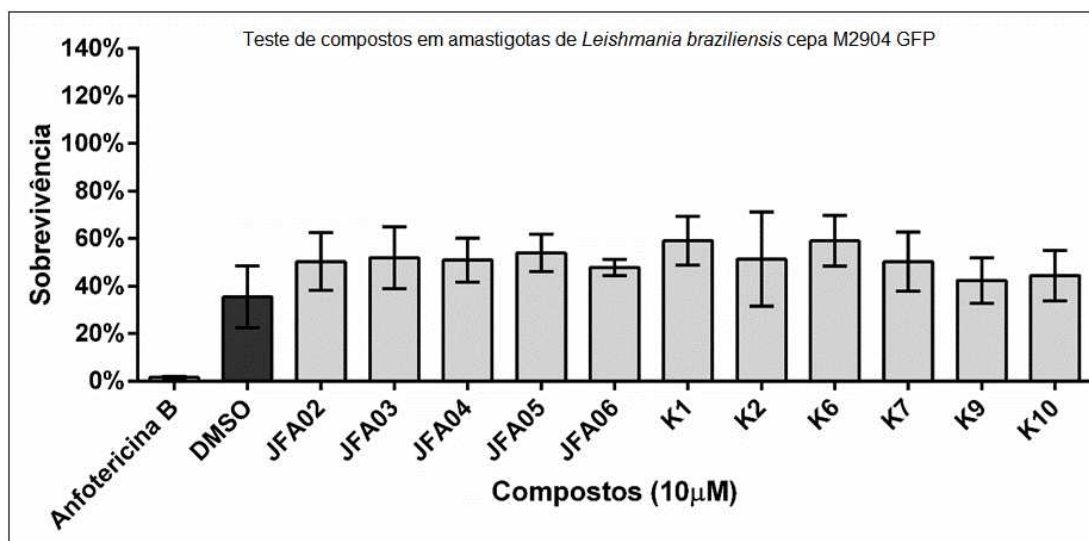
Observa-se que quatro dentre os compostos se destacaram em seus efeitos tóxicos para amastigotas intracelulares: o Cinamato de (1-(2,5-diclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila, o Cinamato de (1-(2,4,6-triclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila, o Cinamato de (1-(4-metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila e novamente o (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila, identificados como MP05, MP06, MP25 e S2 respectivamente. Estes compostos apresentam inibição média no crescimento de amastigotas em 78,98%, 80,12%, 76% e 70,89% respectivamente, resultados comparados à droga controle Anfotericina B que inibiu em 98,41% o crescimento dos parasitos.

Pode-se afirmar que a atividade leishmanicida contra amastigotas intracelulares dentre os quatro compostos foi melhor para os que possuem o núcleo 1,2,3 – triazólico ao que possui a porção isobenzofuranona.



**Gráfico 6: Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em amastigotas intracelular de *L. (Viannia) braziliensis* em macrófagos da linhagem RAW 264.7.**

Como mostra o gráfico 7, após 48 horas os demais compostos não se apresentaram tão tóxicos ao manterem contato com os parasitos em fase amastigota intracelular como os supracitados.



**Gráfico 7: Efeito citotóxico de derivados do ácido cinâmico em amastigotas intracelular de *L. (Viannia) braziliensis* em macrófagos da linhagem RAW 264.7.**

Percebe-se que houve divergência entre os resultados apresentados pelo controle negativo, o DMSO, quando comparados os resultados dos ensaios feitos contra macrófagos e promastigotas.

Como já observado, no ensaio de efeito contra macrófagos, o DMSO apresentou toxicidade de apenas 15,78%, no ensaio de efeito contra

promastigotas, a toxicidade foi de apenas 1,85%, o que entra em discordância quando se observa 59,89% de toxicidade contra amastigotas no ensaio de infecção.

Observa-se também, discordância entre os resultados da Anfotericina B, pois no ensaio de efeito contra promastigotas, a toxicidade foi de apenas 49,94%, não foi registrado neste trabalho, mas visualmente observado, todos os parasitos se encontravam mortos, já no ensaio de efeito contra amastigotas em infecção de macrófagos, a toxicidade da Anfotericina B foi de 97,19%.

Este resultado é esperado, pois, de acordo com Bastos *et al.* (2017), os IC 50% para promastigotas e amastigotas são diferentes, uma vez que os parasitos apresentam formas distintas e estão adaptados às diferentes condições do meio ambiente, como os promastigotas extracelulares e os amastigotas intracelulares, por exemplo.

## CONCLUSÕES

- Os compostos derivados do ácido cinâmico não são considerados tóxicos às células de mamíferos.

- O composto (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila que possui uma porção isobenzofuranona mostrou que tem ação leishmanicida tanto para *Leishmania (Viannia) braziliensis* na forma promastigota quanto amastigota intracelular.

- Os compostos derivados do ácido cinâmico com núcleo 1,2,3-triazólico, como o Cinamato de (1-(2,5-diclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila, o Cinamato de (1-(2,4,6-triclorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila e o Cinamato de (1-(4-metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila possuem ação leishmanicida contra amastigotas intracelulares de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

- Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que alguns derivados do ácido cinâmico, como é o caso dos compostos citados anteriormente mostram-se potenciais para a produção de possíveis fármacos para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.

## REFERÊNCIAS

ALUNDA, J.M.; CORRAL, M.J.; GONZÁLEZ, E.; CUQUERELLA, M. Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. **Journal of Microbiological Methods**. 94, p.111-116. 2013.

BALANÍA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.** v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BASTOS, M.S.; SOUZA, L.A.; ONOFRE, T.S.; SILVA-JUNIOR, A.; ALMEIDA, M.R.; BRESSAN, G.C.; FIETTO, J.L.R. Short communication: Achievement of constitutive fluorescent pLExsy-egfp *Leishmania braziliensis* and its application as an alternative method for drug screening *in vitro*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2017.

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 24, p. 684-703, 1997.

CHALFIE, M.; KAIN, S. R. Green fluorescent protein: Properties, applications, and protocols. 2. ed. New Jersey: Wiley, 47 v. 2006.

CHAN, M. M. Y.; BULINSKI, J. C.; CHANG, K. P.; FONG, D. Microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. **Parasitol. Res.**, v. 89, p.266- 271, 2003.

CHIRIAC, C.I.; TANASA, F.; ONCIU, M. A Novel Approach in Cinnamic Acid synthesis: Direct Synthesis of Cinnamic Acids from Aromatic Aldehydes and Aliphatic Carboxylic Acids in the Presence of Boron Tribromide. **Molecules**, v. 10, p. 481-487, 2005.

CHULAY, J. D.; FLECKENSTEIN, L.; SMITH, D. H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n.1, p. 69-72, 1988.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* v.79, p.362–372, 1999.

COLLA-JACQUES, F.E.; CASANOVA, C.; PRADO, A.P. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 208-215, 2010.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*.v.72, p.132-141, 2002.

CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 38, n. 6, p.1041-7, 1996.

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

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

DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal*, v. 326, p. 377-382, 2003.

DE, P.; BALTAS, M.; BELVAL, F.B. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents – A Review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, p.1672-1703, 2011.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Pentavalent antimonials: from chemistry to the design of new drugs. *Drug Design Reviews - Online*, v. 2, n. 3, p. 243-249, 2005.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* 14: 417–423, 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 95: 239–243, 2001.

DUA, R.; SHRIVASTAVA, S.; SONWANE, S. K.; SRIVASTAVA, S. K. Pharmacological significance of synthetic heterocycles scaffold: A Review. *Advances in Biological Research*, v. 5, p. 120-144, 2011.

FERREIRA, S. B.; COSTA, M. S.; BOECHAT, N.; BEZERRA, R. J. S.; GENESTRA, M. S.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; KOVER, W. B.; FERREIRA, V. F. Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles as antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, p. 1388-1395, 2007.

FREITAS, L. B. O.; RUELA, F. A.; PEREIRA, G. R.; ALVES, R. B.; DE FREITAS, R. P. A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: Aspectos químicos e aplicações. *Química Nova*, v. 34, p. 1791-1804, 2011.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J. A. The cochrane collaboration: Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Barcelona: Wiley & Sons, 2008.

HA, S. D.; SCHWAZ, J. K.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 77, p. 57-64, 1996.

KAMAU, S. W.; GRIMM, F.; HEHL, A. B. Expression of green fluorescent protein as a marker for effects of antileishmanial compounds in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 45, n. 12, p.3654-3656, 2001.

JOULE, J. A.; MILLS, K. Heterocyclic Chemistry. Ed. John Wiley & Sons, Fifth Edition, 2010.

KOUNI, M.H. Potential chemotherapeutic target in the purine metabolism of parasites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 3, p.283 - 309, set. 2003.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. *In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Peters & Killick Kendrick Eds. p. 1-119. London: Academic Press, 1987.

LEE, Y.; KUO, H.; CHU, C.; WANG, C.; LIN, W.; TSENG, T. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cell. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 2281-2289, 2003.

LIMA EB, PORTO C, MOTTA JOC, SAMPAIO RNR. Tratamento de Leishmaniose Tegumentar Americana. **An Bras Dermatol**. 82(2):111-124. 2007.

LINDOSO, J.A.L. & LINDOSO, A.A.B.P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**. S. Paulo, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

MISTELI T, SPECTOR DL. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. **Nature Biotechnology**, 15: 961-964, 1997.

MARZOCHI, M.C.A; FAGUNDES, A.; ANDRADE, M.V.; SOUZA, M.B.; MADEIRA, M.F.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, A.O. and MARZOCH, K.B.F. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 5, p. 570-580, 2009.

MAYRINK W, BOTELHO AC, MAGALHÃES PA, BATISTA SM, LIMA ADE O, GENARO O, COSTA CA, MELO MN, MICHALICK MS, WILLIAMS P, DIAS M, CAIAFFA WT, NASCIMENTO E, MACHADO-COELHO GL. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, 2006.

MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: Histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 569-579, 2006.

MICHALICK, MSM, RIBEIRO, RR. 2011. *Gênero Leishmania*. p.41-47. In: Neves, D.P.; Melo, A.L.; Linardi, P.M.; Vitor, R.W.A. (Eds.). **Parasitologia Humana**. 11ª edição. São Paulo, Ed. Atheneu, 546p.

MISHRA J.; SAXENA A.; SINGH S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Curr. Med. Chem**, v. 14, n. 10, p.1153-69, 2007.

MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v.80, p. 81-90. 2009.

MOLINA, R.; LOHSE, J.M.; PULIDO, F.; LAGUNA, F.; LOPEZ-VELEZ, R.; ALVAR, J. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.60, n.1, p. 51-53, 1999.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.6, p.754-764, 2008.

NOGUEIRA, L.S.C., SAMPAIO, R.N.R. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 76, p. 51-62, 2001.

O'BRIEN, J; WILSON, I; ORTON, T; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, England, v. 267, n. 17, p.5421-5426. 2000.

OYOLA, S. O.; EVANS, K. J.; SMITH, T. K.; SMITH, B. A.; HILLEY, J. D.; MOTTRAM, J. C.; KAYE, P. M.; SMITH, D. F. Functional analysis of *Leishmania* cyclopropane fatty acid synthetase. **PLoS One**, v.7, p.e51300, 2012.

PEREIRA, W.L.; VASCONCELLOS, R.S.; MariotiMOURA, C.M.; Rodrigo Saar GOMES, R.S.; FIRMINO, R.C.; SILVA, A.M.; JÚNIOR, A.S.; BRESSAN, G.C.; ALMEIDA, M.R.; AFONSO, L.C.C; TEIXEIRA, R.R.; FIETTO, J.L.R. The Antileishmanial Potential of C-3 Functionalized Isobenzofuranones against *Leishmania (Leishmania) Infantum Chagasi*. **Molecules**, v.20, p.22435–22444, 2015.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v.322, p.1634-1634, 2008.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, p. 550 - 555, 2003.

REIS, AB; GONTIJO, CMF. 2011. Leishmaniose Tegumentar Americana. p.49-65. In: Neves, D.P.; Melo, A.L.; Linardi, P.M.; Vitor, R.W.A. (Eds.). **Parasitologia Humana**. 11ª edição. São Paulo, Ed. Atheneu, 546p.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROLÓN, M; VEGA, C; ESCARIO, J.A; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of rezasurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Reserch**, Germany, v.99, n.2, p. 103-107. Jul. 2006.

ROTUREAU B, RAVEL C, NACHER M, COUPPIÉ P, CURTET I, DEDET JP, CARME B. Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. **J Clin Microbiol**, 2006; 44 (2):468-473.

SACKS, D & KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**. 55: 453-83, 2001.

SHIMOMURA, O. Discovery of green fluorescent protein (GFP): Nobel Lecture. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 48, p.5590-5602, 2009.

SHARMA, P.; Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 403-423, 2011.

SINGH, N.; DUBE, A. Short report: fluorescent Leishmania: application to antiLeishmanial drug testing. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 71, n.4, p.400-402, 2004.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 12(8), 749–67, 2012.

SOUZA, R. O. M. A.; PEREIRA, V. L. P.; MUZITANO, M. F.; FALCÃO, C. A. B.; ROSSIBERGMANN, 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.

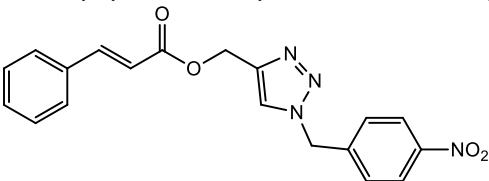
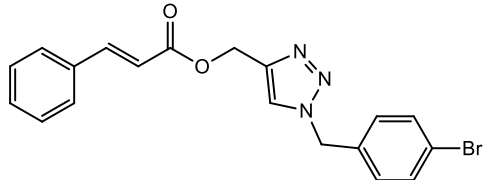
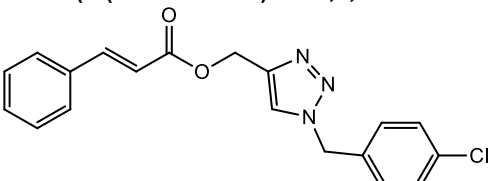
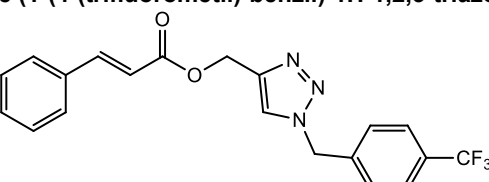
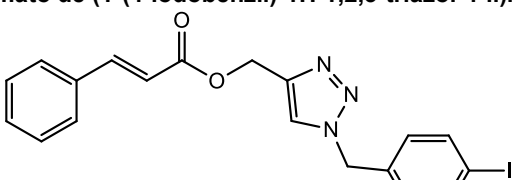
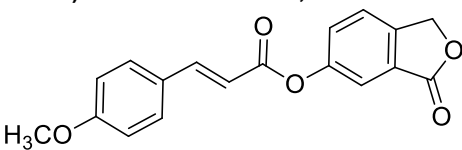
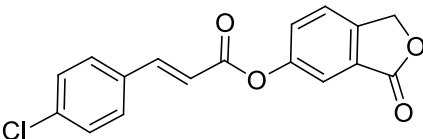
WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the Leishmaniasis. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 186p. 2010.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION.  
[http://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/). Acesso em 10 de Novembro de 2016.

YANG, F.; MOSS, L. G.; PHILLIPS, G. N. The molecular structure of green fluorescent protein. **Nat. Biotechnol**, v. 14, p.1246-1251, 1996.

## ANEXO I

**Tabela 9: Compostos insolúveis em meio aquoso**

Nome e fórmula estrutural dos compostos	Código
<p><b>Cinamato de (1-(4-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila</b></p> 	MP07
<p><b>Cinamato de (1-(4-bromobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila</b></p> 	MP08
<p><b>Cinamato de (1-(4-clorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila</b></p> 	MP09
<p><b>Cinamato de (1-(4-(trifluorometil)-benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila</b></p> 	MP20
<p><b>Cinamato de (1-(4-iodobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metila</b></p> 	MP29
<p><b>(E)-3-(4-metoxifenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila</b></p> 	S1
<p><b>(E)-3-(4-clorofenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila</b></p> 	S10