



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAÍSSA BOCCHI PEDROSO

**ATIVIDADE DE  $\beta$ -CARBOLINA-3-CARBÓXI E DE  
DERIVADOS  $\beta$ -CARBOLINA-3-CARBOXAMIDA EM  
*LEISHMANIA AMAZONENSIS***

RAÍSSA BOCCHI PEDROSO

**ATIVIDADE DE  $\beta$ -CARBOLINA-3-CARBÓXI E DE  
DERIVADOS  $\beta$ -CARBOLINA-3-CARBOXAMIDA EM  
*LEISHMANIA AMAZONENSIS***

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor em Microbiologia pelo curso de Pós-Graduação em Microbiologia.

Orientador Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Londrina  
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

P372a Pedroso, Raissa Bocchi.

Atividade de  $\beta$  – carbolina – 3 – carbóxi e de derivados  $\beta$  – carbolina – 3  
carboxamida em *Leishmania amazonensis* / Raissa Bocchi Pedroso. --  
Londrina, 2010.

57 f. : il., figs. Col., tab.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Programa de Pós – Graduação em Microbiologia, 2010.

1. *Leishmania amazonensis* – Atividade de  $\beta$  – carbolina – 3 – carbóxi. 2.  
*Leishmania amazonensis* – Derivados  $\beta$  – carbolina – 3 – carboxamida. 3  
*Leishmania amazonensis* – Análise ultraestrutural. I. Nakamura, Celso vataru,  
orient. II. Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia. III. Título.

CDD 22. ed. 616.9364

RAÍSSA BOCCHI PEDROSO

**ATIVIDADE DE  $\beta$ -CARBOLINA-3-CARBÓXI E DE DERIVADOS  $\beta$ -  
CARBOLINA-3-CARBOXAMIDA EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor em Microbiologia pelo curso de Pós-Graduação em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura  
UEM – Maringá - PR

---

Sueli Fumie Yamada Ogatta  
UEL – Londrina – PR

---

Lucy Megumi Yamauchi Lioni  
UEL – Londrina - PR

---

Maria Helena Sarragiotto  
UEM – Maringá - PR

---

Sueli de Oliveira Silva Launtenschlager  
UEM – Maringá – PR

Londrina, 08 de setembro de 2010.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, sob orientação do Professor Doutor Celso Vataru Nakamura.

*À minha família: Davi,  
Odete, Roberval e Caetano.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Celso Vataru Nakamura pela orientação e ensinamentos durante este período de convivência e, também, aos professores, Dra. Tânia Ueda Nakamura, Dr. Benedito Prado Dias Filho e Dr. Benício Alves de Abreu Filho pelo apoio, sugestões e ajuda.

A todos os amigos do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Estadual de Maringá pelo apoio.

Aos meus amigos e companheiros de pesquisa, Andrea Mayumi Koroishi, Helena Teru Takahashi, Eliana Harue Endo, Rodrigo Hinojosa Valdez, Karin Juliane Pelizzaro Rocha, Erika Izumi, Milene Lopes, Marco Antônio Costa e Gislaïne Franco de Moura Costa pelo companheirismo em todos os momentos vividos durante este período.

Um agradecimento especial para os amigos do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá por todo apoio, paciência e colaboração em experimentos, Professor Dr. Gentil José Vidotti (*in memorium*) e Adriano Antonion. Também aos amigos do Grupo GMPC do Departamento de Química desta mesma Universidade, Professor Dr. Adley Forti Rubira, Marcos H. Kunita, Shirani Haraguchi, Thelma Pacheco e Guilherme Miranda Pereira pela grande amizade e palavras de apoio.

Aos amigos do Grupo de Síntese e Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, Professora Dra. Maria Helena Sarragiotto, Valéria Aquilino Barbosa, George Brand, Franciele Cristina Savariz, Manuela Ribeiro Panice,

Anelise S. N. Formagio, Marcos Ribeiro, Maria Augusta Naressi e Lílian Tonin Düsman pela extrema atenção tentando ensinar uma bióloga a fazer síntese orgânica.

Aos meus grandes amigos que sempre estiveram por perto para me ajudar e pelo enorme apoio durante este período, Bruna Polacchine da Silva, Cristiane Tiemi Matsuoka, Michelle Stocker, e Guilherme Takeda

Aos meus pais Roberval Apolonio Pedroso e Odete Bocchi Pedroso para os quais entrego todo o meu coração por tanto amor e atenção dedicados a mim, e também ao meu irmão Caetano Bocchi Pedroso pelo carinho e compreensão.

Ao meu marido Davi Quenehenn Junior pelas incontáveis horas me acompanhando no Laboratório durante pesquisas intermináveis, ao apoio técnico durante o desenvolvimento dessa tese e pelo amor e carinho, pois, sem eles não conseguiria ter terminado.

Agradeço a DEUS por, simplesmente TUDO.

PEDROSO, Raíssa Bocchi. **Atividade de  $\beta$ -Carbolina-3-carbóxi e de derivados  $\beta$ -carbolina-3-carboxamida em *leishmania amazonensis***. 2010. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

Leishmanioses são causadas por espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* e produzem grande impacto na saúde pública, especialmente em países de clima tropical e subtropical. Infecções causadas por espécies de *Leishmania* provocam um amplo espectro de doenças em humanos, com várias manifestações clínicas (cutânea, mucocutânea e visceral). Os medicamentos contra leishmanioses disponíveis, os compostos antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan) e o antimoniato de meglumina desenvolvem sérios efeitos colaterais e possuem baixa eficácia. Um grande número de substâncias naturais e sintéticas tem sido testado nos últimos anos contra as leishmanioses e a classe de compostos  $\beta$ -carbolínicos, incluindo alcalóides naturais e sintéticos, está bem estabelecida na quimioterapia antiparasitária e também em várias outras atividades biológicas. Neste trabalho, três  $\beta$ -carbolina-3-carboxamidas 1-substituídas (**3-5**) e uma  $\beta$ -carbolina contendo o grupo carbóxi no C-3 (**2**) foram sintetizadas e testadas para atividade antileishmania contra as formas promastigota e amastigota axênica de *Leishmania amazonensis* e também foi avaliada a citotoxicidade em macrófagos J774G8. A atividade da substância *N*-benzil 1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-carboxamida (**5**) foi avaliada para formas amastigotas intracelulares obrigatórias e as substâncias 1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-ácido carboxílico (**2**) e *N*-benzil 1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-carboxamida (**5**) também foram avaliadas para observação de alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas. A substância **5** teve a melhor atividade sobre formas promastigota e amastigota axênica com  $CI_{50}$  de 2,6  $\mu$ M e 1,0  $\mu$ M, respectivamente. Seu  $CC_{50}$  foi maior que 2457,0  $\mu$ M com um IS de 930,2. Contra as formas amastigotas intracelulares teve um efeito dose-dependente com uma concentração inibitória de 50% de crescimento de 1,0  $\mu$ M. Nas análises morfológica e ultraestrutural de formas promastigotas tratadas com a substância **5**, pôde-se observar alterações na forma celular e no número de flagelos. Alterações na divisão celular e danos na membrana nuclear também foram observados. Portanto, mais estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser feitos com a substância *N*-benzil 1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-carboxamida

**Palavras-Chave:** Atividade antileishmania.  $\beta$ -carbolina-3-carboxamida. Análise ultraestrutural.

PEDROSO, Raíssa Bocchi. **Activity of  $\beta$ -carboline-3-carboxy derivatives and  $\beta$ -carboline-3-carboxamide in *Leishmania amazonensis***. 2010. 57 f. Dissertation (Master's degree in Microbiology) - Universidade estadual de Londrina, Londrina, 2010.

### ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by species of the genus *Leishmania* and has an overwhelming impact on global public health especially in tropical and subtropical countries. Infection by various strains of leishmania causes a wide spectrum of diseases in humans, with many clinical manifestations (cutaneous, mucocutaneous and visceral). The currently available leishmanial drugs depend on pentavalent antimony compounds like sodium stibogluconate (Pentostan) and meglumine which have serious side effects and low efficacy. A great number of natural and synthetic compounds have been tested in the past few years against leishmaniasis and the importance of  $\beta$ -carboline class of compounds, including natural and synthetic  $\beta$ -carbolines alkaloids is well established in antiparasitic chemotherapy and for several other biological activities. In the present work three 1-substituted  $\beta$ -carboline-3-carboxamides (**3-5**), as well as, 1-substituted  $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (**2**) were synthesized and screened for antileishmanial activity against promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis* and also for cytotoxicity assays with macrophages J774G8. The activity of *N*-benzyl 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (**5**) was evaluated against intracellular amastigote and compounds 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (**2**) and *N*-benzyl 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (**5**) was also evaluated for its morphological and ultrastructural analysis in promastigotes. Compound **5** had the best activity against promastigote and axenic amastigote forms with  $IC_{50}$  of 2.6  $\mu$ M and 1.0  $\mu$ M, respectively. Its  $CC_{50}$  was higher than 2,457.0  $\mu$ M with a SI ratio of 930.2. Against intracellular amastigotes it had a dose dependent relationship with a 50% growth inhibitory concentration of 1.0  $\mu$ M. Through morphological and ultrastructure analysis of promastigote forms treated with compound **5**, it was observed alterations on cell shape and number of flagella. Alteration on cell division and damaged nuclear membrane was also observed. For this, compound *N*-benzyl 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (**5**) supports the idea for more *in vitro* and *in vivo* studies.

**Keywords:** Antileishmanial activity.  $\beta$ -carboline-3-carboxamide. Ultrastructure analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> SP .....	15
<b>Figura 2</b> – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> em um vetor competente ilustrando as alterações morfológicas hora-dependente das formas promastigotas no trato gastrointestinal do inseto .....	15
<b>Figura 3</b> – Distribuição da forma cutânea (esquerda) e forma visceral (direita) de Leishmaniose no Novo e Velho mundo. As áreas afetadas estão em vermelho .....	17
<b>Figura 4</b> – LTA forma cutânea, lesão clássica em moldura.....	21
<b>Figura 5</b> – Substâncias mais comumente usadas para o tratamento das Leishmanioses .....	23

## ARTIGO

### Legends for figures.

- Figure 1** – Effect of Compound **5** on *L. amazonensis*-macrophage interaction. Peritoneal macrophages were infected with promastigotes and then treated with different concentrations of the compound. After 72 h the Inhibition percentage was calculated by the equation  $(P2/P1) \times 100$ , where P1 is the inhibition index for the control and P2 is the inhibition index for the treated cells. Inhibition index was calculated by multiplying the percentage of macrophages with internalized parasites and the mean number of internalized parasites per macrophage. Each bar represents  $\pm$  the standard deviation. Significant differences of each group from untreated cell (control) were done using ANOVA test with  $p \leq 0.05$  ..... 41
- Figure 2** – Scanning electron microscopy of *L. amazonensis* treated with  $\beta$ -carboline **2** or **5** for 72 h at 25 °C. Control parasite (A) showing the typical elongated body. Protozoa treated with IC<sub>50</sub> of compound **2** (B) showing a rounded and swelled body. Protozoa treated with IC<sub>50</sub> of compound **5** (C and D) showing alterations on the cell shape and on the number of

flagella. Protozoa treated with IC<sub>90</sub> of compound **5** (E and F) showing alterations on cytocineses and multiple flagella. Bar = 1 μm..... 42

**Figure 3** – Transmission electron microscopy of *L. amazonensis* treated with β-carbolines **2** or **5** for 72 h at 25 °C. (A) Control parasite showing characteristic organelles. (B and C) cells treated with IC<sub>50</sub> of compound **2** showing remarkable alterations on the nuclear membrane and multiple flagella. (D, E, and F) cells treated with IC<sub>50</sub> of compound **5** demonstrating nuclear membrane alterations, cytocineses alterations and multiple flagella. Arrows indicate nuclear membrane alterations and small arrow indicate chromocenters. (F) flagellum, (Fp) flagellar pocket, (K) kinetoplast, (M) mitochondria, (N) nucleus, (V) vacuoles. Bar = 1 μm..... 43

## SUMÁRIO

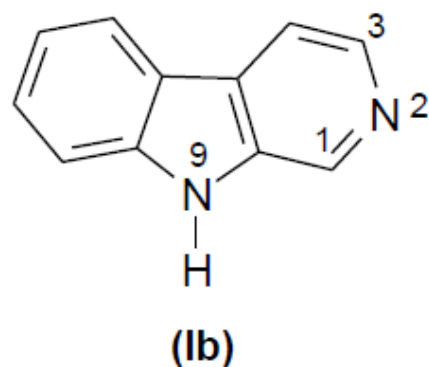
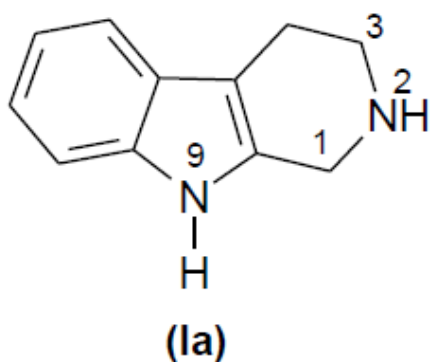
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
A LEISHMANIOSE.....	14
EPIDEMIOLOGIA.....	17
INTERAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO .....	19
CARACTERÍSTICA DA DOENÇA.....	21
TRATAMENTOS .....	22
COMPOSTOS $\beta$ -CARBOLÍNICOS .....	25
<b>OBJETIVOS</b> .....	31
OBJETIVO GERAL .....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>ARTIGO CIENTÍFICO – “<math>\beta</math>-CARBOLINE-3-CARBOXAMIDE DERIVATIVES AS PROMISING ANTILEISHMANIAL AGENTS”</b> .....	32
<b>CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51

## INTRODUÇÃO

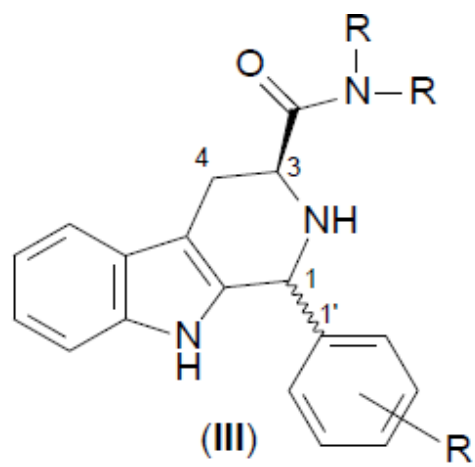
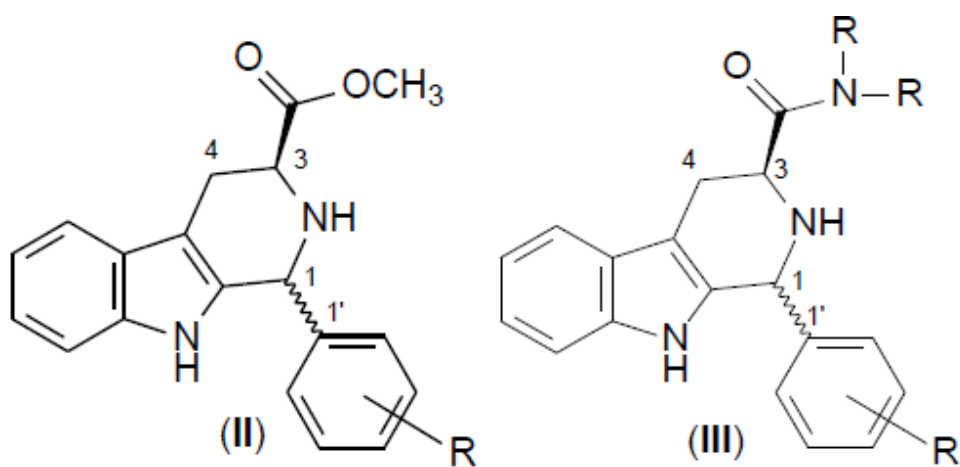
Os protozoários do gênero *Leishmania* (família *Trypanosomatidae*) são encontrados na sua forma promastigota no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e na forma amastigota no sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (MICHALICK, 1995). Todas as formas de leishmaniose são transmitidas pela fêmea dos hospedeiros invertebrados infectados. A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é responsável principalmente pela forma tegumentar da doença (GENARO, 1995) podendo também causar a leishmaniose visceral (HERWALDT, 1999). Seus hospedeiros vertebrados incluem uma ampla variedade de mamíferos (roedores, marsupiais, canídeos e primatas) e os invertebrados são do gênero *Lutzomyia* (GENARO, 1995).

A Leishmaniose está presente atualmente na maioria dos países em desenvolvimento sendo no Brasil destacadas como endêmicas todas as formas da doença (tegumentar a visceral) (OMS, 2007). O tratamento desta doença conta com a administração de antimoniais pentavalentes como o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®), mas estes apresentam efeitos tóxicos e resistência antimicrobiana pelos protozoários (GREVELINK; LERNER, 1996). Outras substâncias como as pentamidinas e anfotericina B também são usadas para o tratamento desta doença assim como antifúngicos que bloqueiam a síntese de ergosterol como derivados do imidazol e triazol, os quais também apresentam sérios efeitos colaterais (GENARO, 1995; GREVELINK; LERNER, 1996). Devido aos problemas apresentados há um grande interesse na busca de novas terapias que substituam as atuais, com o desenvolvimento de fármacos mais eficientes contra leishmaniose e disponíveis à população.

Com este objetivo, nosso grupo de trabalho vem realizando estudos sobre a atividade frente à *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* de compostos tetraidro- $\beta$ -carbolínicos (**Ia**) e  $\beta$ -carbolínicos (**Ib**) sintéticos em conjunto com o grupo de síntese do departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá.



Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram resultados significativos para a atividade antitripanossoma e antileishmania de uma série de alcalóides tetraidro- $\beta$ -carbolínicos contendo o grupo fenil com diferentes substituintes na posição-1 e o grupo carbometóxi (**II**) e *N*-alquilcarboxamida (**III**) na posição-3 (TONIN, 2009; VALDEZ et al., 2009; TONIN et al., 2010).



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### A LEISHMANIOSE

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, que acometem o homem, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, como a forma cutânea, a cutânea mucosa e a visceral, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro (SARAVIA et al., 1989). Estes parasitas possuem a seguinte posição sistemática (LEVINE et al, 1980):

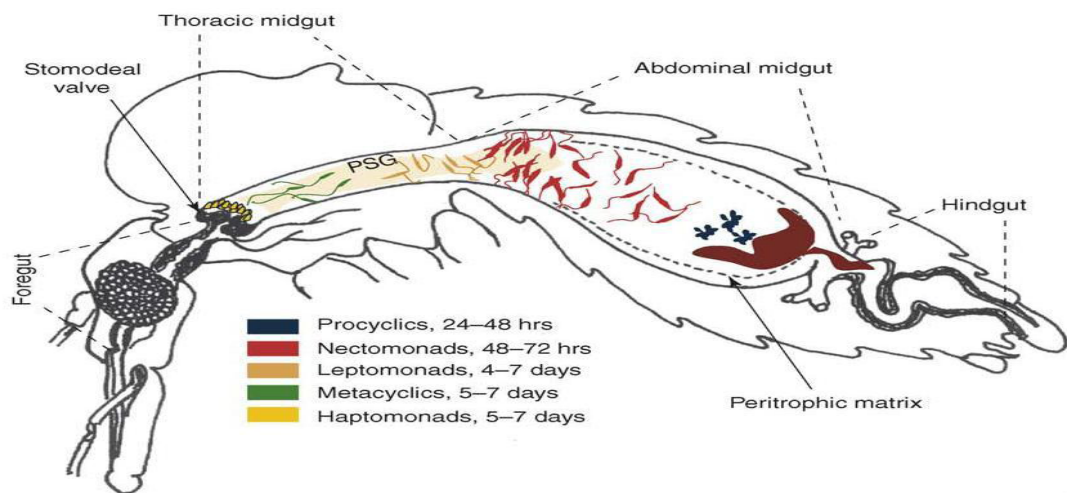
Reino: PROTISTA  
Sub-reino: PROTOZOA  
Filo: SARCOMASTIGOPHORA  
Sub-filo: MASTIGOPHORA  
Classe: ZOOMASTIGOPHOREA  
Ordem: KINETOPLASTIDA  
Sub-ordem: TRYPANOSOMATINA  
Família: *Trypanosomatidae*  
Gênero: *Leishmania*

O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitas, com um ciclo de vida heteroxênico (Figura 1), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro. Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos.



**Figura 1** – Ciclo de vida de *Leishmania* sp.  
**Fonte:** (SANTOS et al., 2008)

Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos as leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo (Figura 2). Ali, as formas amastigotas (arredondadas e com flagelo internalizado), ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas promastigotas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas (KILLICK-KENDRICK, 1979; 1990; KILLICK-KENDRICK; RIOUX, 1991; WALTERS, 1993; GONTIJO; CARVALHO, 2003), sendo posteriormente, as formas promastigotas metacíclicas, inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada.



TRENDS in Parasitology

**Figura 2** – Ciclo de vida de *Leishmania* em um vetor competente ilustrando as alterações morfológicas hora-dependente das formas promastigotas no trato gastrointestinal do inseto.  
**Fonte:** (KAMHAWI, 2006)

As leishmanioses constituem zoonoses de animais silvestres, incluindo marsupiais, desdentados, carnívoros e mesmo primatas e, também, zoonoses de animais domésticos, incluindo gatos e cachorros. O homem representa hospedeiro acidental e parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitas na natureza. A inoculação de *Leishmania* determina lesão cutânea na porta de entrada, de aspecto pápulo-vesiculoso ou impetigóide, que não raro evolui para regressão espontânea. A infecção pode continuar surgindo lesões cutâneas disseminadas. (FURTADO, 1994).

## EPIDEMIOLOGIA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2007), as leishmanioses têm uma distribuição mundial, estando presentes em 4 continentes e 88 países (Figura 3), onde afetam aproximadamente 350 milhões de pessoas. Mais de 17 espécies de *Leishmania* ssp são capazes de causar um amplo espectro de manifestações clínicas, desde a forma cutânea (LC) até a forma visceral (LV) (LAINSON; SHAW, 2005). No Novo Mundo, a forma cutânea em humanos é causada por várias espécies como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) mexicana*, e *Leishmania (L.) venezuelensis*, enquanto a forma visceral é causada somente por uma espécie: *Leishmania (Leishmania) infantum* (SHAW; LAINSON, 1975; THOMAZ-SOCCOL, 1993; THOMAZ-SOCCOL et al., 1993).



**Figura 3** – Distribuição da forma cutânea (esquerda) e forma visceral (direita) de Leishmaniose no Novo e Velho mundo. As áreas afetadas estão em vermelho.

**Fonte:** (SANTOS et al., 2008)

O Brasil é um dos países com as maiores taxas de dados reportados e apresenta uma média de 28.000 novos casos de LC e 2000 novos casos de LV por ano. No estado do Paraná, tem havido um aumento no número de casos de LC desde 1980 com aproximadamente 3900 casos entre 2000 e 2004 (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2007). Até 2000, vários focos de leishmaniose foram detectados em duas regiões do estado: o Vale do Ribeira, onde casos da doença têm sido relatados por mais de um século, com poucos casos anuais (<11 casos/ano) (CASTRO et al., 2005) e a região norte do estado, onde os casos

têm trazido grandes preocupações desde então (SILVEIRA et al., 1996; CASTRO et al., 2002).

A região de Prudentópolis, na área central do estado do Paraná, apresentou vários casos de LC humana. De novembro de 2002 a novembro de 2003 houve uma epidemia de LC em 16 vilas da região. O desmatamento das florestas devido ao aumento das áreas de pastos e de agricultura juntamente com o fato de os animais terem que procurar por alimento em áreas mais próximas ao homem, pode ter gerado este novo padrão epidemiológico de LC (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009).

Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) constitui problema de Saúde Pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, principal causadora da LTA, encontra-se distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia, particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste. Tem como hospedeiros naturais vários marsupiais, principalmente, o roedor “rato-soiá” (*Proechymis*), além do *Oryzomys*, que, às vezes, apresenta o parasita na pele sem lesões cutâneas. Seus principais vetores, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia), têm hábitos noturnos e vôo baixo (FUNASA, 2002).

## INTERAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO

A presença das formas promastigotas metacíclicas, no local da inoculação (picada), desencadeia uma resposta inflamatória aguda inespecífica da qual participam células e fatores séricos – células *natural killer* (NK), polimorfonucleares (neutrófilos, macrófagos e eosinófilos) e sistema complemento. A importância das células NK no controle da infecção deve-se tanto a sua ação citotóxica quanto ao fato de ser fonte primária de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que tem papel importante na defesa contra micro-organismos intracelulares como *Leishmania* spp, ativando macrófagos e estimulando a liberação de outras citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) que juntamente com IFN- $\gamma$  estimulam os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO) que é considerado o principal produto envolvido na morte de *Leishmania* spp (D'OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2002).

Apesar de todo esse arsenal de defesa, o protozoário, ainda assim, é capaz de burlar os mecanismos leishmanicidas do macrófago e se estabelecer como uma infecção bem sucedida.

Fagocitose é um mecanismo importante no processo de defesa do hospedeiro vertebrado. Fagócitos são capazes de internalizar e matar micróbios em seus compartimentos lisossomais, no caso da fagocitose de *Leishmania* spp, o macrófago é quase sempre subvertido em sua capacidade microbicida e o parasita é capaz de sobreviver e se multiplicar no interior destas células (RITTING; BOGDAN, 2000).

A adesão das formas promastigotas de *Leishmania* spp à membrana do macrófago é pré-requisito para sua fagocitose. Moléculas diferentes integram a membrana de superfície de *Leishmania* spp, tais como glicoproteínas (gp) e glicolipídios, fundamentais para sua interação com os macrófagos, sendo a metaloprotease gp63 e o lipofosfoglicano (LPG) as principais moléculas ligantes (DAVIES et al., 1990). A pequena fração do inóculo infectante que consegue internalizar-se em macrófagos, a partir da ligação direta dessas moléculas com receptores de membrana das células, determina uma série de reações bioquímicas que podem levar à ativação ou à inibição das funções da célula hospedeira. Como por exemplo, a inibição de processos oxidativos (sistema microbicida dependente de oxigênio) e produção de óxido nítrico (RITTIG; BOGDAN, 2000).

Deve-se destacar que o protozoário apresenta características próprias que permitem sua evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Ainda no tubo digestivo do inseto vetor, durante seu ciclo de crescimento, as formas promastigotas evoluem de um

estágio não-infectivo (fase logarítmica de crescimento) para outro altamente infectivo (fase estacionária, metacíclica). Durante a metaciclogênese, ocorre a superexpressão da gp63 (RUSSEL; ALEXANDER, 1988) e alongamento da molécula de LPG (aumento do número de unidades repetitivas de dissacarídeos fosforilados), que, quando da interação com a célula do hospedeiro, impedem a deposição de complexos do sistema complemento promotor da lise celular, além de interferirem na ativação de componentes terminais do complemento, protegendo o parasita (SACKS; KAMHAWI, 2001).

As moléculas que compõem a superfície do parasito também interferem na atividade do macrófago – a gp63 degrada enzimas lisossômicas e o LPG inibe a geração de metabólitos oxidativos e a ação de enzimas lisossomais, eliminando os radicais de oxigênio. A fosfatase ácida, diretamente relacionada com a virulência do parasito também tem a capacidade de bloquear a produção de radicais de oxigênio pelos macrófagos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

## CARACTERÍSTICA DA DOENÇA

O diagnóstico de LTA abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (pesquisa parasitológica e diagnóstico imunológico). Frequentemente a associação de alguns desses elementos é necessária para se chegar ao diagnóstico final (MANSON-BAHR, 1987).

A leishmaniose cutânea (LC) é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor, para qualquer das espécies de *Leishmania* spp causadoras da doença. A lesão primária é geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões (MARZOCHI, 1992). Surge após um período de incubação variável de 10 dias a três meses, como uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo. Acompanha-se de adenopatia regional, com ou sem linfangite, em 12 a 30% dos casos. Com a evolução, ganha destaque o notável polimorfismo das lesões sendo possível encontrar formas impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide. São frequentes as ulcerações com bordas elevadas, endurecidas e fundo com tecido de granulação grosseira, configurando a clássica lesão com borda em moldura (Figura 4). O quadro é normalmente assintomático, predominando nas áreas corpóreas descobertas e se instala em pacientes de áreas endêmicas ou que lá estiveram recentemente. Na maioria dos casos, a infecção progride e, após um período de latência clínica de vários meses de duração, surgem lesões cutâneas e/ou mucosas, conseqüentes à disseminação hematogênica e/ou linfática do parasita (FURTADO, 1994).

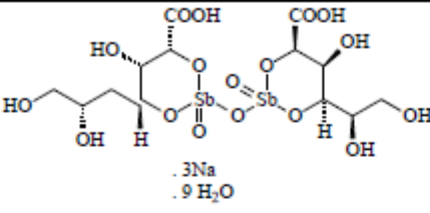
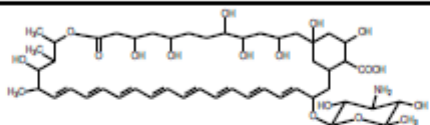
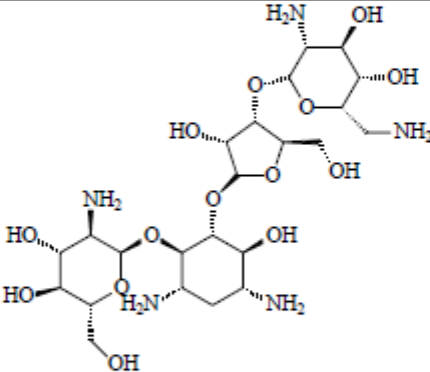
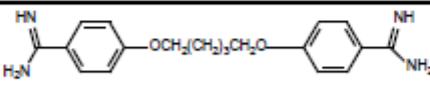
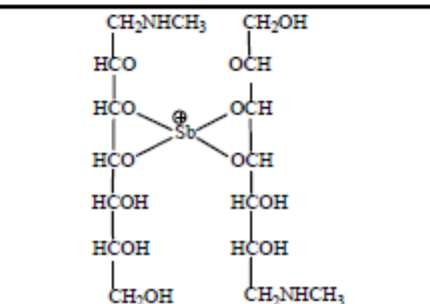


**Figura 4** – LTA forma cutânea, lesão clássica em moldura.  
**Fonte:** (GONTIJO; CARVALHO, 2003)

## TRATAMENTOS

Os medicamentos utilizados para o tratamento das leishmanioses apresentam vários problemas, incluindo alta toxicidade e muitos efeitos adversos, levando os pacientes a abandonarem o tratamento podendo, assim, ocorrer o surgimento de cepas resistentes. Além disso, o elevado valor dos compostos faz o tratamento tornar-se custoso, o que só vem aumentando com o passar dos anos. (YARDLEY et al., 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2004).

Os medicamentos (Figura 5) de primeira escolha contra as leishmanioses incluem os antimoniais pentavalentes, principalmente estibogluconato de sódio e antimoniato de *N*-metilglucamina, utilizados desde a década de 1940 (BERMAN, 1988; OLLIARO; BRYCESON, 1993; RAHT et al., 2003). Outras substâncias, como pentamidinas, anfotericina B e paromomicina são usadas como segunda escolha em casos de cepas resistentes, mesmo sendo muito tóxicos para o hospedeiro (RAMOS et al., 1990; KUHLENCORD et al., 1992; ESCOBAR et al., 2001; BRAY et al., 2003; ROSA et al. 2003). O surgimento de cepas resistentes à pentamidina, assim como as dificuldades no tratamento de pacientes imunodeprimidos, nos quais as substâncias convencionais são menos ativas, necessitando de doses mais altas e um maior período de tratamento já vem sendo relatados na literatura. (ESCOBAR et al., 2001; BRAY et al., 2003).

NOME		ESTRUTURA-2D	FÓRMULA QUÍMICA	MASSA MOLAR (g/ml)
COMERCIAL	QUÍMICO			
Pentostan®	Estibogluconato de sódio		$C_{12}H_{38}Na_3O_{26}Sb_2$	910,9
Fungizona	Anfotericina B		$C_{47}H_{73}NO_{17}$	924,084
Humatina	Sulfato de Paromomicina		$C_{23}H_{47}N_5O_{18}S$	615,629
Pentamidina	Isotionato de Pentamidina		$C_{19}H_{24}N_4O_2$	340,42
Glucantime	Antimoniato de Meglumina		$C_{14}H_{29}O_{10}N_2Sb$	507,01

**Figura 5** – Substâncias mais comumente usadas para o tratamento das Leishmanioses.  
**Fonte:** (SANTOS et al., 2008)

Várias pesquisas têm sido feitas visando o desenvolvimento de novos protocolos e procura de novos quimioterápicos para o combate as leishmanioses com o propósito de reduzir os problemas relacionados aos medicamentos já em uso e melhorar a eficiência do tratamento. (MA et al., 2004)

A associação de algumas substâncias já utilizadas para o tratamento das leishmanioses com lipossomas é uma das alternativas usadas para reduzir os efeitos colaterais indesejáveis. Este procedimento não somente reduziu a toxicidade como também aumentou

sua eficiência e concentração nos tecidos (DESJEUX; ALVAR, 2003; GONTIJO; CARVALHO, 2003). O provável mecanismo de ação dos lipossomas está relacionado com a membrana do parasita e a inibição do consumo de oxigênio (ROSA et al., 2003).

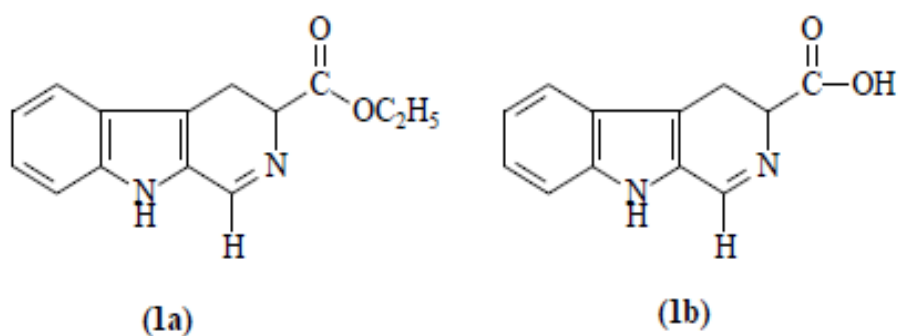
O composto Anfotericina B é usado no tratamento de pacientes com calazar (LV) que são clinicamente resistentes à pentamidina. Esta molécula preferencialmente se liga ao ergosterol da membrana plasmática de *Leishmania* spp, e também reconhece o colesterol da membrana celular humana. Pensando em diminuir este efeito adverso da molécula, algumas formulações têm sido feitas associando anfotericina B a lipídios (Ambisome, Abelcet e Amphotec). Infelizmente a produção é muito custosa o que torna estes medicamentos de difícil acesso aos países pobres (GOLENSER et al., 1999).

Algumas substâncias sintéticas desenvolvidas para o tratamento de outras enfermidades também têm sido alvo para o tratamento das leishmanioses. Um exemplo é a miltefosina (Hexadecilfosfocolina) amplamente utilizada no tratamento de câncer. Aparentemente, ela estimula o sistema hematopoiético e imune com a ativação de células T e macrófagos e também com o aumento da produção de interferon-  $\gamma$  (ESCOBAR et al., 2001), porém, desvantagens como efeito teratogênico e aumento no número de parasitos resistentes também têm sido relatadas (SANTOS et al., 2008).

O desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose está diretamente relacionado à resposta imune do hospedeiro e ao desenvolvimento da imunidade em pacientes que já tiveram LV e LC. (MUKHOPADHYAY et al., 2000). Baseado na utilização de parasitas atenuados ou mortos, isolamento e purificação de antígenos e parasitas encapsulados em lipossomas, estes procedimentos para a obtenção de novas vacinas vêm sendo amplamente investigados (SOONG et al., 1995; MUKHOPADHYAY et al., 2000; MUTISO et al., 2010).

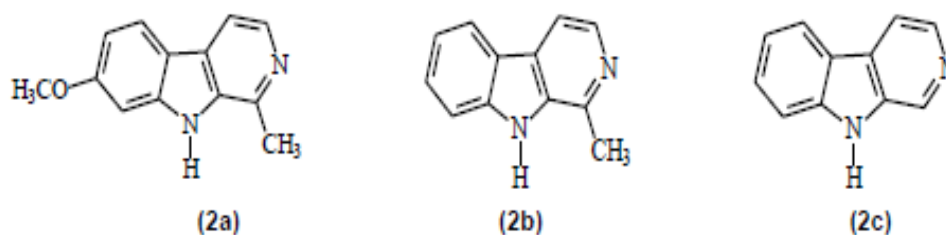
COMPOSTOS  $\beta$ -CARBOLÍNICOS

Alcalóides  $\beta$ -carbolínicos e tetraidro- $\beta$ -carbolínicos, naturais ou sintéticos, têm sido alvo de vários estudos químicos e biológicos. O interesse biológico por esta classe de compostos deve-se à ocorrência destes em alimentos (HERRAIZ, 2000), frutas e seus sucos (HERRAIZ; GALISTEO, 2003), tecidos (cérebro humano e animal) (PEURA et al., 1989; FEKKES et al., 2001), e fluidos biológicos como observado por Braestrup e colaboradores (1980) que identificaram na urina humana o composto etil 3,4-diidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxilato (**1a**), que foi caracterizado como um potente deslocador de [ $^3$ H]diazepan no cérebro e o composto 3,4-diidro- $\beta$ -carbolina-3-ácido carboxílico (**1b**) que pode fazer parte de um ligante endógeno para receptores benzodiazepínicos.



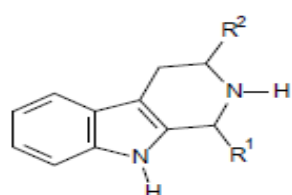
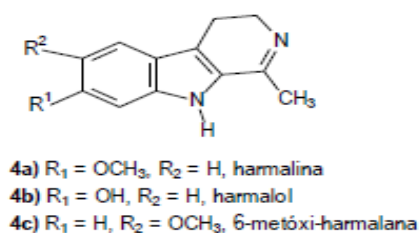
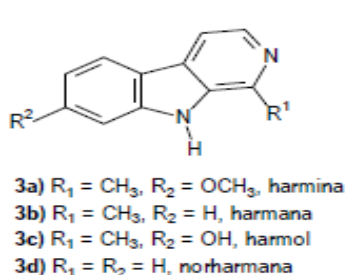
Esta classe de compostos apresenta ainda uma ampla variedade de propriedades farmacológicas, tais como antimalárica (KIRSH et al., 2000; TAKASU et al., 2004), antifilarias (SRIVASTAVA et al., 1999a; 1999b), antioxidante (TSE et al., 1991), antitumoral (FONTANA et al., 2002; CASTRO et al., 2003; CAO et al., 2004; 2005a; 2005b; ZAO et al., 2006; FORMAGIO et al., 2008), antiviral (FORMAGIO et al., 2009) e antimicrobiana contra bactérias e fungos (MOLINA et al., 1994; GUL; HAMANN, 2005).

Cao e colaboradores (2005a) observaram que os compostos  $\beta$ -carbolínicos contendo um sistema policíclico planar como harmina (**2a**), harmano (**2b**) e norharmano (**2c**), apresentaram alta citotoxicidade frente a várias linhagens de células tumorais humanas. Estudos mecanísticos indicaram que as  $\beta$ -carbolinas podem intercalar entre as hélices do DNA e inibir a topoisomerase I e II causando danos ao DNA. Estes mesmos estudos mostraram uma correlação direta entre a habilidade de intercalação ao DNA e a citotoxicidade destes compostos.

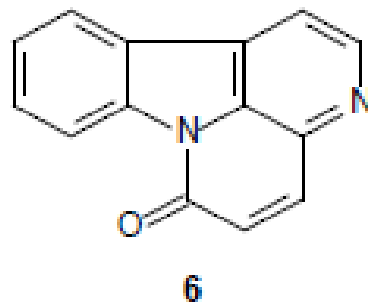


Vários autores têm estudado as atividades tripanocida e leishmanicida dos compostos  $\beta$ -carbolínicos. Calvin e colaboradores (1987) avaliaram a atividade tripanocida frente às formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* dos compostos  $\beta$ -carbolínicos (**3a-c**) e diidro- $\beta$ -carbolínicos (**4a-c**). Os resultados obtidos sugerem que a atividade tripanocida destes compostos parece estar associada à insaturação do anel piridínico. No estudo de Rivas e colaboradores (1999), realizado com as  $\beta$ -carbólinas (**3a-d**), as diidro- $\beta$ -carbólinas (**4a-b**), e as tetraidro- $\beta$ -carbólinas (**5a-b**), concluiu-se que a completa aromaticidade do anel piridínico pode ser uma condição necessária para melhorar a atividade tripanocida desta classe de compostos. Isso estaria associado com a planaridade da molécula, com seu comportamento redox ou com sua distribuição de densidade eletrônica.

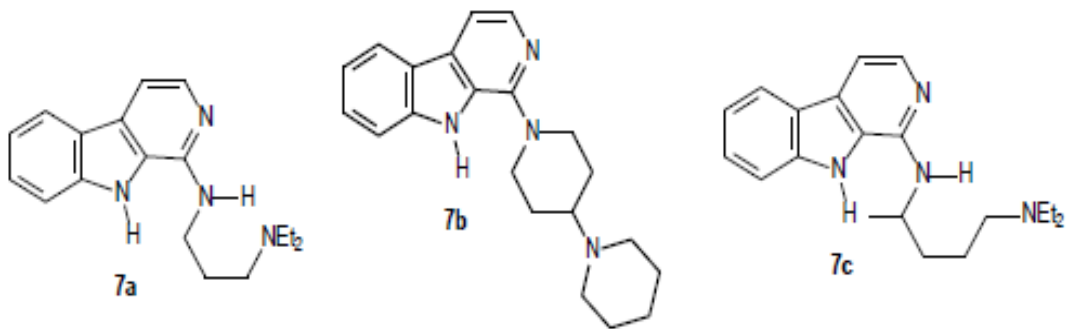
Giorgio e seus colaboradores (2004) investigaram a atividade leishmanicida das  $\beta$ -carbólinas harmina (**3a**), harmana (**3b**) e harmalina (**4a**) frente ao parasita da espécie *L. infantum*. Os compostos (**3a**) e (**3b**) exibiram atividade frente às formas promastigotas com  $CI_{50}$  de 3,7 e 19,2  $\mu$ M, enquanto (**4a**) foi inativa ( $CI_{50} = 116,8 \mu$ M).



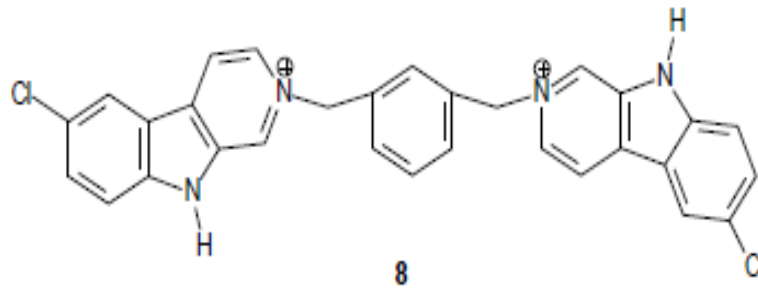
Recentemente foi relatada a avaliação da atividade *in vivo* do alcalóide cantin-6-ona (**6**) frente ao parasita *T. cruzi*, que apresentou baixa toxicidade e uma importante atividade tripanocida na infecção aguda e crônica. Este alcalóide também foi testado *in vivo* em camundongos infectados com *L. amazonensis* mostrando que sua administração intralesional causou um interessante efeito leishmanicida, juntamente com resultados de baixa toxicidade (FERREIRA et al., 2007).



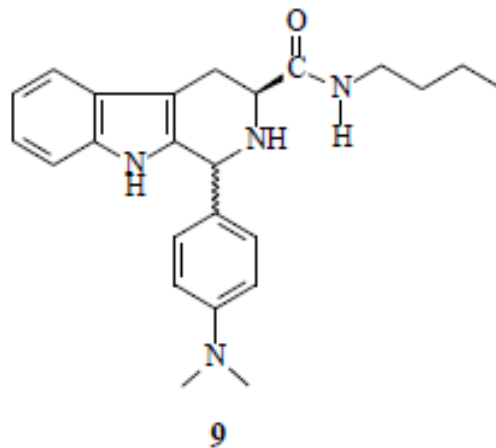
Boursereau e Coldhan (2004) sintetizaram e testaram doze  $\beta$ -carbolinas frente a *T. cruzi* obtendo valores de  $CI_{50}$  entre 1,62 - 30  $\mu\text{g/mL}$ . Os compostos (**7a-c**) foram os mais ativos, com valores de  $CI_{50}$  de 5,47; 7,04 e 9,26  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



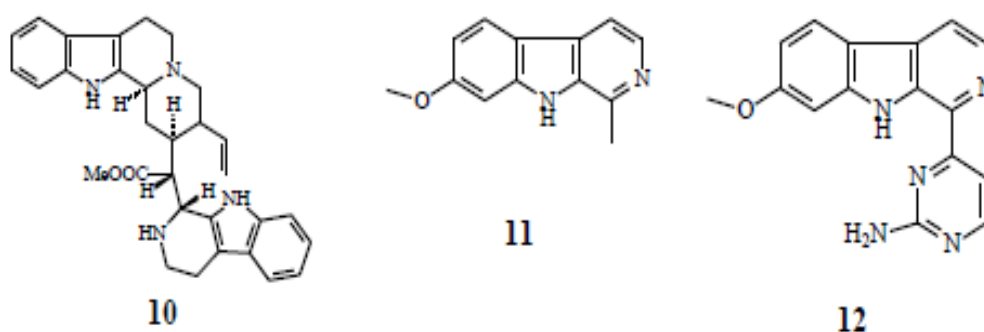
Também em 2004, Giorgio e colaboradores sintetizaram uma série de alcalóides  $\beta$ -carbólicos quaternários e testaram suas atividades frente a diversos parasitas. O composto (**8**) destacou-se frente ao protozoário *T. cruzi* com  $CI_{50}$  de 5,9  $\mu\text{M}$ .



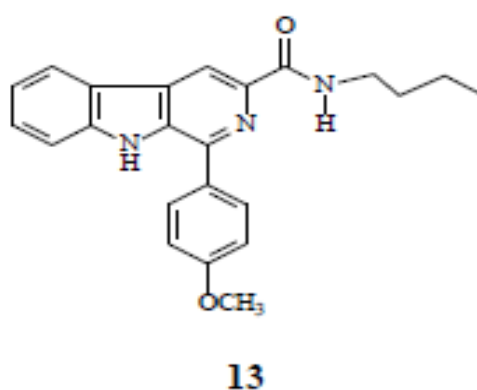
Em 2009, Valdez e colaboradores sintetizaram uma série de tetraidro  $\beta$ -carbolina-3- carboxamidas e testaram frente ao protozoário *T. cruzi* obtendo uma ótima atividade tripanocida com  $CI_{50}$  de 14,9  $\mu$ M com o composto (**9**).



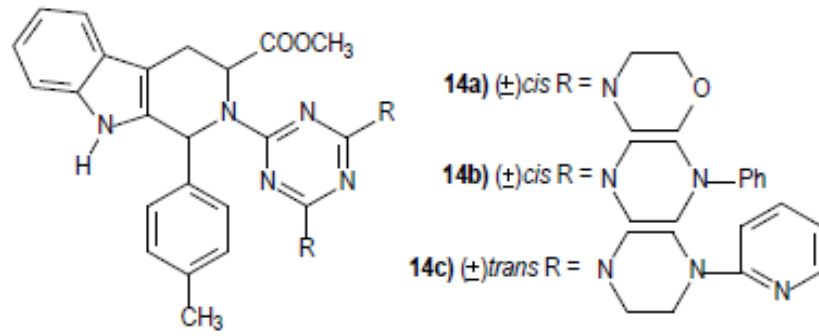
Frente aos protozoários do gênero *Leishmania*, vários grupos de pesquisa têm testado compostos  $\beta$ -carbolínicos sintéticos e isolados de plantas. Em 1999, Kam e colaboradores isolaram o alcalóide tetraidro  $\beta$ -carbolínico buchtienina (**10**) de *Kopsia griffithii* e avaliaram este como tendo uma ótima atividade antileishmania com  $CI_{50}$  variando de 0,30 a 1,56  $\mu$ g/mL em *L. donovani*. Em 2004, Lala e colaboradores também reportaram a atividade antileishmania do alcalóide  $\beta$ -carbolínico harmina (**11**) isolado da espécie *Peganum harmala*. Costa e colaboradores (2006) isolaram o composto annomontina (**12**), um alcalóide  $\beta$ -carbolínico com o grupo pirimidina, de galhos da espécie brasileira *Annona foetida* e testaram em *L. braziliensis* obtendo valor de  $CI_{50}$  de 34,8  $\mu$ g/mL.



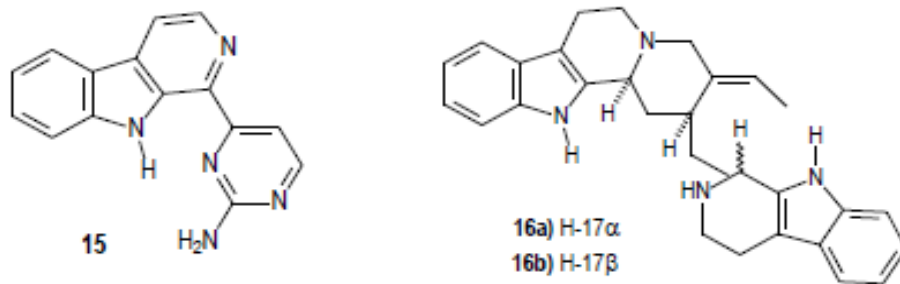
Tonin e colaboradores (2010) sintetizaram uma série de  $\beta$ -carbólinas 1-fenilsubstituídas contendo o grupo *N*-butilcarboxiamida no C-3 do núcleo  $\beta$ -carbólico e avaliaram sua atividade *in vitro* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* e formas epimastigota de *T. cruzi*. Dentre os compostos avaliados, o composto (**13**) foi o mais ativo frente aos dois protozoários. Para as formas promastigotas de *L. amazonensis* o  $CI_{50}$  foi de 0,25  $\mu$ M e índice de seletividade de 2084 em macrófagos J774G8, enquanto para as formas epimastigotas de *T. cruzi* o  $CI_{50}$  foi de 3,22  $\mu$ M e o índice de seletividade foi de 161,8 na mesma linhagem celular.



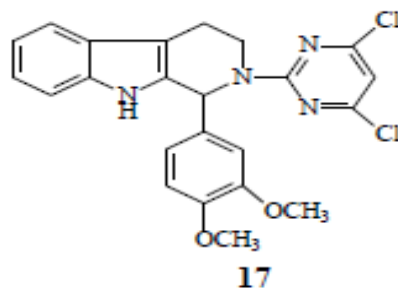
Os compostos tetraidro- $\beta$ -carbólicos (**14a-c**) apresentaram uma porcentagem de inibição *in vivo* frente ao parasita *L. donovani* de 78, 78,6 e 68%, respectivamente. Este resultado mostrou-se bom, já que a porcentagem de inibição apresentada pela substância de referência (estibogluconato de sódio) foi de 90,0% (KUMAR et al., 2005)



Outras  $\beta$ -carbolidinas como **(15)** apresentaram uma boa atividade frente a *L. braziliensis* com  $CI_{50}$  de 34,8  $\mu$ M (COSTA et al., 2006), e as tetraidro- $\beta$ -carbolidinas **(16a)** e **(16b)** foram ativas frente a *L. amazonensis* com  $CI_{50}$  de 16,3 e 4,9  $\mu$ g/mL (TANAKA et al., 2007).



Kumar e colaboradores (2010) sintetizaram uma série de derivados 2-(pirimidina-2-il)-1-fenil-2,3,4,9-tetraidro- $\beta$ -carbolidínicos e avaliaram suas atividades *in vitro* frente ao protozoário *L. donovai*. O composto **(17)** exibiu um  $CI_{50}$  de 1,93  $\mu$ g/mL para as formas amastigotas e um índice de seletividade de 15,43 em macrófagos J774A-1 o que foi bem melhor que as substâncias de referência estibogluconato de sódio (6,38) e pentamidina (2,07).



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias *1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-ácido carboxílico* (substância **2**), *N-isopropil 1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-carboxamida* (substância **3**), *N-cicloexil 1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-carboxamida* (substância **4**) e *N-benzil 1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-carboxamida* (substância **5**) em *Leishmania amazonensis*.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar o efeito das substâncias no crescimento de formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*.
- Verificar a citotoxicidade das substâncias em macrófagos J774G8 avaliando seus índices de seletividade frente às formas promastigotas.
- Verificar o efeito da substância *N-benzil 1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-carboxamida* (substância **5**) em formas amastigotas intracelulares.
- Avaliar alterações ultraestruturais e morfológicas causadas pela ação das substâncias *1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-ácido carboxílico* (substância **2**) e *N-benzil 1-(4-metóxi)fenil-9H- $\beta$ -carbolina-3-carboxamida* (substância **5**) em formas promastigotas de *L. amazonensis* utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura.

**ARTIGO CIENTÍFICO – “ $\beta$ -CARBOLINE-3-CARBOXAMIDE DERIVATIVES AS PROMISING ANTILEISHMANIAL AGENTS”**

**Raíssa Bocchi Pedroso, Lílian T. Düsman Tonin, Tania Ueda-Nakamura, Benedito Prado Dias Filho, Maria Helena Sarragiotto, Celso Vataru Nakamura.**

Address for correspondence: Celso Vataru Nakamura  
Universidade Estadual de Maringá  
Departamento de Ciências Básicas da Saúde  
Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos  
Bloco B-08 Sala 06 CCS  
Avenida Colombo, 5790  
BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil.  
Phone: +55 44 3041-5012.  
E-mail address: cvnakamura@uem.br

Artigo submetido à publicação na Revista Biomedicine & Pharmacotherapy

“ $\beta$ -CARBOLINE-3-CARBOXAMIDE DERIVATIVES AS PROMISING ANTILEISHMANIAL AGENTS”

Raíssa Bocchi Pedroso<sup>a</sup>, Lílian T. Düsman Tonin<sup>b</sup>, Tania Ueda-Nakamura<sup>c</sup>, Benedito Prado Dias Filho<sup>a,c</sup> Maria Helena Sarragiotto<sup>b</sup>, Celso Vataru Nakamura<sup>a,c</sup>.

**Abstract**

Leishmaniasis, caused by species of the genus *Leishmania*, has an overwhelming impact on global public health especially in tropical and subtropical countries. The currently available antileishmanial drugs depend on pentavalent antimony compounds (sodium stibogluconate - Pentostam and meglumine) which have serious side effects and low efficacy. A great number of natural and synthetic compounds have been tested in the past few years against *Leishmania* and the importance of  $\beta$ -carboline class of compounds, including natural and synthetic  $\beta$ -carbolines alkaloids is well established in antiparasitic chemotherapy. In the present study three 1-substituted  $\beta$ -carboline-3-carboxamides (**3-5**) and 1-substituted  $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (**2**) were synthesized and screened for antileishmanial activity against promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis* and also for cytotoxicity assays with macrophages J774G8. The activity of 1 *N*-benzyl 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (**5**) was evaluated against intracellular amastigote and compounds 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (**2**) and *N*-benzyl 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (**5**) for its morphological and ultrastructural analysis. Compound **5** had the best activity against promastigote and axenic amastigote forms with IC<sub>50</sub> of 2.6  $\mu$ M and 1.0  $\mu$ M, respectively. Its CC<sub>50</sub> was higher than 2,457.0  $\mu$ M with a SI ratio of 930.2. Against intracellular amastigotes it had a dose dependent relationship with a 50% growth inhibitory concentration of 1.0  $\mu$ M. Through morphological and ultrastructure analysis of promastigote forms treated with compound **5**, it was observed alterations on cell shape and number of flagella. Alteration on cell division and damaged nuclear membrane was also observed. For this, compound *N*-benzyl 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (**5**) supports the idea for more *in vitro* and *in vivo* studies.

**Keywords:** Antileishmanial activity.  $\beta$ -carboline-3-carboxamides. Ultrastructure analysis.

---

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, CEP 86051-990, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Química, Laboratório de Química Orgânica Bloco 31 sala 01 DQI, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Bloco B-08 Sala 06 CCS, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil. Phone: +55 44 3041-5012. E-mail address: cvnakamura@uem.br

## 1 INTRODUCTION

Leishmaniasis are a complex of diseases caused by different species of the genus *Leishmania* and has an overwhelming impact on the global public health especially in tropical and subtropical countries with a prevalence of 12 million cases. The parasite exists as the flagellated promastigote form in the female phlebotomine sandfly vector and the obligate intracellular amastigote form in the mammalian host. Infection by various strains of *Leishmania* causes a wide spectrum of diseases in humans, with many different clinical manifestations (cutaneous, mucocutaneous, and visceral). Cutaneous leishmaniasis affect almost 1.5 million people around the world and the species *Leishmania amazonensis* is the causative agent of Tegument American Leishmaniasis. This illness frequently self-cures within 3-18 months but it leaves disfiguring scars, followed by discrimination, stigma, and sub-standard living conditions for those infected [1,2].

The currently available anti-leishmanial drugs depend on pentavalent antimony compounds that require parenteral administration of high doses and a lengthy course of treatment, resulting in a marked increase in serious side effects and low efficacy. Sodium stibogluconate (Pentostam) and meglumine are the drugs of choice for the treatment of this illness [1] but they are toxic, and are prone to stimulate drug resistance [3].

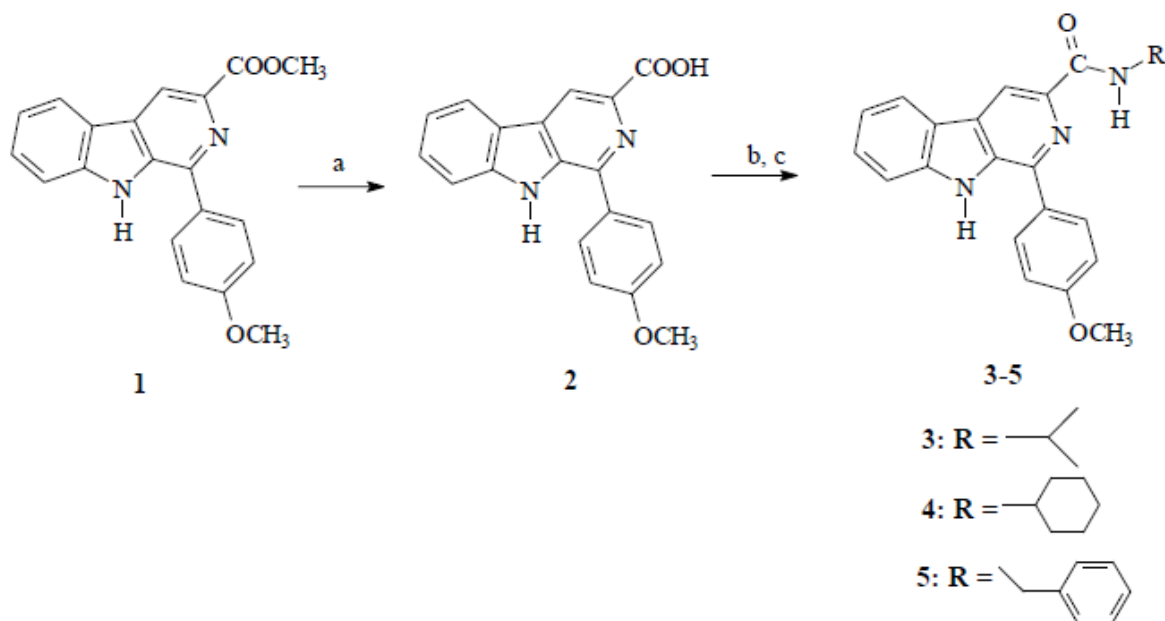
A great number of natural and synthetic compounds have been tested in the past few years against leishmaniasis [4,5] and the importance of  $\beta$ -carboline class compounds is well established in antiparasitic chemotherapy [1, 6, 7], moreover, natural and synthetic  $\beta$ -carbolines alkaloids, also showed biological activities as antitumoral [8], anti-viral (HSV-1, HSV-2, and Poliovirus) [9], and parasitocidal, mainly against *T. cruzi* [10, 11].

In a recent work, we demonstrated the *in vitro* activity of some N-alkyl-(1-phenylsubstituted- $\beta$ -carboline)-3-carboxamides against epimastigote form of *T. cruzi* and promastigote form of *L. amazonensis* [12]. In the present study, the 1-(4-methoxy)phenyl- $\beta$ -carboline-3-carboxamides **3-5** were synthesized and screened for leishmanicidal activity against promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis* and for cytotoxicity. The activity of *N*-benzyl 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (**5**) was evaluated against intracellular amastigote and compounds 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (**2**) and *N*-benzyl 1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (**5** for its morphological and ultrastructural analysis.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 General procedure for the synthesis of $\beta$ -carbolines 3-carboxamides

The synthetic route for  $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid **2** and *N*-alkyl- $\beta$ -carboline-3-carboxamides **3**, **4**, and **5** is outlined in Scheme 1. The methyl  $\beta$ -carboline-3-carboxylate (**1**) was synthesized through a Pictet-Spengler condensation of the L-tryptophan methyl ester with 4-methoxybenzaldehyde, in acid media, followed by oxidation with sulfur in refluxing xylene, in according with procedures previously reported [8]. The methyl  $\beta$ -carboline-3-carboxylate **1** was treated with water/methanol in basic media, to afford the  $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid **2**. The compound **2** was treated with thionyl chloride and then with the amines isopropylamine, cyclohexylamine and benzylamine, in THF and triethylamine, to afford the compounds **3-5**, respectively.



**Scheme 1** – Reagents and conditions: a) CH<sub>3</sub>OH, NaOH aqueous, reflux, 12h; 85%. b) SOCl<sub>2</sub>, reflux, 3h; 73%. c) isopropylamine, cyclohexylamine or benzylamine, Et<sub>3</sub>N, ta, 12h; 70- 75%.

### 2.2 Parasites

Promastigote forms of *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/75/Josefa strain were maintained at 25 °C in Warren's medium pH 7.2 (brain heart infusion broth

enriched with hemin and folic acid) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Axenic amastigote forms were maintained at 32 °C in Schneider's medium pH 4.2 supplemented with 20% FBS.

### 2.3 Cells

J774G8 murine macrophages were maintained at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>-air mixture in RPMI 1640 medium (Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y.) with sodium bicarbonate and L-glutamine and supplemented with 10% FBS.

### 2.4 Antileishmanial activity

Promastigotes ( $1 \times 10^6$  parasites) were grown in a 24-wells plate in Warren's medium supplemented with 10% inactivated FBS and different concentrations of compounds **2**, **3**, **4**, or **5**. Axenic amastigotes ( $1 \times 10^6$  parasites) were grown in a 12-well plate in Schneider's medium, pH 4.2, supplemented with 20% FBS and different concentrations of the same compounds. The cell density, for each treatment, after 72 h of incubation, was obtained with a hemocytometer (Improved Double Neubauer) and the 50% (IC<sub>50</sub>) and 90% (IC<sub>90</sub>) Inhibitory growth concentration was determined. Each experiment was performed three times on different occasions.

### 2.5 Cytotoxicity assay

Adherent J774G8 macrophage cells were suspended to yield  $5 \times 10^5$  cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and added to each well in 96-wells microtitre plates. The plates were incubated in a 5% CO<sub>2</sub>-air mixture at 37 °C to obtain confluent cell growth. After 24 h, the cells were treated with different concentrations of compounds **2**, **3**, **4** or **5**. The plates were incubated in a 5% CO<sub>2</sub>-air mixture at 37 °C for 48 h. The cultures were then fixed with 10% trichloroacetic acid for 1 h at 4 °C, stained for 30 min with 0.4% sulforhodamine B (SRB) in 1% acetic acid and subsequently washed four times with deionised water. Bound SRB was solubilised with 150 µl of 10 mM unbuffered Tris-base solution. Absorbance was read in a 96-wells plate reader (BIO-TEK Power Wave XS) at 530 nm. Dose-response curves were plotted (values expressed as percentage of control optical

density) and  $CC_{50}$  values (50% cytotoxicity concentration) were estimated by regression analysis.

### *2.6 Activity against intracellular amastigotes*

Peritoneal macrophages from male BALB/c mice (6–8 weeks of age) were collected with 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS), harvested in RPMI 1640 medium pH 7.6 supplemented with 10% FBS ( $5 \times 10^5$  cells/ml) and plated on 13 mm coverslips in a 24-wells culture plates for adherence at 37 °C in a 5%  $CO_2$  atmosphere. Nonadherent cells were then removed and adhered macrophages cultured for 12-16 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. Next, macrophages were infected in multiples of 10 promastigotes per host cell and incubated at 37 °C in 5%  $CO_2$  atmosphere. After 6 h, infected macrophages were treated with different concentrations of compound **5**. After 24 h, the monolayers were fixed with methanol, and stained with Giemsa. The number of amastigotes was determined by counting at least 200 macrophages in duplicate cultures, and results were expressed as the inhibition index (the percentage of infected macrophages by the mean number of internalized parasites per cell). These tests were performed in duplicate on separate occasions.

### *2.7 Scanning electron microscopy*

After treatment with  $IC_{50}$  of compounds **2** or **5** for 72 h, promastigotes were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 2 h. The parasites were washed three times in 0.1 M sodium cacodylate buffer, placed on the poly-L-lysine-coated coverslip, dehydrated in different concentrations of ethanol, critical point-dried in  $CO_2$ , sputter-coated with gold and observed in a Shimadzu SS-550 scanning electron microscope.

### *2.8 Transmission electron microscopy*

After treatment with  $IC_{50}$  of compounds **2** or **5** for 72 h, promastigotes were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at 4 °C, post fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in acetone, and embedded in Epon. Thin sections were stained

with uranyl acetate and lead citrate and examined in a FEI TECNAI 12 transmission electron microscope.

### *2.9 Statistical analysis*

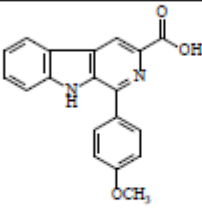
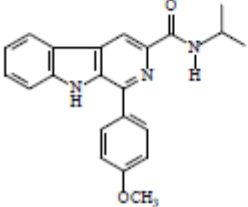
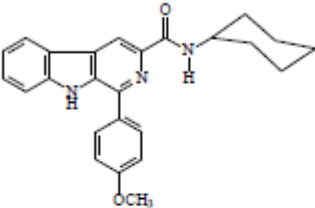
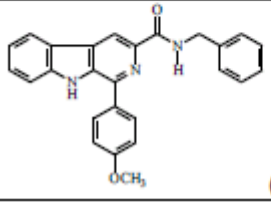
The experiments were performed in triplicate, in three independent experimental sets. The data was analyzed statistically by non-parametric Kruskal–Wallis test to evaluate significant differences. Alternatively, the analysis of variance between groups was made by means of ANOVA test using Statistics 8.0®. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

Natural and synthetic  $\beta$ -carboline alkaloids have been studied for their biological activities. These compounds can be found in biological tissues and fluids [13], in food products as juices and fruits [14], and in plants [15].  $\beta$ -Carbolines compounds have shown great activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp [10-11, 16 - 19]. In a recent work, we demonstrated the *in vitro* activity of some N-alkyl-(1-phenylsubstituted- $\beta$ -carboline)-3-carboxamides [12] against epimastigote form of *T. cruzi* and promastigote form of *L. amazonensis*. In this work we evaluated the biological activity of three N-alkyl 1-(4-methoxy)phenyl- $\beta$ -carboline-3-carboxamides and a 1-substituted  $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid against the protozoa *Leishmania amazonensis*.

The treatment of promastigotes and axenic amastigotes with these synthetic  $\beta$ -carbolines demonstrated that compound **5** had a great activity with 50% and 90% growth inhibitory concentration value ( $IC_{50}$  and  $IC_{90}$ ) of  $2.6 \pm 0.0 \mu\text{M}$  and  $11.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$  for promastigotes and,  $1.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$  and  $41.0 \pm 2.9 \mu\text{M}$  for axenic amastigotes, respectively. The compounds **3** and **4** also had their inhibitory activity enhanced to both forms of protozoan when compared to compound **2** (Table 1). Valdez and co-workers [7] observed that some tetrahydro- $\beta$ -carboline derivatives had their trypanocidal activity enhanced when modifications of the groups attached to C-3 of  $\beta$ -carboline nucleus were done.

**Table 1** – Antileishmanial activity against promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis*, cytotoxic effects, and selectivity index of the  $\beta$ -carboline derivatives.

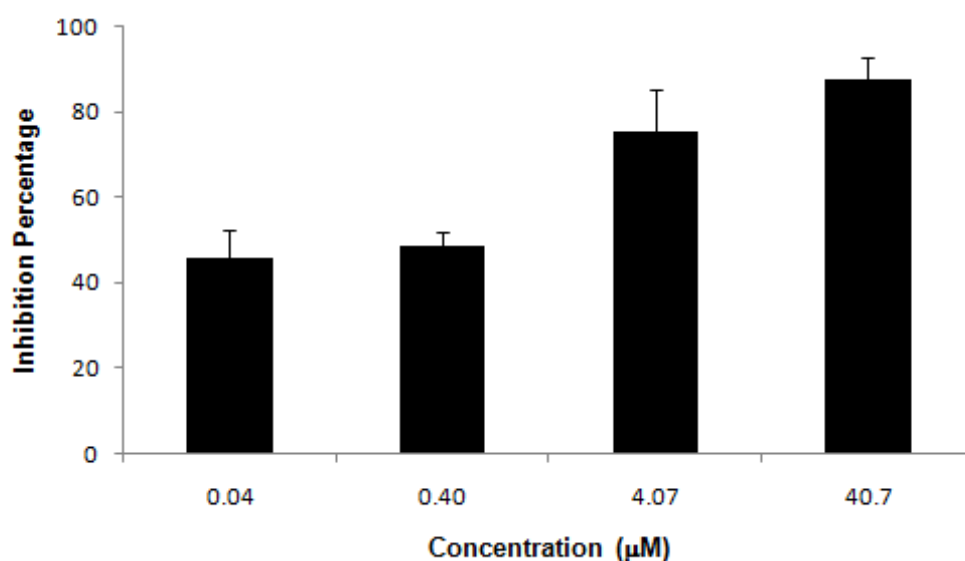
Compound	Molecular weight	Promastigote		Amastigote		Macrophages J774G8 <sup>a</sup>	
		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>90</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>90</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	SI (CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
 (2)	318.0	71.2 $\pm$ 2.8	131.7 $\pm$ 2.0	15.0 $\pm$ 3.7	110.7 $\pm$ 6.7	69.0 $\pm$ 1.2	0.96
 (3)	359.0	5.3 $\pm$ 0.3	12.8 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.0	31.6 $\pm$ 4.0	719.1 $\pm$ 12.5	135.6
 (4)	399.0	3.6 $\pm$ 0.5	11.1 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.2	72.9 $\pm$ 1.3	1,942.3 $\pm$ 44.3	539.4
 (5)	407.0	2.6 $\pm$ 0.0	11.2 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.2	41.0 $\pm$ 2.9	>2,457.0 $\pm$ 0.0	>930.2

Values represent the mean  $\pm$  S.D. of at least three experiments performed in triplicate. SI = CC<sub>50</sub> J774G8/IC<sub>50</sub> promastigote.

<sup>a</sup> On macrophage strain J774G8 at 48 h of culture.

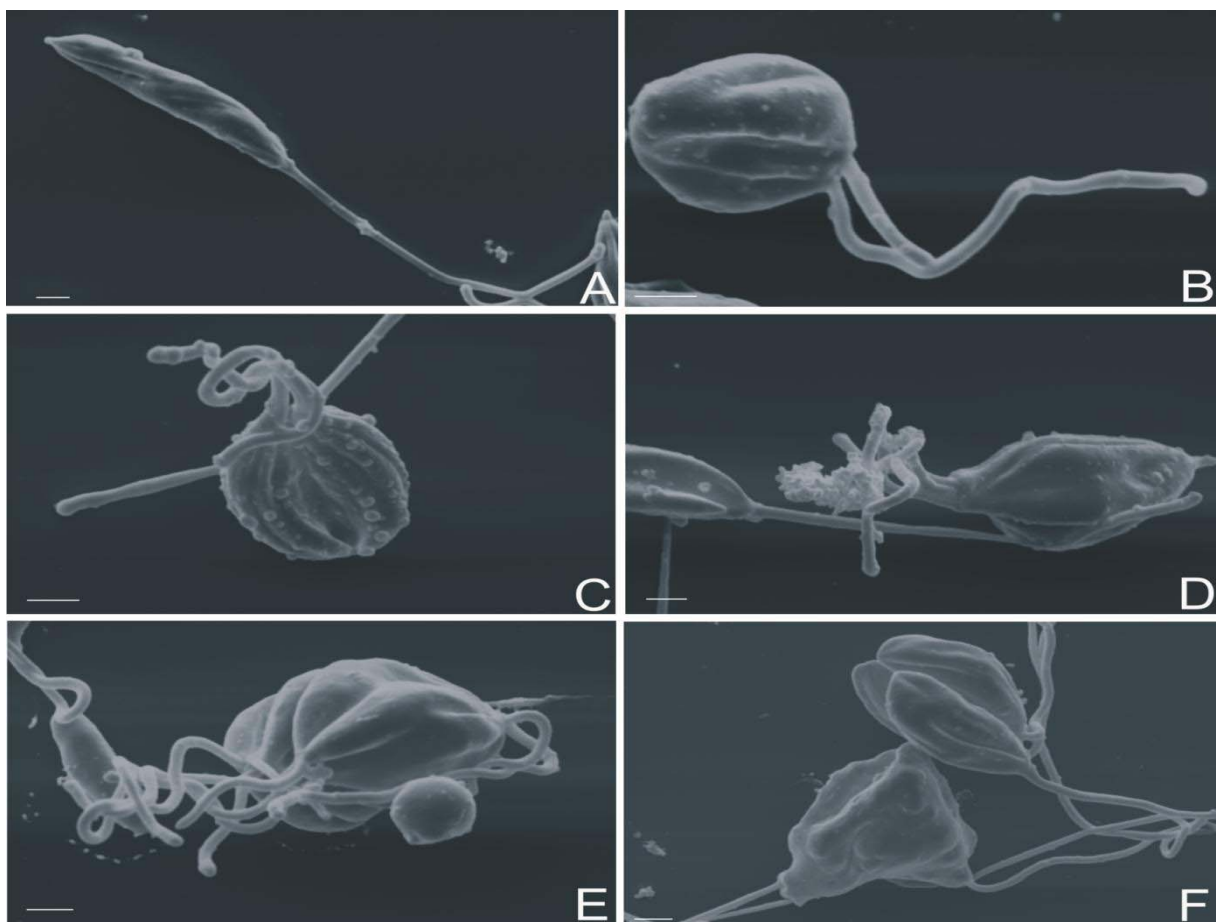
J774G8 murine macrophages were treated with  $\beta$ -carboline compounds to test the nontoxicity of these substances for mammalian cells. When macrophages were treated with compound **5**, the 50% cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) was higher than  $2,457.0 \pm 0.0 \mu\text{M}$  while compound **2** had a  $CC_{50}$  of  $69.0 \pm 1.2 \mu\text{M}$  (Table 1). When compared with the growth inhibitory activity against promastigotes, by using the selective index (SI) (ratio:  $CC_{50}$  J774G8 cells/ $IC_{50}$  protozoa), compound **2** showed a SI of 0.96. On the other hand compounds **3**, **4**, and **5** had higher SI indexes with values of 135.6, 539.4, and 930.2, respectively. Ferreira et al. [20] tested some  $\beta$ -carboline alkaloids in *L. amazonensis* with interesting antileishmanial effect and low toxicity results indicating that those alkaloids could be used for the treatment of cutaneous leishmaniasis. In the present work, it was observed that the introduction of a N-benzylcarboxamide group on the  $\beta$ -carboline nucleus improved the cytotoxicity index of compound **5** when compared with its carboxylic acid precursor (**2**). All results were significant at  $p \leq 0.05$  by non-parametric Kruskal–Wallis test.

Against the clinically important form, the intracellular amastigote, compound **5** showed a dose-dependent relationship (Figure 1) with a reduction in the number of infected cells as well as in the number of intracellular amastigotes. At  $40.7 \mu\text{M}$ , an inhibition of 87.7% of intracellular amastigote was observed, at  $4.07 \mu\text{M}$ , 75.5%, at  $0.40 \mu\text{M}$ , 48.5% and at  $0.04 \mu\text{M}$ , 45.8%. For this, 50% growth Inhibitory concentration of intracellular amastigote was calculated as  $1 \mu\text{M}$ .



**Figure 1**

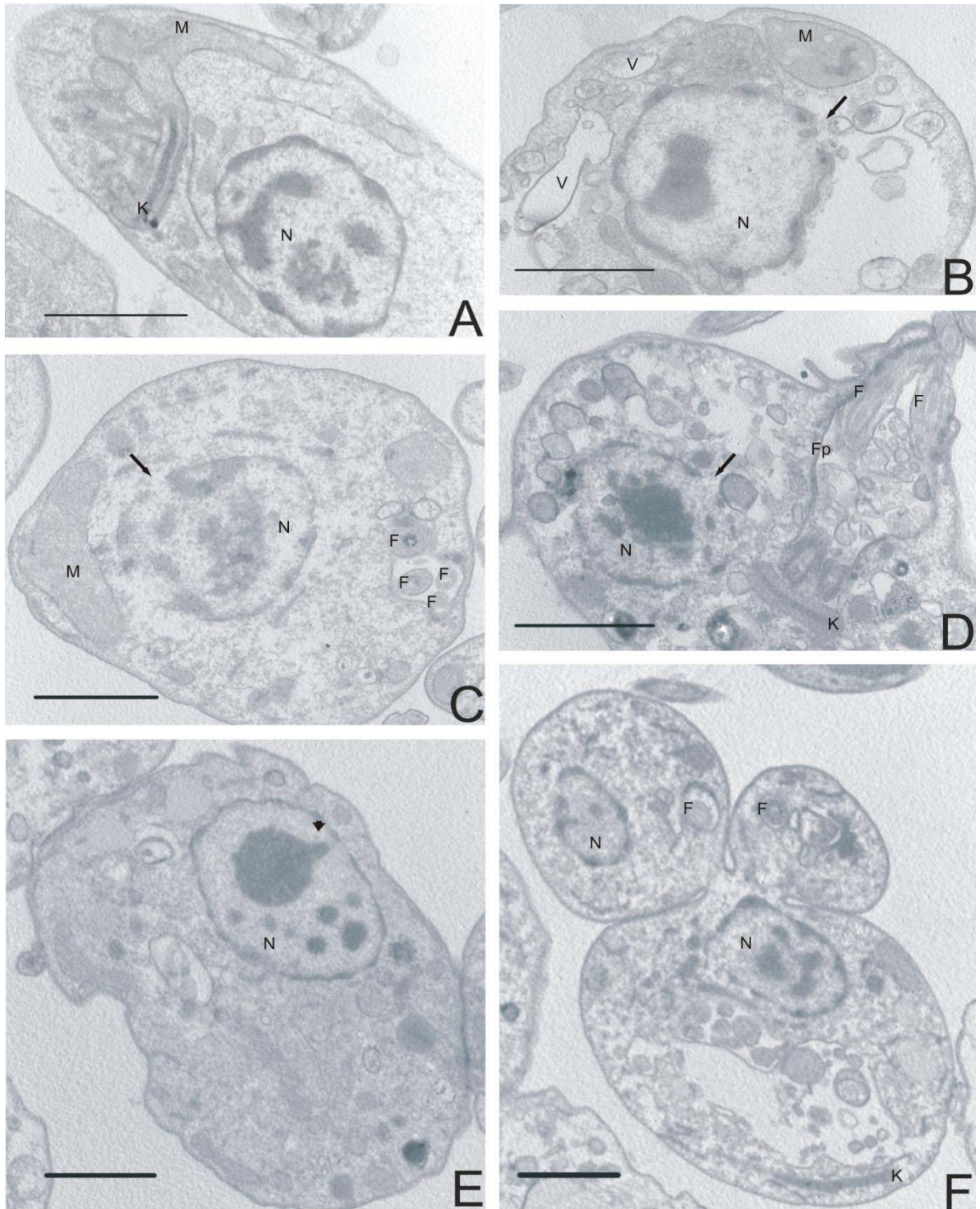
To obtain more information about the possible mechanism of action of compound **2** and **5** on *L. amazonensis*, the cells were analyzed by scanning and transmission electron microscopy. Morphological alterations, visualized by scanning electron microscopy (Figure 2), showed control cells with its elongated body and terminal flagellum (A) and cells treated with IC<sub>50</sub> of compound **2** with a rounding and swelling of the cell body (B). Cells treated with IC<sub>50</sub> of compound **5** had alterations on the cell shape and on the number of flagellum (C and D), and cells treated with IC<sub>90</sub> had their cell division altered, not splicing completely or with a higher number of flagella (E and F).



**Figure 2**

Ultrastructural alterations (Figure 3) showed control cells with some characteristic organelles such as kinetoplast, mitochondria and nucleus (A). Cells treated with IC<sub>50</sub> of compound **2** demonstrated remarkable alterations on the nuclear membrane and multiple flagella (B and C). Cells treated with IC<sub>50</sub> of compound **5** also demonstrated alterations on the nuclear membrane, multiple flagella (D), and alteration on cell division (F)

confirming what was seen at the scanning electron microscopy. The presence of chromocenters can also be observed in these cells (E).



**Figure 3**

Similar results as nuclear chromatin condensation with alteration on nucleus morphology, and appearance of large multivesicular bodies in promastigote forms of *L. amazonensis* treated with BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, were observed by Rodrigues and co-workers [21]. Souza et al. [22] observed severe alterations on nuclei of *T. cruzi* and *L. amazonensis* treated with a phenyl substituted furamide. Another significant ultrastructural change in treated promastigotes with compound **5** was the intense exocytic activity in the region of the flagellar pocket. Some studies have reported that this exocytic activity might occur as a result of the secretion into this region of abnormal lipids, which accumulate as a consequence of drug action, or might indicate a process of exacerbated protein production by the cells as they attempt to survive [23].

Chromocenter is a fuelsen-positive region frequently observed in higher organisms at interphasic nuclei. These chromocenters are extremely rare among protozoa where they are observed as a bud-like projection attached to nucleolus [24]. Smith and Virkki [25] and Drets et al.[26] reported that the heterochromatic segments in nuclei of insects that presented different degrees of ectopic pairing, led to the formation of chromocenters and, that seemed to play an important role in nuclear organization and in segregation of meiotic chromosomes.

The mechanism of leishmanicidal action of alkaloid  $\beta$ -carboline is not well established. Some authors suggested that these compounds associate by intermolecular interaction with prosthetic groups of flavoenzymes, dinucleotids of adenine- flavine (FAD) and riboflavin (RFN) and that they interfere in the synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA) in cancer cells. They also suggest that the association with flavoenzymes and alteration in the synthesis of DNA of the parasite could be the reason of the activity for the compounds tested [10, 16].

The present data showed the effect of a series of  $\beta$ -carboline-carboxamides derivatives against promastigote, axenic amastigote, and intracellular amastigote forms of *L. amazonensis* and also morphological and ultrastructural alterations of the parasite. The compound *N*-benzyl-1-(4-methoxy)phenyl-9H- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (**5**) had a great activity on this protozoan what supports further *in vitro* and *in vivo* studies of this compound.

**Conflict of interest statement**

Nothing declared.

**Acknowledgments**

This study was supported by grants of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, PRONEX/Fundação Araucária, and Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

## References

- [1] Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003;9: 502-8.
- [2]. World Health Organization, REPORT OF THE CONSULTATIVE MEETING ON CUTANEOUS LEISHMANIASIS. Geneva, WHO Headquarters, 30 April to 2 May 2007. WHO/HTM/NTD/IDM/2008.7
- [3] Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2005;21: 508-12.
- [4] Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol* 2008;120: 204–8.
- [5]. Brenzan MA, Nakamura CV, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Corrêa AG, Junior JA, Santos AO, Cortez DAG. Structure-activity relationship of (-) mammea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Biomed Pharmacother* 2008;62: 651-8.
- [6] Chauhan PMS, Srivastava S, Present Trends and Future Strategy in Chemotherapy of Malaria. *Curr Med Chem* 2001;8: 1535-42.
- [7] Valdez RH, Tonin LTD, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Morgado-Diaz JA, Sarragiotto MH, Nakamura CV. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2009;110: 7-14.
- [8] Formagio ASN, Tonin LTD, Foglio MA, Madjarof C, Carvalho JE, Costa WF, Cardoso FP, Sarragiotto MH. Synthesis and antitumoral activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl)  $\beta$ -carboline derivatives. *Bioorg Med Chem* 2008;16: 9660–7.
- [9] Formagio SN, Santos PR, Zanolli K, Ueda-Nakamura T, Tonin LTD, Nakamura CV, Sarragiotto MH. Synthesis and antiviral activity of  $\beta$ -carboline derivatives bearing a substituted carbohydrazide at C-3 against poliovirus and herpes simplex virus (HSV-1). *Eur J Med Chem* 2009; 1-7.

- [10] Rivas P, Cassels BK, Morello A, Repetto Y. Effects of some  $\beta$ -caroline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol* 1999;122: 27-31.
- [11] Tonin LTD, Barbosa VA, Bocca CC, Ramos ERF, Nakamura CV, Costa WF, Basso EA, Ueda-Nakamura T, Sarragiotto MH. Comparative study of the trypanocidal activity of the methyl 1-nitrophenyl-1,2,3,4-9H-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylate derivatives and benzimidazole using theoretical calculations and cyclic voltammetry. *Eur J Med Chem* 2009;44: 1745-50.
- [12] Tonin LTD, Ribeiro MP, Nakamura CV, Rocha KJP, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Costa WF, Sarragiotto MH. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- $\beta$ -carboline)-3-carboxamides. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2010, doi:10.1016/j.biopha.2010.02.006
- [13] Harraiz M, Cuq JL. Analysis of the bioactive alkaloids tetrahydro- $\beta$ -carboline and  $\beta$ -carboline in food. *J Chromatogr* 2000;881: 483-99.
- [14] Harraiz T, Galisteo J. Tetrahydro- $\beta$ -carboline Alkaloids Occur in Fruits and Fruit Juices. Activity as Antioxidants and Radical Scavengers. *J Agric Food Chem* 2003;51: 7156-61.
- [15] Dusman LT, Jorge TCM, Souza MC, Eberlin MN, Meurer EC, Bocca CC, Basso EA, Sarragiotto MH. Monoterpene Indole Alkaloids from *Palicourea crocea*. *J Nat Prod* 2004;67: 1886-8.
- [16] Boursereau Y, Coldham I. Synthesis and biological studies of 1-amino  $\beta$ -carbolines. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14: 5841-4.
- [17] Giorgio CD, Delmas F, Olliver E, Elias R, Balansard G, David PT. *In vitro* activity of the  $\beta$ -carboline alkaloids harmane, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol* 2004;106: 67-74.
- [18] Tanaka JCA, da Silva CC, Ferreira IC, Machado GMC, Leon LL, de Oliveira AJB. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytomedicine* 2007;14: 377-80.

- [19] Barbaras D, Kaiser M, Brun R, Gademann K. Potent and selective antiplasmodial activity of the cyanobacterial alkaloid nostocarboline and its dimers. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18: 4413-5.
- [20] Ferreira ME, de Arias AR, de Ortiz ST, Inchausti A, Nakayama H, Thouvenel C, Hocquemiller R, Fournet A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. *J Ethnopharmacol* 2002;80: 199-202.
- [21] Rodrigues JCF, Urbina JA, Souza W. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol* 2005;111: 230-8.
- [22] de Souza EM, Lansiaux A, Bailly C, Wilson WD, Huc Q, Boykin DW, Batista MM, Araujo-Jorge TC, Soeiro MNC. Phenyl substitution of furamidine markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *Biochem Pharmacol* 2004;68: 593–600.
- [23] Tiunan TS, Ueda-Nakamura T, Cortez DAG, Dias Filho BP, Morgado-Díaz JA, de Souza W, Nakamura CV. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 176-82.
- [24] Bhamrah HS, Juneja K. An introduction to protozoa. Second ed. ANMOL publications PVT. Ltda., New Delhi, 2001.
- [25] Smith SG, Virkki N. Coleoptera. In: John B (ed) *Animal Cytogenetics*. Borntraeger, Berlin, Stuttgart, 1978, pp 366.
- [26] Drets ME, Corbella E, Panzera F, Folle GA. C-banding and non-homologous association II. The “parachute” Xyp sex bivalent and the behavior of heterochromatic segments in *Epilachna paenulata*. *Chromosoma* 1983;88: 249-55.

### Legends for figures.

- Figure 1** – Effect of Compound **5** on *L. amazonensis*-macrophage interaction. Peritoneal macrophages were infected with promastigotes and then treated with different concentrations of the compound. After 72 h the Inhibition percentage was calculated by the equation  $(P2/P1) \times 100$ , where P1 is the inhibition index for the control and P2 is the inhibition index for the treated cells. Inhibition index was calculated by multiplying the percentage of macrophages with internalized parasites and the mean number of internalized parasites per macrophage. Each bar represents  $\pm$  the standard deviation. Significant differences of each group from untreated cell (control) were done using ANOVA test with  $p \leq 0.05$ .
- Figure 2** – Scanning electron microscopy of *L. amazonensis* treated with  $\beta$ -carboline **2** or **5** for 72 h at 25 °C. Control parasite (A) showing the typical elongated body. Protozoa treated with  $IC_{50}$  of compound **2** (B) showing a rounded and swelled body. Protozoa treated with  $IC_{50}$  of compound **5** (C and D) showing alterations on the cell shape and on the number of flagella. Protozoa treated with  $IC_{90}$  of compound **5** (E and F) showing alterations on cytokineses and multiple flagella. Bar = 1  $\mu$ m.
- Figure 3** – Transmission electron microscopy of *L. amazonensis* treated with  $\beta$ -carboline **2** or **5** for 72 h at 25 °C. (A) Control parasite showing characteristic organelles. (B and C) cells treated with  $IC_{50}$  of compound **2** showing remarkable alterations on the nuclear membrane and multiple flagella. (D, E, and F) cells treated with  $IC_{50}$  of compound **5** demonstrating nuclear membrane alterations, cytokineses alterations and multiple flagella. Arrows indicate nuclear membrane alterations and small arrow indicate chromocenters. (F) flagellum, (Fp) flagellar pocket, (K) kinetoplast, (M) mitochondria, (N) nucleus, (V) vacuoles. Bar = 1  $\mu$ m.

## CONCLUSÕES.

- As quatro substâncias testadas, *1-(4-metóxi)fenil-9H-β-carbolina-3-ácido carboxílico* (substância **2**), *N-isopropil 1-(4-metóxi)fenil-9H-β-carbolina-3-carboxamida* (substância **3**), *N-cicloexil 1-(4-metóxi)fenil-9H-β-carbolina-3-carboxamida* (substância **4**) e *N-benzil 1-(4-metóxi)fenil-9H-β-carbolina-3-carboxamida* (substância **5**), inibiram o crescimento tanto de formas promastigotas quanto das formas amastigotas axênicas do protozoário *L. amazonensis* sendo a substância **5** a mais ativa.
- Frente ao teste de citotoxicidade em cultura de macrófagos J774G8, a substância **5** possui o menor efeito citotóxico com um alto índice de seletividade.
- Em formas amastigotas intracelulares obrigatórias, a substância **5** mostrou uma atividade dose-dependente e uma concentração inibitória de 50% de crescimento de 1,0 μM.
- Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura observa-se que a substância **5** alterou a forma do protozoário e aumentou o número de flagelos além de ter uma possível ação na citocinese do parasita, já que é possível observar células com divisão incompleta.
- Na avaliação ultraestrutural, utilizando-se da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, a substância **5** apresentou ação na membrana nuclear e presença de cromocentros.

## REFERÊNCIAS

- BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev. Infect. Dis.* Chicago, v. 10, p. 560-586, 1988.
- BOURSERAU, Y.; COLDHAM, I. Synthesis and biological studies of l-amino  $\beta$ -carbolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Oxford, v. 14, p. 5841-5844, 2004.
- BRAESTRUP, C.; NIELSEN, M.; OLSEN, C. E. Urinary and brain  $\beta$ -carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 77, p. 2288-2292, 1980.
- BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *TRENDS Parasitol.* Oxford, v. 19, p. 232-239, 2003.
- CAO, R.; CHEN, Q.; HOU, X.; CHEN, H.; GUAN, H.; MA, Y.; PENG, W.; XU, A. Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted  $\beta$ -carboline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* Oxford, v. 12, p. 4613-4623, 2004.
- CAO, R.; PENG, W.; CHEN, H.; MA, Y.; LIU, X.; HOU, X.; GUAN, H.; XU, A. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Nova York, v. 338, p. 1557-1563, 2005a.
- CAO, R.; PENG, W.; CHEN, H.; HOU, X.; GUAN, H.; CHEN, Q.; MA, Y.; XU, A. Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of 1,3-bisubstituted and 1,3,9-trisubstituted  $\beta$ -carboline derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* Paris, v. 40, p. 249-257, 2005b.
- CASTRO, A. C.; DANG, L. C.; SOUCY, F.; GRENIER, L.; MAZDIYASNI, H.; HOTTELET, M.; PARENT, L.; PIEN, C.; PALOMBELLA, V.; ADAMS, J. Novel IKK Inhibitors:  $\beta$ -Carbolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Oxford, v. 13, p. 2419-2422, 2003.
- CASTRO, E.A.; LUZ, E.; TELLES, F.Q.; PANDEY, A.; BISETO, A.; DUNAISKI, M.; SBALQUEIRO, I.; THOMAZ-SOCCOL, V. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Acta. Trop.* Basel, v. 93, p. 141-149, 2005.
- CASTRO, E.A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Rio de Janeiro, v. 35, p. 445-452, 2002.
- CAVIN J. C.; KRASSNER, S. M.; RODRIGUEZ, E. Plant-derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.* Lausanne, v. 19, p. 89-94, 1987.
- COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P. A Pyrimidine- $\beta$ -carboline and Other Alkaloids from *Annona foetida* with Antileishmanial Activity. *J.Nat.Prod.* Cincinnati, v. 69, p. 292-294, 2006.

D'OLIVEIRA JÚNIOR, A.; MACHADO, P.; BACELLAR, O.; CHENG, L. H.; ALMEIDA, R. P.; CARVALHO, E. M. Evaluation of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Rio de Janeiro, v. 35, p. 7-10, 2002.

DAVIES, C. R.; COOPER, A. M.; PEACOCK, C.; LANE, R. P. E.; BLACKWELL, J. M. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*. Londres, v. 101, p. 337-343, 1990.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV. Co-infections: epidemiology in Europe. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* Liverpool, v. 97, p. 3-15, 2003.

ESCOBAR, P.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), ambisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington, v. 45, p. 1872-1875, 2001.

FEKKES, D.; TUITEN, A.; BOM, I.; PEPPLINKHUIZEN, L. Pharmacokinetics of the  $\beta$ -carboline norharman in man. *Life Sci.*, Oxford, v. 69, p. 2113-2121, 2001.

FERREIRA, M. E.; NAKAYAMA, H.; ARIAS, A. R. DE; SCHININI, A.; BILBAO, N. V. DE; SERNA, E.; LAGOUTTE, D.; SORIANO-AGATÓN, F.; POUPON, E.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice *J. Ethnopharmacol.* Lausanne, v. 109, p. 258-263, 2007.

FONTANA, A.; BENITO, E. J.; MARTÍN, M. J.; SÁNCHEZ, N.; ALAJARÍN, R.; VAQUERO, J. J.; ALVAREZ-BUILLA, J.; LAMBEL-GIRAUDET, S.; LEONCE, S.; PIERRE, A.; CAIGNARD, D. Synthesis and Cytotoxic Activity of Pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indol-5-inium Derivatives as Anti-Cancer Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Oxford, v. 12, p. 2611-2614, 2002.

FORMAGIO ASN, TONIN LTD, FOGLIO MA, MADJAROF C, CARVALHO JE, COSTA WF, CARDOSO FP, SARRAGIOTTO MH. Synthesis and antitumoral activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl)  $\beta$ -carboline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* Oxford, v. 16, p. 9660-9667, 2008.

FORMAGIO SN, SANTOS PR, ZANOLI K, UEDA-NAKAMURA T, TONIN LTD, NAKAMURA CV, SARRAGIOTTO MH. Synthesis and antiviral activity of  $\beta$ -carboline derivatives bearing a substituted carbonylhydrazide at C-3 against poliovirus and herpes simplex virus (HSV-1). *Eur J Med Chem*, Paris, p. 1-7, 2009.

FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. p. 1-62, 2002. Disponível em: [www.funasa.gov.br](http://www.funasa.gov.br)

FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado- Pinto J(ed), Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p.319-328, 1994.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 9. ed. São Paulo: Ateneu. Cap. 7. p.41-60, 1995.

- GIORGIO CD, DELMAS F, OLLIVER E, ELIAS R, BALANSARD G, DAVID PT. In vitro activity of the  $\beta$ -carboline alkaloids harmane, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. *Exp. Parasitol.* Nova York, v. 106, p. 67-74, 2004.
- GOLENSER, J.; FRANKENBURG, S.; EHRENFREUND, T.; DOMB, A. J. Efficacious treatment of experimental leishmaniasis with amphotericin b-arabinogalactan water-soluble derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington, v. 43, p. 2209-2214, 1999.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Rio de Janeiro, v. 36, p. 71-80, 2003.
- GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* St. Louis. V. 34, p. 257-272, 1996.
- GUL, W.; HAMANN, M. T. Indole alkaloid marine natural products: An established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases *Life Sci.* Oxford, v. 78, p. 442-453, 2005.
- HERRAIZ, T. Analysis of the bioactive alkaloids tetrahydro- $\beta$ -carboline and  $\beta$ -carboline in food. *J. Chromatogr A.* Amsterdam, v. 881, p. 483-499, 2000.
- HERRAIZ, T.; GALISTEO J. Tetrahydro-*b*-carboline Alkaloids Occur in Fruits and Fruit Juices. Activity as Antioxidants and Radical Scavengers. *J. Agric. Food Chem.* Washington, v. 51, p. 7156-7161, 2003.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet North Am Ed.* Boston, v. 354, p. 1191-1199, 1999.
- KAM, T-S.; SIM, K.-M.; KOYANO, T.; KOMIYAMA K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. *Phytochemistry* Oxford, v. 50, p. 75-79, 1999.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *TRENDS Parasitol.* Oxford, v.22, p. 439-445, 2006.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: *Biology of Kinetoplastida*, vol.II (eds W.H.R. Lumsden & D. A. Evans) Academic Press, London/New York, p. 395-460, 1979.
- KILLICK-KENDRICK R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special references to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* Paris, v. 65, p. 37-42, 1990.
- KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* Paris, v. 66, p. 71-74, 1991.
- KIRSH, G.; KONG, G. M.; WRIGHT, A. D.; KAMINSKY, R. A New Bioactive Sesterterpene and Antiplasmodial Alkaloids from the Marine Sponge *Hyrtios cf. erecta* *J. Nat. Prod.* Cincinnati, v. 63, p. 825-829, 2000.
- KUHLENCORD, A.; MANIERA, T.; EIBL, H.; UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington, v. 36, p. 1630-1634, 1992.

KUMAR, A.; KATIYAR, S. B.; GUPTA, S.; CHAUHAN, P. M. S. Syntheses of new substituted triazino tetrahydroisoquinolines and  $\beta$ -carbolines as novel antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem. Paris*, v. 41, p. 106-113, 2005.

KUMAR, R.; KHAN, S.; VERMA, A.; SRIVASTAVA, S.; VISWAKARMA, P.; GUPTA, S.; MEENA, S.; SINGH, N.; SARKAR, J.; CHAUHAN, P. M. S. Synthesis of 2-(pyrimidin-2-yl)-1-phenyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*- $\beta$ -carbolines as antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem. Paris*, v. 45, p. 3274-3280, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. In: Cox, F.E.G., Kreier, J.P., Wakelin, D. (Eds.), 17 New World Leishmaniasis. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Hodder, p. 313-349, 2005.

LALA, S.; PRAMANICK, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; BASU, M. K. Harmine: Evaluation of its Antileishmanial Properties in Various Vesicular Delivery Systems. *J. Drug Target. Yverdon*, v. 12, p. 165-175, 2004.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; RONIGBERG, B. M.; LIEEDALE, G. F.; LEOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the PROTOZOA. *J. Protozool. Nova York*, v. 27, p.37-58, 1980.

MA, G.; KHAN, S. I.; JACOB, M. R.; TEKWANI, B. L.; LI, Z.; PASCO, D. S.; WALKER, L. A.; KHAN, I. A. Antimicrobial and antileishmanial activities of hipocrellins A and B. *Antimicrob. Agents Chemother. Washington*, v. 8, p. 4450-4452, 2004.

MANSON-BAHR, P. E. Diagnosis. In: The Leishmaniasis. London, Peters W. & Kilich-Kendrick R, v.2, p.703-728, 1987.

MARZOCHI, M. C. A Leishmaniose no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *J Bras Med. Brasil*, v. 63, p. 82-104, 1992.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 9. ed. São Paulo: Ateneu, cap. 6. p. 34-40, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2 ed. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, Brasil, p. 180, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial, 1ed. Editora do Ministério da Saúde Brasília, Brasil. p. 136, 2006.

MOLINA, P.; FRESNEDA, P. M.; GARCIA-ZAFRA, S.; ALMENDROS, P. Iminophosphorane-mediated syntheses of the fascaplysin alkaloid of marine origin and nitramarine. *Tetrahedron Lett. Oxford*, v. 35, p. 8851-8854, 1994.

MUKHOPADHYAY, S.; BHATTACHARYYA, S.; MAJHI, R.; DE, T.; NASKAR, K. MAJUMDAR, S.; ROY, S. Use of attenuated leishmanial parasite as an immunoprophylactic and immunotherapeutic agent against murine visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol. Wasington*, v. 7, p. 233-240, 2000.

- MUTISO, J. M.; MACHARIA, J. C.; GICHERU, M. M. A review of adjuvants for *Leishmania* vaccine candidates. *J. Biomed. Res.* Tokio, v.24, p. 16-25, 2010.
- OLLIARO, P. L.; BRYCESON, A. D. M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol. Today.* Amsterdam, v. 9, p.323-328, 1993.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Report of the Consultative Meeting on Cutaneous Leishmaniasis. Geneva, WHO Headquarters, 30 April to 2 May 2007. WHO/HTM/NTD/IDM/2008.7
- PEURA, P.; JOHNSON, J. V.; YOST, R. A.; FAULL, K. F. Concentrations of Tryptoline and Methtryptoline in Rat Brain. *J. Neurochem.* Londres, v. 52, p. 847-852, 1989.
- RAHT, S.; TRIVELLIN, A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N.; MARZAL, P.; JUNIOR, H. F. A.; TEMPONE, A. G. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado de Arte. *Quim. Nova.* São Paulo, v. 26, p.550-557, 2003.
- RAMOS, H.; MILHAUD, J.; COHEN, B. E.; BOLARD, J. Enhanced action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* resulting from heat transformation. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington, v. 34, p. 1584-1589, 1990.
- RITTIN, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-Host-Cell interaction: Complexities and alternative views. *Parasitol. Today.* Amsterdam, v. 16, p. 292-297, 2000.
- RIVAS P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. Effects of some  $\beta$ -caroline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.* Londres, v. 122, p. 27-31, 1999.
- ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M.; PADRÓN, T. S.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington, v. 47, p. 1895-1901, 2003.
- ROSS R. Further Notes on Leishmania's bodies. *Br. Med. J.* Londres, v. 11, p.1401-1406, 1903.
- RUSSELL, D. G.; ALEXANDER, J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J. Immunol.* Baltimore, v. 140, p. 1274-1279, 1988.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* Palo Alto, v. 55, p. 453-483, 2001.
- SANTOS, O. D.; COUTINHO, C. E. R.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.* Berlim, v. 103, p. 1-10, 2008.
- SARAVIA, N. G. L.; VALDERRAMA, M.; LABRADA, A. F.; HOLGUÍN, C.; NAVAS, G.; PALMA, A.; WEIGLE, K. A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* Chicago, v. 159, p. 725-735, 1989.

- SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyd.* Londres, v. 69, p. 323-335, 1975.
- SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U.; LONARDONI, M.V.C.; GUILHERME, A.L.F.; TOLEDO, M.J.O.; RAMOS, M.; ARRAES, S.M.A.A.; BERTOLINI, D.A.; SPINOZA, R.P.; BARBOSA, O.C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil. *Cad. Saúde Públ.* Rio de Janeiro, v. 12, p. 141-147, 1996.
- SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother.* Tokyo, v. 10, p. 307-315, 2004.
- SOONG, L.; DUBOISE, S. M.; KIMA, P.; MCMAHON-PRATT, D. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* Bethesda, v. 63, p. 3559-3566, 1995.
- SRIVASTAVA, S. K.; AGARWAL, A.; CHAUHAN, P. M. S.; AGARWAL, S. K.; BHADURI, A. P.; SINGH, S. N.; FÁTIMA, N.; CHATTERJEE, R. K. Potent 1,3-Disubstituted-9H-pyrido[3,4-b]indoles as New Lead Compounds in Antifilarial Chemotherapy. *Bioorg. Med. Chem.* Oxford, v.7, p. 1223-1236, 1999a.
- SRIVASTAVA, S. K.; AGARWAL, A.; CHAUHAN, P. M. S.; AGARWAL, S. K.; BHADURI, A. P.; SINGH, S. N.; FÁTIMA, N.; CHATTERJEE, R. K. Potent 1,3-Disubstituted-9H-pyrido[3,4-b]indoles as New Lead Compounds in Antifilarial Chemotherapy, *J. Med. Chem.* Easton, v. 42, p. 1667-1672, 1999b.
- TAKASU, K.; SHIMOGAMA, T.; SAIIN, C.; KIM, H-S.; WATAYA, Y.; IHARA, M.  $\pi$ -Delocalized  $\beta$ -carbolinium cations as potential antimalarials *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Oxford, v. 14, p. 1689-1692, 2004.
- TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C. DA, FERREIRA, I. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; OLIVEIRA, A. J. B DE. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytomedicine* Stuttgart, v. 14, p. 377-380, 2007.
- THOMAZ SOCCOL, V.; CASTRO, E. A., SCHÜHLI, G. S. E.; CARVALHO, Y.; MARQUES, E.; PEREIRA, E. F.; ALCANTARA, F. S.; MACHADO, A. M.; KOWALTHUK, W.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of Paraná State, southern Brazil. *Acta Trop.* Basel, v. 111, p. 308-315, 2009.
- THOMAZ-SOCCOL, V. Les *Leishmania* du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Démarche progressive phénétique-cladistique. Relations phylogénétiques avec les *Leishmania* de l' Ancien Monde. Tese de Doutorado, Université Montpellier, p. 190, 1993.
- THOMAZ-SOCCOL, V., LANOTTE, G., RIOUX, J.A., PRATLONG, F., MARTINI-DUMAS, A., SERRES, E. Phylogenetic taxonomy of NewWorld *Leishmania*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* Paris, v. 68, p. 104-106, 1993.
- TONIN LTD, RIBEIRO MP, NAKAMURA CV, ROCHA KJP, SANTOS AO, UEDA-NAKAMURA T, COSTA WF, SARRAGIOTTO MH. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- $\beta$ -carboline)-3-carboxamides. *Biomed. Pharmacother.* Nova York, v. 64, p. 386-389, 2010.

TONIN, L. T. D. Síntese e avaliação da atividade antiprotozoário, antitumoral e antimicrobiana de 1-fenilsubstituído- $\beta$ -carboline contendo os grupos n-alkil-carboxamida, 1,2,4-triazol e 1,3,4-tiadiazol na posição-3". Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, 2009.

TSE, S. Y. H.; MAK, I-T; DICKENS, B. F. Antioxidative properties of harmine and  $\beta$ -carboline alkaloids. *Biochem. Pharmacol.* Oxford, v. 42, p. 459-464, 1991.

VALDEZ RH, TONIN LTD, UEDA-NAKAMURA T, DIAS FILHO BP, MORGADO-DIAZ JA, SARRAGIOTTO MH, NAKAMURA CV. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* Basel, v. 110, p. 7-14, 2009.

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly host. *J. Eukaryot. Microbiol.* Lawrence, v. 40, p. 196-206, 1993.

YARDLEY, V.; KHAN, A. A.; MARTIN, M. B.; SLIFER, T. R.; ARAUJO, F. G.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; CROFT, S. L.; OLDFIELD, E. In vivo activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother.* Washington, v. 46, p. 929-931, 2002.

ZHAO, M.; BI, L.; WANG, W.; WANG, C.; BAUDY-FLOC'H, M.; JU, J.; PENG, S. Synthesis and cytotoxic activities of  $\beta$ -carboline amino acid. *Bioorg. Med. Chem.* Oxford, v. 14, p. 6998-7010, 2006.