

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Mycobacterium tuberculosis* e
ANTIPROLIFERATIVA: *Piper amalago* L. E DERIVADOS β -CARBOLÍNICOS**

FLORA MARTINEZ FIGUEIRA MOREIRA

**DOURADOS-MS
2015**

FLORA MARTINEZ FIGUEIRA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Mycobacterium tuberculosis* e
ANTIPROLIFERATIVA: *Piper amalago* L. E DERIVADOS β -CARBOLÍNICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Julio Henrique Rosa Croda

Coorientadora: Dra. Anelise Samara Nazari Formagio

**DOURADOS-MS
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M838a	<p>Moreira, Flora Martinez Figueira Avaliação da atividade anti-<i>Mycobacterium tuberculosis</i> e antiproliferativa: <i>Piper amalago</i> L. e derivados β-carbólicos / Flora Martinez Figueira Moreira -- Dourados: UFGD, 2015.</p> <p>61.f. il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Julio Henrique Rosa Croda. Coorientadora: Profa. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) FCS, Faculdade Ciências da Saúde – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Tuberculose. 2. Câncer. 3. Antimicobacteriana. I. Título.</p> <p>CDD – 616.995</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Floraci e Maria José, pelo apoio, dedicação, carinho e amor.

Ao meu marido Renato, pela paciência, companheirismo e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, por me conceder o dom maravilhoso que é viver.

Aos meus pais Floraci e Maria José, os primeiros mestres da minha vida, obrigada por todo amor e carinho que me proporcionam, e por me ensinarem a ser forte em qualquer situação.

Ao meu orientador, professor Dr. Julio Croda. Muito obrigada por dividir comigo seus conhecimentos e suas experiências, pela confiança e oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À minha coorientadora, professora Dr^a. Anelise Samara Nazari Formagio. Agradeço todo seu empenho, sua compreensão e paciência. Que a minha gratidão espelhe meu carinho e admiração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFGD. Muito obrigada pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação profissional.

Às minhas amigas e parceiras Kesia (safada), Lais (soneca), Mari (Tatarinha), Camila (Abusando da make), Débora (Debs), Luciana (shimba), Maisa (Mali), Luana (aaa meu), Rafa, Lujan (porps), Aleke e Flávia, obrigada por deixarem os meus dias mais leve e alegre. Meu salve à turma das Bagaças!

Aos funcionários da Faculdade Ciências da Saúde. Obrigada por todo apoio e incentivo.

À toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde, agradeço pelos momentos de alegria e muito trabalho que compartilhamos. Obrigada pela parceria.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Manejo de Plantas Medicinais, agradeço pela acolhida e por todo conhecimento compartilhado.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp. Muito obrigada pelo auxílio nos ensaios antiproliferativos.

A todos que de alguma forma contribuíram para elaboração desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Sorrir é o melhor remédio.”

(Desconhecido)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Tuberculose	3
2.1.1 Estratégias de combate e situação atual.....	3
2.1.2 O patógeno e a doença.....	4
2.1.3 Tratamento e a multidroga-resistência	5
2.1.4 Produtos naturais com atividade antimicobacteriana.....	6
2.2 Câncer	7
2.2.1 Aspectos gerais.....	7
2.2.2 Medicamento anticâncer.....	7
2.3 Química medicinal e pesquisa de novos fármacos	9
2.3.1 Atividade antimicobacteriana.....	10
2.3.2 Atividade antiproliferativa.....	12
2.4 <i>Piper amalago</i> L. (Piperaceae).....	12
2.5 Derivados β-carbolínicos e guanidínicos	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
5. MANUSCRITO 1	33
6. MANUSCRITO 2	48
7. ANEXO	61

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistentes

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLF – Clofazimina

CM – Canamicinas

CS – Cicloserina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DOTS – Directly Observed Treatment Short-Course

EMB – Etambutol

EMPA – Extrato metanólico da *Piper amalago*

EST – Estreptomicina

ETM – Etionamida

FCPA – Fração Clorofórmica da *Piper amalago*

FDA – Food and Drug Administration

FHPA – Fração hexano da *Piper amalago*

FHidroPA – Fração Hidrometanólica da *Piper amalago*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

INCA – Instituto Nacional de Câncer

INH – Isoniazida

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*

MTT – Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt

NCE – New Chemical Entity

NCI – National Cancer Institute

ND – Não Descrita

NIH – National Institutes of Health

OADC – ácido oleico, albumina, dextrose, catalase

OECD – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OFX – Ofloxacino

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAS – Ácido para-aminossalicílico

PZA – Pirazinamida

REMA – Resazurin Microtiter Assay

RFP – Rifampicina

SAR – Structure-Activity Relationships

SRB – Sulforrodamina B

TB – Tuberculose

TB-MDR – Tuberculose multidroga resistente

TB-XDR – Tuberculose de resistência estendida

TCT – Tiacetazona

TRZ – Terizidona

ÍNDICES DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. Reação de óxido-redução da resazurina em resorufina.....	12
Figura 2. Folhas da <i>Piper amalago</i> L.....	17
Figura 3. Compostos β -carbolínicos.....	17
Figura 4. Derivados β -carbolínicos contendo o grupo guanidínico.....	18
Figura 5. Fluxograma do processo de obtenção dos compostos naturais e sintéticos biologicamente ativos.....	20

TABELAS

Tabela 1. Principais anticancerígenos e mecanismo de ação.....	9
Tabela 2. Espécies de <i>Piper</i> testadas contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14

RESUMO

A tuberculose e o câncer são um importante problema de saúde pública mundial. Ao longo dos anos o cenário dessas doenças não tem se mostrado otimista, devido ao aumento do número de casos de resistência às drogas. Nesse sentido, há uma necessidade urgente do desenvolvimento de novas moléculas originais, ativas e menos tóxicas do que as drogas antituberculose e anticancerígenas usuais. O objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antimicobacteriana frente ao *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) e antiproliferativa do extrato metanólico, frações e compostos isolados das folhas da *Piper amalago* L. e de alguns compostos sintéticos β -carbolínicos contendo a unidade guanidina. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi avaliada pelo método de redução da resazurina em microplacas (REMA). A citotoxicidade *in vitro* (atividade antiproliferativa) foi investigada frente às linhagens de células tumorais humanas utilizando o método colorimétrico com Sulforrodamina B (SRB). Para o estudo de toxicidade aguda utilizou-se modelo *in vivo* em camundongos Swiss fêmeas nas doses de 175, 560, 1792 e 2000 mg/Kg⁻¹, conforme o protocolo 425 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). O extrato metanólico obtido das folhas de *P. amalago* L. (EMPA) apresentou atividade antimicobacteriana moderada, com CIM = 45,5 μ g/mL. A fração clorofórmica (FCPA) resultante do particionamento líquido-líquido teve CIM = 15,3 μ g/mL. O estudo fitoquímico da FCPA resultou no isolamento de duas piperamidas **PA-1** e **PA-2** com CIM de 92,0 μ g/mL e 57,0 μ g/mL, respectivamente. EMPA também apresentou potente atividade antiproliferativa contra células de próstata PC-3 (LC₅₀ = 4,34 μ g/mL; TGI = 64,72 μ g/mL) e ovarianas OVCAR-3 (LC₅₀ = 9,44 μ g/mL). A administração aguda da FCPA não promoveu sinais de toxicidade nos animais tratados. Em relação aos derivados β -carbolínicos contendo o grupo amina (2a-c, 3a-c) ou guanidíneo (4a-c) terminal em C-3, os compostos **2a** (24,9 μ g/mL), **2b** (26,9 μ g/mL) e **4a** (27,8 μ g/mL), foram os mais ativos contra *M. tuberculosis*. Quanto a atividade antiproliferativa, oito compostos inibiram o crescimento celular contra linhagem resistente de ovário NCI-ADR/RES (GI₅₀ \leq 8,36 mM). Com base nos resultados encontrados são necessários mais estudos para explorar o mecanismo de ação e a toxicidade *in vivo* desses compostos em detalhe.

ABSTRACT

Tuberculosis and cancer are a major public health problem worldwide. Over the years the stage of these diseases has not proven optimistic, due to increased number of cases of drug resistance. Accordingly, there is an urgent need for development of new original molecules active and less toxic than usual antituberculosis and anticancer drugs. The aim of this study was to evaluate *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) and antiproliferative of methanolic extract, fractions and compounds isolated from the leaves of *Piper amalago* L. and some β -carboline synthetic compounds containing guanidine unit. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was assessed by the resazurin reduction method in microplates (REMA). The *in vitro* cytotoxicity (proliferative activities) was investigated against human tumor cell lines using the colorimetric method with Sulforhodamine B (SRB). For acute toxicity study was used *in vivo* mouse model Swiss females at doses of 175, 560, 1792 and 2000 mg/Kg, as the protocol 425 the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). The methanolic extract obtained from the leaves of *P. amalago* L. (MEPA) presented moderate antimycobacterial activity with MIC = 45.5 μ g/mL. The chloroform fraction (FCPA) resulting from liquid-liquid partitioning had MIC = 15.3 μ g/mL. The phytochemical study of the FCPA resulted in the isolation of two piperamides **PA-1** and **PA-2** with MIC 92.0 μ g/mL and 57.0 μ g/mL, respectively. MEPA also showed potent antiproliferative activity against PC-3 prostate (LC₅₀ = 4.34 μ g/mL; TGI = 64.72 μ g/mL) and OVCAR-3 ovarian cells (LC₅₀ = 9.44 μ g/mL). The FCPA acute administration did not cause signs of toxicity in the treated animals. Regarding β -carboline derivatives containing amine group (2a-c, 3a-c) or guanidinium (4a-c) terminal to C-3, compounds **2a** (24.9 μ g/mL), **2b** (26.9 μ g/mL) and **4a** (27.8 μ g/mL), were most active against *M. tuberculosis*. Regarding antiproliferative activity, eight compounds inhibited cell growth against resistant strain of ovarian NCI-ADR/RES (GI₅₀ \leq 8.36 mM). Based on these results further studies are needed to explore the mechanism of action and *in vivo* toxicity of these compounds in detail.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que acomete principalmente os pulmões, tem como principal patógeno o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). A doença continua sendo um grave problema de saúde pública mundial, exigindo o desenvolvimento de novas estratégias para o seu controle. O último relatório anual da tuberculose, revelou que em 2013 a incidência de TB esteve em torno de 9 milhões de novos casos, com ocorrência de cerca de 1,5 milhões de mortes. O Brasil está entre os 22 países mais afetados pela TB no mundo, possuindo, atualmente, em torno de 83 mil novos casos e cerca de 4,4 mil mortes por ano [1].

Em geral, a bactéria é transmitida por aerossóis de pessoas que são contaminadas após a inalação do bacilo provenientes de espirros ou tosses. Estima-se que apenas 10% das pessoas infectadas tornam-se doentes, o restante da população pode desenvolver uma forma latente, e ter uma resposta efetiva, impedindo a evolução para doença [2, 3]. Entretanto a forma latente pode sofrer uma reativação frente a uma imunossupressão [4].

Os fármacos para tratamento convencional da TB foram desenvolvidos há mais de 40 anos, requer no mínimo seis meses de utilização combinada de quatro drogas de primeira linha [1]. O tratamento é longo, com efeitos adversos e demanda disciplina ao paciente. Como há uma melhora significativa logo no início do tratamento, é comum o uso incorreto ou até mesmo o abandono da terapêutica, antes do período recomendado, o que estimula o desenvolvimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados [5, 6].

Para o desenvolvimento de novos agentes anti-TB, duas principais abordagens têm sido empregadas [7]. Uma delas é baseada na síntese de análogos de fármacos existentes com o objetivo de reduzir o tempo de tratamento da TB bem como melhorá-lo. A outra envolve a busca de novas estruturas com as quais a micobactéria nunca tenha sido apresentada antes [8].

Outra abordagem é o câncer, uma doença que afeta mais de 100 tipos de células. A característica principal é a profunda alteração nos sistemas de regulação da proliferação e de diferenciação celulares. Muitas dificuldades são encontradas no tratamento, a resistência aos medicamentos, toxicidade celular e baixa especificidade são as mais frequentes. Moléculas vegetais, seus derivados sintéticos e semissintéticos são importantes fontes de drogas antitumorais. Mais de 50% dos medicamentos em ensaios clínicos para atividade anticâncer foram isoladas de fontes naturais ou são relacionadas a eles [9].

Devido a eficácia reduzida dos fármacos atuais, resultantes do surgimento de multirresistência, torna-se necessário a busca de novas drogas antituberculose e

anticancerígenas, que reduzam o tempo e a complexidade do tratamento, e que consigam erradicar as infecções persistentes [6].

Entre os compostos utilizados como base para as novas formulações, a utilização de produtos naturais, fornece metabólitos secundários contra diversos alvos farmacológicos [6, 10]. A utilização desses metabólicos como matéria-prima, modelo ou molécula protótipo para a síntese de análogos mais potentes e seletivos, têm contribuído significativamente para a obtenção de novos agentes terapêuticos [11, 12].

Com o intuito de buscar novas drogas para o tratamento da TB e câncer, através de estudos sobre a utilização de plantas medicinais no desenvolvimento de novos compostos, o nosso grupo de pesquisa realizou a triagem *in vitro* de 28 extratos vegetais obtidos de plantas nativas e exóticas contra o MTB [13] e novos derivados sintéticos de β -carbolinas contra dez linhagens de células tumorais humanas [14-16].

Neste estudo avaliamos a atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* e antiproliferativa *in vitro* do extrato, frações e compostos provenientes de produto vegetal (*Piper amalago*) e de composto obtidos sinteticamente (derivados β -carbolínicos contendo a unidade guanidínica).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tuberculose

2.1.1 Estratégias de combate e situação atual

Conhecida a milhares de anos, a tuberculose é uma doença infecciosa e transmissível causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo aeróbio obrigatório que na sua forma ativa afeta principalmente os pulmões [17].

Entre as décadas de 40 e 70, foram desenvolvidos os medicamentos que são atualmente utilizados no tratamento da tuberculose, como, por exemplo: a estreptomicina (EST) em 1943; a isoniazida (INH) em 1952; pirazinamida (PZA) em 1954; o etambutol (EMB) em 1961; e a rifampicina (RFP) em 1963. Na década de 80, com sucesso desses fármacos, devido ao declínio da incidência de tuberculose, chegou-se a acreditar que essa doença havia sido erradicada [18].

No entanto, a partir da década de 90 houve um aumento expressivo no número de casos de TB, principalmente nos países em desenvolvimento, devido a diversos fatores como: a baixa adesão dos pacientes ao tratamento, o aparecimento de bactérias resistentes aos fármacos utilizados, a pobreza, os aglomerados populacionais, a falta de informação, os movimentos migratórios e o surgimento, na mesma década, da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) [19].

Devido à crescente incidência de casos, em 1993 a Organização Mundial da Saúde (OMS), declarou a tuberculose como uma emergência de saúde pública mundial, ressaltando a necessidade de medidas efetivas para seu controle [1]. Na tentativa de minimizar a transmissão da doença, em 1994 a OMS lançou a estratégia de Tratamento de Curto Prazo Diretamente Observado (*Directly Observed Treatment Short-Course* – DOTS), que envolve cinco elementos: compromisso político; exames bacteriológicos de qualidade; aquisição e distribuição regular de medicamentos; tratamento padronizado; e monitoramento dos casos [19].

Visando à expansão e o aperfeiçoamento da qualidade da estratégia DOTS, no ano de 2006, foi lançada a estratégia Stop-TB, incluindo um novo complemento que permite capacitar e promover a pesquisa por meio do desenvolvimento de novos meios de diagnósticos, medicamentos e vacinas [20]. Essas estratégias possuem metas como diagnosticar pelo menos

70% dos novos casos e curar 85% dos doentes, diminuindo, desse modo, a taxa de abandono e evitando o surgimento de bacilos resistentes, resultando no efetivo controle da tuberculose [21].

Pela primeira vez em décadas, o Stop -TB Partnership informou que cinco novas classes de compostos sintéticos orgânicos estão em fase clínica, sendo elas: PNU-100480 (sutezolida) – possui como alvo a biossíntese de proteínas; SQ-109 – biossíntese da parede celular; PA-824 (Nitroimidazopyran) – biossíntese de lipídios e proteínas; OPC-67683 (delamanida) – biossíntese de lipídios e proteínas e AZD-5847 – estrutura não revelada [22, 23]

Em 28 de dezembro de 2012 foi aprovado pela *U.S Food and Drug Administration* (FDA) a utilização do medicamento Sirturo (bedaquilina) como parte da terapia de combinação para o tratamento de adultos com TB-MDR. O composto desenvolvido pelo laboratório americano Johnson and Johnson em parceria com a TB Alliance, atua na inibição da enzima ATP sintase micobacteriana, impedindo sua multiplicação [24].

Entretanto, a carência em estruturas químicas inéditas permanece e apesar da possibilidade da entrada de novos medicamentos, o desenvolvimento de novos fármacos contra TB ainda é insuficiente para resolver as necessidades não atendidas do tratamento [6].

2.1.2 O patógeno e a doença

O MTB, também conhecido como bacilo de Koch e o principal agente causador da TB, é uma bactéria de crescimento lento com o tempo de duplicação entre 18-48 horas, sua parede celular é espessa, contém ácidos micólicos, uma longa cadeia cruzada de ácidos graxos e outros lipídeos, o que confere a este micro-organismo resistência a agentes bactericidas e uma característica álcool-ácido resistentes (BAAR) [25].

A TB se caracteriza principalmente por uma inflamação crônica intensa, necrose caseosa do tecido pulmonar, podendo afetar outros órgãos do corpo. Entre as formas extrapulmonares as mais comuns são as pleurais e ganglionares periféricas, seguidas pelas genitourinárias, ósseas e oculares [26].

Sua transmissão ocorre quando as cavidades, que se formam nos pulmões, se rompem nos brônquios, permitindo a liberação dos bacilos por aerossóis produzidos durante a expectoração, havendo, dessa maneira, a possibilidade de contaminação de outros indivíduos [27].

A resposta imunitária (hipersensibilidade retardada e imunidade celular) desenvolve-se cerca de 4–6 semanas após a infecção primária. Na maioria dos casos, a resposta imunológica consegue conter a multiplicação dos bacilos do MTB [28]. No entanto, alguns bacilos adquirem

estado de latência, embora não sejam infecciosos nesta fase, podem sofrer uma reativação frente a uma imunossupressão [4].

A fase de latência é definida quando nos pulmões a bactéria é fagocitada por macrófagos alveolares induzindo uma resposta pró-inflamatória iniciando o processo de recrutamento de células mononucleares de vasos sanguíneos vizinhos. Os bacilos rodeados por células T, monócitos e macrófagos não podem se reproduzir e adquirem o estado de latência. Nesta fase os bacilos não são infecciosos, podendo permanecer neste estado por muitos anos ou ocorrer o processo de reativação - forma mais comum de manifestação da tuberculose em adultos. Esta é frequentemente associada a condições de comprometimento do sistema imunológico, tais como: co-infecção com HIV, deficiência nutricional, idade avançada e estresse [28, 29].

2.1.3 Tratamento e a multidroga-resistência

O atual regime de tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde inclui drogas de primeira linha e se baseia em dois esquemas [21]: Esquema I é indicado para novos casos de TB (seja na forma pulmonar ou na extrapulmonar, infectados ou não por HIV) e para recidiva ou retornos após o abandono. Sua duração é de seis meses, se utilizando da INH, RFP, PZA e EMB nos dois primeiros meses (fase intensiva), e da INH e RFP nos quatro meses seguintes (fase de manutenção); Esquema II é indicado para a forma meningoencefálica e utiliza as mesmas drogas descritas no Esquema I, sua duração é de nove meses, dois na fase intensiva e sete na fase de manutenção.

Combinações múltiplas de fármacos são necessárias para o sinergismo terapêutico e para a prevenção do surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos. Entretanto, a falta de adesão ao tratamento é a principal causa da falha terapêutica e do surgimento de cepas resistentes [30].

O tratamento irregular da TB eleva as taxas de resistência tanto primária (pacientes nunca tratados, contaminados por bacilos previamente resistentes), quanto adquirida (pacientes com tuberculose inicialmente sensível, que se tornam resistentes após a exposição aos medicamentos) [5, 31].

A TB-MDR é forma da doença causada por cepas resistentes a INH e RFP [21]. A resistência aos medicamentos antituberculose de primeira linha tem aumentado, sendo que em 2013 foram estimados cerca de 480 mil casos de TB-MDR no mundo [1].

Em casos mais graves ocorrem o desenvolvimento da TB-XDR, cepas resistentes a drogas de primeira (INH e RFP) e segunda linha (como as fluoroquinolonas e a um dos

seguintes injetáveis: canamicina, amicacina ou capreomicina) [21]. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 9% das pessoas com TB-MDR tiveram TB-XDR, essa última forma de doença foi relatada em mais de 100 países [1].

Os regimes de tratamento para TB-MDR e TB-XDR são mais longos (18 a 24 meses), menos eficazes, menos toleráveis, e mais caros do que a quimioterapia de curta duração padronizada [32, 33]. Consiste da combinação de fármacos de primeira e segunda linha como estreptomicina (EST), ofloxacino (OFX), terizidona (TRZ), etionamida (ETM), cicloserina (CS), ácido para-aminossalicílico (PAS), tiacetazona (TCT), clofazimina (CLF) e alguns tipos de canamicinas (CM) [33, 34].

Em 2013, no Brasil, foram notificados 525 novos casos de multirresistência e 21 de resistência extensiva. O aumento das taxas de incidência de TB-MDR e TB-XDR tem impulsionado a busca de novas alternativas farmacológicas efetivas que possam reduzir o período de tratamento, bem como minimizar as reações adversas causadas pela terapia [35].

2.1.4 Produtos naturais com atividade antimicobacteriana

Produtos naturais de origem vegetal são considerados uma fonte inesgotável de protótipos para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos contra diversos alvos farmacológicos [12].

A maioria dos medicamentos sintéticos que estão disponibilizados no mercado possuem origem de produtos naturais. Estima-se que 50% dos medicamentos utilizados para o tratamento de infecções sejam oriundos de produtos naturais ou semissintéticos modificados para uma melhor eficácia [9].

Nas últimas décadas, diversas pesquisas foram realizadas com o intuito de analisar as propriedades antimicobacteriana de plantas medicinais, tendo-se obtido resultados satisfatórios quanto ao isolamento e comprovação de constituintes ativos contra *Mycobacterium tuberculosis* [36]. Entre as quais podemos citar a *Clavija procera* B. Stahl, que demonstrou ser ativo, mesmo contra cepas resistentes [37]; *Valeriana laxiflora* DC. [38]; *Thalia multiflora* Horkel ex Koernicke [39]; *Maerua edulis* (Gilg & GilgBen.) DeWolf; *Securidaca longepedunculata* Fresen.; *Tabernaemontana elegans* Stapf; *Zanthoxylum capense* (Thunb.) Harv. [40]; *Aristolochia taliscana* Hook [41]; *Acorus calamus* L. var. *americanus* [42] e *Aralia nudicaulis* L. [43]

No entanto, alguns desses constituintes se mostram inativos, muito tóxicos ou ainda com bioatividades indesejadas. Em alguns casos é possível, através de transformações químicas,

potencializar a atividade farmacológica esperada e/ou reduzir outras que estão relacionadas à toxicidade do composto [44, 45].

2.2 Câncer

2.2.1 Aspectos gerais

Também denominado neoplasia ou tumor maligno, o câncer é um conjunto de doenças que tem em comum a proliferação descontrolada de células alteradas, podendo invadir tecidos adjacentes e se disseminar para outros órgãos [46].

A origem da célula cancerosa (processo carcinogênico) ocorre devido a interações entre fatores exógenos (ambientais) e endógenos (genéticos). As condições do meio ambiente, os hábitos e costumes, a predisposição genética, além da exposição a produtos químicos, radiação e infecções provocadas por certos tipos de vírus, bactérias ou parasitas favorecem mutações no genoma das células. O acúmulo dessas anormalidades genéticas é o principal responsável pelo desenvolvimento e progressão neoplásica [46].

O envelhecimento é outro fator fundamental no desenvolvimento do câncer devido ao acúmulo de mutações e outros danos oxidativos nas células [46]. Combinado com os declínios da atividade antioxidante e do sistema imune, compromete o combate às células mutadas [47].

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2012 foram aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes. As causas mais comuns de morte são os cânceres de pulmão (19,4%), fígado (9,1%), estômago (8,8%), cólon (8,5%) e mama (6,4%). A projeção desses dados não se revela promissora, pois o número de casos deverá aumentar em cerca de 70% ao longo das próximas duas décadas. O uso do tabaco é o fator de risco mais importante para o câncer, causando cerca de 20% das mortes globais por essa causa [46].

Além disso, fatores econômicos e sociais também colaboram para o crescimento de casos no mundo. Mais de 60% do total de novos casos anuais ocorrem na África, Ásia e América Latina. Estas regiões são responsáveis por 70% das mortes por câncer do mundo [46]. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, em 2013, cerca de 162 mil pessoas morreram por neoplasias malignas, sendo esta responsável por 13,3% do total de óbitos registrados [48].

2.2.2 Medicamentos anticâncer

São conhecidos mais de cem tipos de cânceres, diferenciados pela etiologia, processo de evolução e formas de tratamento (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) [48].

Nos últimos sessenta anos, a pesquisa de novas drogas anticâncer avaliou mais de 600 substâncias, através da triagem por modelos experimentais de leucemias murinas e em animais imunodeficientes implantados com células tumorais humanas. Essa análise introduziu na terapêutica cerca de 70 medicamentos que resultaram na maioria das drogas que são utilizadas na quimioterapia anticâncer [49]. Desses quimioterápicos 50% são provenientes, direta ou indiretamente, de fontes naturais como plantas, microrganismos e organismos marinhos [50, 51].

É o caso dos alcaloides da vinca: vimblastina e vincristina isolados da *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). Estes dois compostos são atualmente comercializados e utilizados no tratamento de linfoma de Hodgkin e da leucemia linfoblástica aguda infantil [52]. O etoposide (VePesid®) é um outro exemplo. Esse composto sintético surgiu baseado no produto natural podofilotoxina, extraído da *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae), e tem sido usado para o tratamento de tumores de testículo e pulmão, mostrando-se menos tóxico e mais potente que o composto natural [53]. Os taxanos, paclitaxel e docetaxel, isolados de *Taxus brevifolia*, apresentam atividades sobre tumores de mama e ovário [54]. A descoberta desses antitumorais, mostra o potencial dos produtos naturais em compor e aumentar as opções terapêuticas de tratamento e cura.

Os quimioterápicos anticancerígenos atuam promovendo a supressão do crescimento celular, atuando diretamente no DNA das células ou indiretamente por inibição de funções metabólicas do DNA e são divididos em dois grupos. O primeiro é constituído por aqueles que inibem a iniciação do processo carcinogênico (metrotexato e a vimblastina) e o segundo, pelos que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer (antibióticos antitumorais, como a dexorubicina) [55]. Um resumo dos principais fármacos anticancerígenos e seus mecanismos de ação no ciclo celular estão descritos na **Tabela 1**[48].

Um dos grandes problemas da quimioterapia é a baixa seletividade, que gera o aparecimento de efeitos colaterais tóxicos (náuseas, febre, alopecia, feridas da boca e diarreia) e resistência medicamentosa e/ou multidroga resistência, pois, além de desenvolverem resistência a uma droga, as células podem desenvolver resistência cruzada a outras drogas. A forma de resistência pode ser primária (quando administrada pela primeira vez) ou adquirida (durante a quimioterapia) [56]. Embora a quimioterapia não seja curativa para muitos tipos de

câncer, esta mostra sua relevância no que tange a sobrevida do paciente, bem como no processo de regressão do quadro oncológico [57].

Tabela 1: Principais anticancerígenos e mecanismos de ação.

Anticancerígenos	Mecanismo de ação
PENTOSTATINA	Inibe a síntese de aminase
PEMETREXED	Inibe a síntese de bases nitrogenadas
METROTEXATO	Inibe a redução de folatos, bloqueia timidina monofosfato (TMP) e a síntese de bases púricas
GENTICABINA, CITARABINA, FLUDARABINA, CLADRIBINA, CLOFARABINE	Inibem a síntese de DNA
EPIPODOFILOTOXINAS, CAMPOTENCINAS, ANTIBIÓTICOS DEXORRUBICINA	Inibem a função das topoisomerases
L-ASPARAGINASE	Inibe a síntese proteica
N-FOSFOACETIL-L-ASPARTATO	Inibe a biossíntese da pirimidina
6-MERCAPTUPURINA, 6-TIOGUANINA	Inibem a síntese de bases púricas e as interconversões entre nucleotídeos
HIDROXIURÉIA	Inibe a ribonucleotídeo redutase
5-FLUORURACILA	Inibe a síntese de TMP
AZACITIDINE	Demetila resíduos de DNA
MOSTARDAS, NITROSURÉIAS, ANÁLOGOS DE PLATINA, MITOMICINA, CISPLATINA, PROCARBAZINA, DACARBAZINA	Formam ligações covalentes ao DNA, impedindo sua função
TAXANOS, COLCHICINA, ALCALOIDES DA VINCA	Inibe a função dos microtúbulos

Fonte: INCA, 2015.

2.3 Química medicinal e a pesquisa de novos fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos envolve diversas etapas que requerem grandes investimentos de longo prazo. Inclui três etapas importantes: 1) etapa de descobrimento – consiste na identificação e produção de novas substâncias ativas, originadas da síntese orgânica, de produtos naturais ou de processos biotecnológicos; 2) etapa de otimização – baseia-se nas modificações sintéticas das estruturas, no sentido de aumentar a potência, seletividade e conferir menor toxicidade; 3) etapa de desenvolvimento – consiste na

otimização das rotas sintéticas para a produção em larga escala e a modificação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da substância ativa para uso clínico [58, 59].

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC), a química medicinal tem papel central na identificação, planejamento, desenvolvimento, descoberta e interpretação do modo de ação molecular de compostos biologicamente ativos (*New Chemical Entity* - NCE). Também assume grande importância na avaliação de propriedades farmacocinéticas e relativas à toxicidade (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), além de estudos das relações entre a estrutura e atividade (*Structure-Activity Relationships* – SAR) [59].

A descoberta de novos agentes anti-TB e anticâncer representa um desafio, pois, o que se espera de um novo composto é que ele reduza o tempo de tratamento, seja efetivo contra as formas de resistência, além de apresentar menos toxicidade ao organismo, e no caso da TB, que atue sobre as micobactérias que permanecem no organismo no estado de latência [6, 22, 57].

Outro fato importante a se considerar em relação a TB é da capacidade que o MTB tem de persistir intracelularmente em macrófagos do hospedeiro por longos períodos. Uma terapia eficiente, portanto, depende da capacidade do novo fármaco erradicar a micobactéria dentro dos macrófagos [6].

A investigação da atividade biológica de moléculas ou de uma classe de substâncias pode ser realizada de duas maneiras: a partir da triagem baseada em alvo ou por seleção fenotípica [60].

A triagem baseada em alvo compreende a aplicação de conhecimentos moleculares para se investigar hipóteses específicas, possibilitando a triagem de moléculas pequenas através de programas computacionais. A desvantagem é que nem sempre os fatores relevantes nesta análise computacional correspondem aos relevantes para o patógeno como um todo [60].

Em contrapartida, a seleção fenotípica não exige um conhecimento prévio. Um grande número de substâncias em estudo pode ter sua atividade avaliada. Dessa forma, os ensaios podem ser traduzidos de forma mais eficaz. Uma desvantagem dessa abordagem é o desafio de otimizar as propriedades moleculares do candidato a fármaco, devido à ausência de prévio conhecimento quanto ao seu mecanismo de ação [60].

Frente às duas possíveis abordagens, a triagem fenotípica tem se revelado mais eficaz na busca de novas moléculas e consequente aprovação de novos fármacos [22, 60].

2.3.1 Atividade antimicobacteriana

De acordo com o programa de seleção de novas drogas contra a TB, desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (*National Institutes of Health* – NIH), devem ser utilizados modelos *in vitro* e *in vivo* para encontrar compostos promissores a novos agentes anti-TB [61].

A atividade antimicobacteriana é determinada inicialmente em teste *in vitro*, através da aplicação do composto a ser avaliado sobre um meio de cultura que contém MTB. Nesta avaliação é medida a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto, onde é determinada a concentração mínima capaz de inibir o crescimento micobacteriano em 50% e 90% [62].

A CIM pode ser expressa em microgramas do composto por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) ou em micromolar (μM), essa última é preferível porque pode ser usada na comparação da potência entre moléculas. Desta forma, quanto menor for o valor da CIM em μM , menor será o número de moléculas necessárias para promover a inibição do crescimento de MTB e, conseqüentemente, maior será a potência deste composto [62].

As metodologias mais modernas são baseadas na aplicação de corantes de oxiredução, como Alamar Blue, *Resazurin Reduction Microtiter Assay* (REMA), sal de tetrazólio (*Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt* - MTT) entre outros, os quais são em geral, mais rápidos, eficientes e baratos, possibilitando a triagem de um grande número de amostras. O Alamar Blue é um corante de oxi-redução, indicador geral de crescimento e viabilidade celular, passando de azul não fluorescente para rosa fluorescente após a redução [63]. Assim o crescimento celular pode ser mensurado através de um espectrofotômetro [64].

O ensaio colorimétrico da resazurina permite um teste de susceptibilidade rápido para micobactérias em condição aeróbia. Nesse teste, a forma oxidada do corante é azul e não fluorescente, e é reduzida através da ação das células viáveis a forma de resorufina, que é rosa e fluorescente [65, 66]. A reação de redução da resazurina ocorre de acordo com a **Figura 1**.

Ensaio *in vivo* têm a função de confirmar a investigação em modelos animais, determinando-se primeiramente a dose simples de tolerância máxima da amostra em ratos ou camundongos [67]. Verifica-se ainda a capacidade do candidato à droga antituberculose de reduzir a carga bacilar nos pulmões de animais infectados [61].

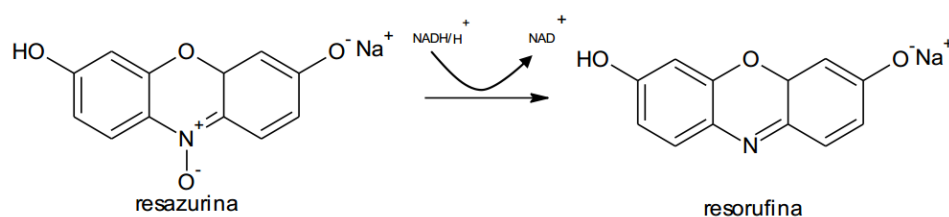


Figura 1. Reação de oxido-redução da resazurina para resorufina frente ao metabolismo celular.

2.3.2 Atividade antiproliferativa

Com objetivo de descobrir novas moléculas com ação anticancerígenas, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute* – NCI) desenvolveu um painel com 60 linhagens de células tumorais humanas oriundas de nove tipos diferentes de câncer (mama, ovário, próstata, cólon, pulmão, rins, cérebro, leucemia e melanoma). Isso possibilitou o desenvolvimento de metodologias para triagem *in vitro*, e dessa forma é possível avaliar de maneira mais profunda a ação de compostos sintéticos ou amostras de produtos naturais, que mostram inibição do crescimento seletivo ou morte celular de determinadas linhagens de células tumorais aderentes a microplacas [56].

Os métodos colorimétricos que quantificam a proliferação celular em cultura são considerados rápidos e baratos, pois, possibilitam um vasto número de extratos de produtos naturais, permitindo facilmente guiar o isolamento e purificação de seus produtos ativos. A taxa de crescimento e multiplicação é medida por algum indicador de crescimento, por meio da formação do aparecimento de coloração, e a intensidade de cor é diretamente proporcional ao número de células presentes [68].

Dentre os métodos colorimétricos podemos citar: Cristal violeta, sais de tretazólio (MTT e XTT), alamar blue e sulforrodamina B (SRB). Esse último, é o método recomendado pelo NCI, pois se trata de um método simples, sensível e rápido para avaliação da atividade antiproliferativa [69].

O princípio do ensaio da SRB baseia-se na habilidade do corante aminoxantina (cor rosa brilhante) de se ligar a componentes proteicos das células, fixadas pelo ácido tricloroacético, ou seja, o método independe da atividade metabólica das células. Após a lise das células é possível quantificar o corante liberado, mediante leitura da absorbância de acordo com a intensidade da cor [68].

2.4 *Piper amalago* L. (Piperaceae)

O gênero *Piper*, pertencente à família Piperaceae, contém cerca de 2000 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, são caracterizadas por pequenas

árvores ou arbustos, medindo aproximadamente 1,3 a 4,0 metros de altura, com folhas de base assimétrica [70, 71]. Estudo fitoquímico revelou que esse gênero possui uma fonte promissora de metabólitos secundários, como amidas, alcaloides, pironas, ligninas, neoligninas, terpenos, chalconas, flavonas e flavononas [72].

Investigações etnofarmacológicas evidenciaram atividade biológica para espécies de *Piper* no tratamento de diversas patologias, com propriedades antibacteriana [73], antiviral [74], antifúngica [75, 76], antioxidante [77], antiparasitária [78, 79], diurética [80, 81], antitumoral [71, 82, 83] e anti-*Mycobacterium tuberculosis*, os quais estão descritos na **Tabela 2**.

Piper amalago L. ou popularmente conhecida como “jaborandi-manso” e “pimenta-da-jamaica”, distinta pelas folhas brilhosas e nervuras paralelas (**Figura 2**), tem sido utilizada na medicina popular para aliviar dores no peito e estômago, agindo como um anti-inflamatório natural e vermífugo [72].

Estudos fitoquímicos das folhas, frutos e raízes identificaram a presença de sesquiterpenos [84, 85]; pirrolidina, isobutilamidas e piperidida [86, 87]; nerolidol [88] chalconas e flavonol [80]. Amida pirrolidina foi isolada do extrato clorofórmico das folhas e mostrou atividade contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonenses*, com valores de IC₅₀ de 15 µM e 14,5 µM, respectivamente [89]. Estudo neurocomportamental em ratos, revelou que o extrato metanólico das folhas age no sistema nervoso, sendo capaz de causar um efeito ansiogênico, sem induzir toxicidade genética [90]. Em outro estudo, também utilizando ratos como modelo experimental, a administração oral do extrato etanólico das folhas exibiu atividade diurética e natriurético, além de inibir a cristalização do oxalato de cálcio [80].

Tabela 2: Espécies de *Piper* testadas contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Espécie	CIM (µg/mL)	Composto isolados	CIM (µg/mL)	Referência
<i>Piper amalago</i> var. <i>nigrinodum</i>	ND	➤ 7-(3',4'-metilenodioxifenil)-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -ácido heptadienoico pirrolidida	a	[91]
	ND	➤ 2'-metóxi-4'5'-metilenodioxido- <i>trans</i> -cinamoilisobutilamida	a	
	ND	➤ 2'-metoxi-4'5'-metilenodioxido- <i>trans</i> -cianamoilpirrolidida	a	
	ND	➤ Tricostaxina	a	
	ND	➤ Piperacida	a	
	ND	➤ Guinesina	a	
<i>Piper chaba</i> Hunter	ND	➤ Chabamida	12,5	[92]
<i>Piper</i> aff. <i>Pedicellatum</i> C. DC.	ND	➤ (+)-bornilo piperate	25,0	[93]
<i>Piper sanctum</i> Miq.	100	➤ 2-oxo-16-(3',4'- metilenodioxifenil) hexadecano	6,25	[94]
		➤ 2-oxo-18-(3',4'- metilenodioxifenil) octadecano	6,25	
		➤ 2-oxo-18-(3',4'- metilenodioxifenil)- <i>trans</i> -17-octadecano	32,0	
		➤ Dimetoxiangonina	32,0	
		➤ 5,6-dihidro-7,8-dihidrometisticina	4,0	
		➤ Cefaranona B	12,0	
		➤ Piperolactama A	8,0	
		➤ Cefaradiona B	32,0	
		➤ N- <i>trans</i> -feruloiltiramina	128	
		➤ N- <i>trans</i> -(p-coumaroil) tiramina	32,0	
<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	12,5	➤ Pelitorina	25,0	[95-97]
		➤ Guinensina	50,0	
		➤ Sarmentina	100	
		➤ Brachiamida B	50,0	
		➤ 1-piperetil pirrolidina	50,0	
		➤ 3',4',5'-trimetoxicinnamoil pirrolidina	>200	
		➤ Sarmentosina	200	
		➤ 1-(3,4-metilenodioxifenil)-1- <i>E</i> -tetradecano	25,0	
		➤ Metil piperata	>200	
		➤ Alceno aromático	25,0	
		➤ N-[9-(3,4-metilenodioxifenil)-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>E</i> -nonatrieno]-pirrolidina	25,0	
		➤ N-pirrolidil-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -decadienamida (sarmentina)	50,0	

			➤ N-[9-(3,4-metilenodioxifenil)-2E,8E-nonadieno]pirrolidina (braquiamida B)	50,0	
			➤ N-[7-(3,4-metilenodioxifenil)-2E,6E-heptadienol]pirrolidina (sarmentosina)	50,0	
			➤ N-isobutil-2E,4E-decadienamida (pellitorina)	50,0	
			➤ N-isobutil-15-(3,4-metilenodioxifenil)- 2E,4E,14E-pentadecatrienamida (braquitil-amida B)	50,0	
<i>Piper betle L.</i>	>1600	ND		ND	[98]
<i>Piper nigrum L.</i>	1600	ND		ND	[98]
<i>Piper capense L.F.</i>	512	ND		ND	[99]
<i>Piper guineense</i> Shum et Thom	256	ND		ND	[99]
<i>Piper imperiale</i>	75,0	ND		ND	[100]
<i>Piper regnellii</i> var. <i>pallescens</i>	15,6		➤ Eupomatenoide-5 (E)-2-metoxi-4-(3-metil-5-(prop-1-en-1-il) benzofurano-2-il) fenol	39,0	[101]
			➤ (E)-2-(3,4-dimetoxipenil)-3-metil-5-(prop- 1-en-1-il) benzofurano	35,3	
			➤ 2-metoxi-4-(3-metil-5-propilbenzofurano-2-il) fenol	39,5	
			➤ Conocarpano 4-((2R,3R)-3-metil-5-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3 dihidrobenzofurano-2-il) fenol	97,6	
			➤ (2R,3R)-2-(4-metoxifenil)-3-metil-5-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidrobenzofurano	45,3	
			➤ 4-((2R,3R)-3-metil-5-propil-2,3-dihidrobenzofurano-2-il) fenol	27,3	
			➤ Eupomatenoide-3 (E)-5-(3-metil-5-(prop-1-en-1-il) benzofurano-2-il) benzo[d][1,3] dioxol	ND	
			➤ 5-(3-metil-5-propilbenzofurano-2-il)benzo[1,3] dioxol	ND	
<i>Piper taiwanense</i> Lin & Lu	20,6		➤ 2,3-diacetoxi-1-metoxi-5-alilbenzeno	55,0	[102, 103]
			➤ Acetato Hidroalcoólico	30,3	
			➤ 4-Alilcatequol	27,6	
			➤ <i>trans</i> -Cafeicaldehido	25,5	
			➤ Piperolactama B	80,0	
			➤ Piperolactama A	130	
			➤ Hemiariensina	85,0	

➤ Ácido siríngico	130
➤ Mistura de taivanensol de A e B	30,0
➤ Mistura de taivanensol C e 2-hidróxi-5-(prop-2-enil)fenil acetato	48,0
➤ 3-Metoxi-5-(prop-2-enyl)benzene-1,2-diyl diacetato	55,0
➤ 4-(Prop-2-enil) l-catequol	27,6

CIM - Concentração Inibitória Mínima

ND - Não Descrito

^a – Composto inativo na concentração de 12,5 µg/mL.



Figura 2. Folhas da *Piper amalago* L. (Fonte: Moreira, 2015)

2.5 Derivados β -carbolínicos e guanidínicos

Alcaloides β -carbolínicos naturais e sintéticos têm sido alvo de vários estudos químicos e biológicos, pois se destacam por apresentarem uma gama de propriedades farmacológicas, tais como antitripanosomal [104-107], antileishmanial [108, 109], antimalarial [110], antiviral [15], antimicrobiano [111, 112] e antituberculose [113, 114] e antitumoral [14, 115-121]. Como por exemplo, compostos que intercalam com DNA têm sido sintetizados e testados quanto à sua atividade antitumoral, dentre eles, compostos β -carbolínicos (**Figura 3**) contendo um sistema policíclico planar como harmina (**1**), harmano (**2**) e norharmano (**3**), que apresentaram alta citotoxicidade frente várias linhagens de células tumorais humanas. Estudos do mecanismo de ação indicaram que as β -carbolinas podem intercalar entre a hélice do DNA e inibir a topoisomerase I e II causando danos ao DNA. Os estudos mostraram uma correlação direta entre a habilidade de intercalação do DNA e a citotoxicidade [118].

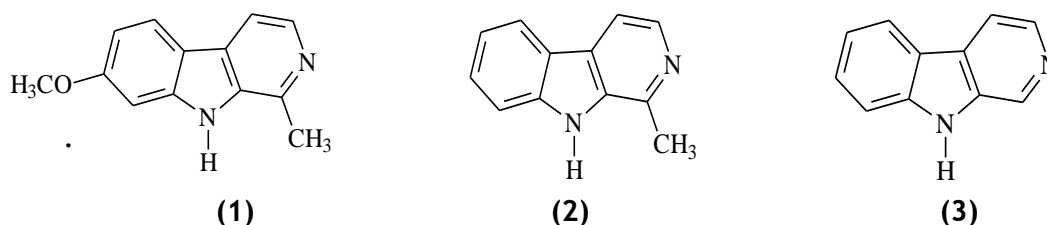


Figura 3: Compostos β -carbolínicos.

Dentre os alcaloides, o grupo funcional guanidina (**Figura 4**) vem apresentando importante função no comportamento de diversas substâncias farmacologicamente ativas, pois apresentam um amplo espectro de atividades biológicas [122]. Aos derivados guanidínicos têm

sido atribuídas às propriedades como: bloqueadores neuronais de canais de cálcio e sódio; inibidores da liberação de glutamato no Sistema Nervoso Central (SNC); efeitos anticonvulsivantes; anti-isquêmicos; cardiotônicos, agonistas e antagonistas de receptores de histamina (H2 e H3); anti-inflamatórios; hipoglicemiantes; anti-hipertensivos; antibacteriano; antivirais (inibidores de protease HIV-1); e também antineoplásicos [123-126].

A importância da função guanidínica na otimização de protótipos de interesse farmacológico está relacionada a três características físico-químicas conferidas pela incorporação dessa função orgânica em estruturas moleculares: alta basicidade, polaridade e hidrossolubilidade. Além disso, o número de substituintes (guanidinas mono, di, tri, tetra e pentassubstituídas), bem como o tipo de substituinte (alquílico ou arílico) conduzem aos variáveis estados de oxidação e conseqüente versatilidade para interações fármaco-bioreceptor, principalmente as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas [127].

A arginina, um aminoácido que contém o grupo guanidínico, é responsável pela especificidade da ligação e conseqüentemente pela troca conformacional do complexo TAR RNA (TAR RNA - região responsável pela *trans* ativação do RNA). A interação entre Tat (proteína) com TAR RNA é essencial para replicação do vírus HIV, e impedindo-se a formação deste complexo a multiplicação do vírus HIV poderia ser inibida. Isto foi demonstrado a partir da síntese e avaliação da atividade biológica de derivados β -carbolínicos contendo o grupo guanidínico na posição-3 (**4a-f**) (**Figura 4**) os quais apresentaram potente atividade anti-HIV, agindo como inibidores de interação do complexo Tat-TAR [128, 129].

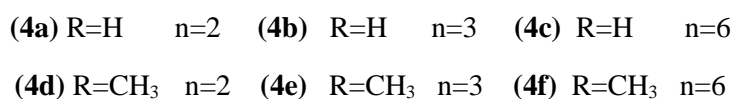
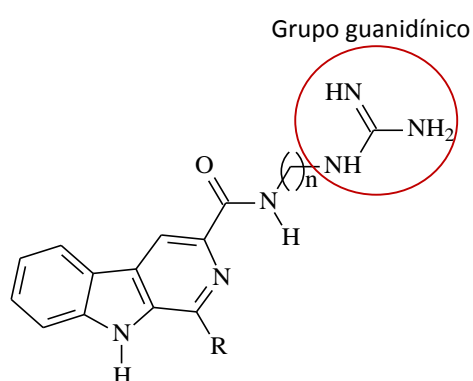


Figura 4: Derivados β -carbolínicos contendo o grupo guanidínico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* e antiproliferativa do extrato metanólico (MEPA), das frações (hexano, clorofórmica e hidroalcoólica) e compostos isolados das folhas da *Piper amalago* L. e também de alguns derivados sintéticos β -carbolínicos. A **Figura 5** descreve as estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir da espécie *P. amalago* e de compostos obtidos sinteticamente.

3.2 Objetivos Específicos

Manuscrito 1

- Preparar, fracionar, isolar e caracterizar os principais constituintes presentes nas folhas da *P. amalago*.
- Avaliar a atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC27294) *in vitro* do extrato metanólico (EMPA), frações e compostos isolados da *P. amalago*.
- Avaliar a ação antiproliferativa *in vitro* do EMPA, contra linhagens de células tumorais;
- Avaliar *in vivo* a toxicidade provocada pela exposição aguda da fração clorofórmica (FCPA) através da análise de sinais clínicos de toxicidade.
- Determinar, através de estudo *in silico*, as propriedades físico-químicas do composto ativo.

Manuscrito 2

- Sintetizar novos derivados β -carbolínicos contendo a unidade guanidínica.
- Avaliar as atividades anti-*Mycobacterium tuberculosis* e antiproliferativa desses novos derivados.

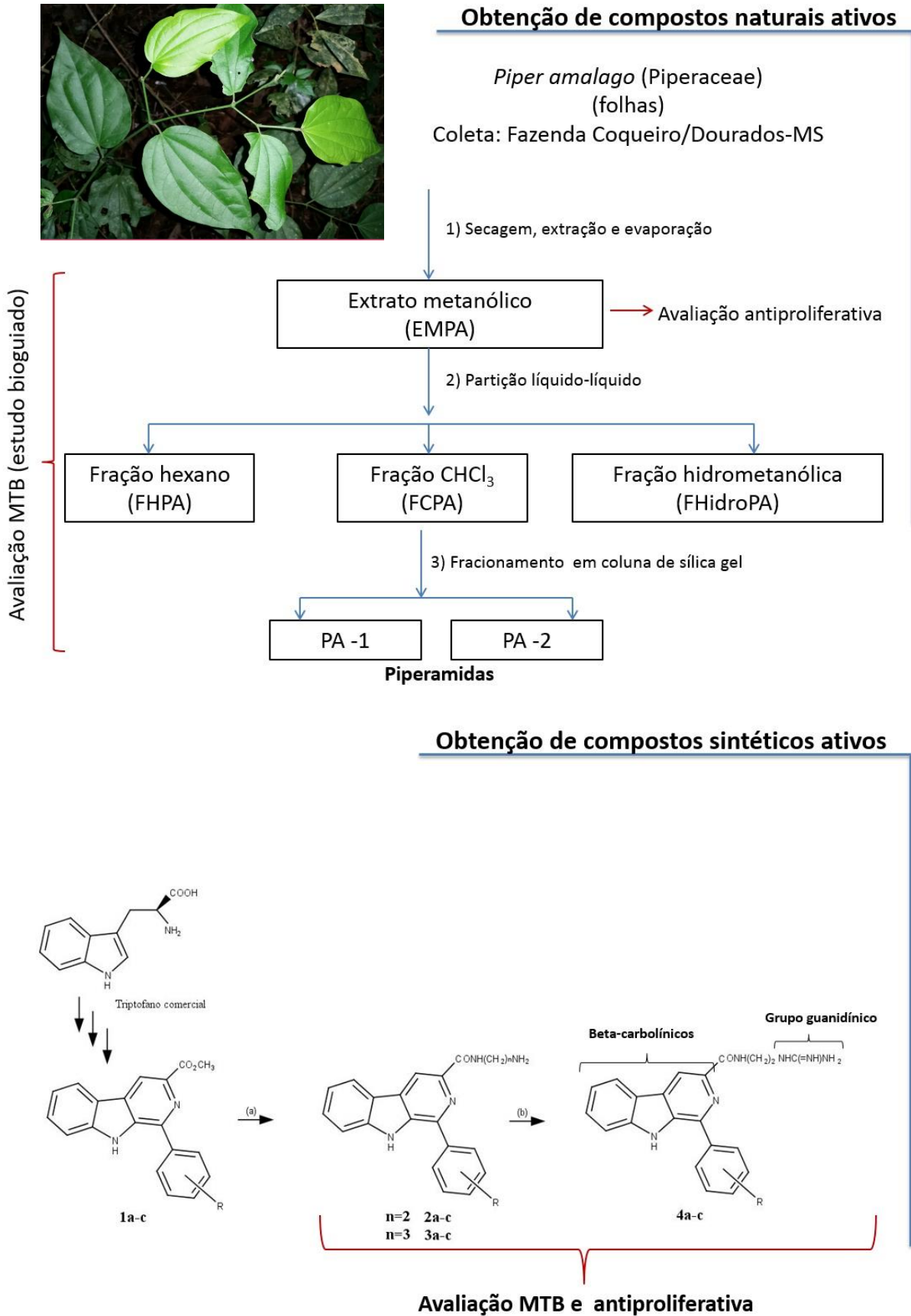


Figura 5: Fluxograma do processo de obtenção dos compostos naturais e sintéticos biologicamente ativos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO, Global Tuberculosis Report. In *World Health Organization* Geneva, **2014**; pp 1-155.
2. Ward, S. K.; Hoye, E. A.; Talaat, A. M., The global responses of *Mycobacterium tuberculosis* to physiological levels of Copper. *J Bacteriol* **2008**, 190, (8), 2939-46.
3. Manabe, Y. C.; Bishai, W. R., Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience, and winning by waiting. *Nat Med* **2000**, 6, (12), 1327-9.
4. Teixeira, H. C.; Abramo, C.; Munk, M. E., Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* **2007**, 33, 323-334.
5. De Rossi, E.; Ainsa, J. A.; Riccardi, G., Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* **2006**, 30, (1), 36-52.
6. Ma, Z.; Lienhardt, C.; McIlleron, H.; Nunn, A. J.; Wang, X., Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet* **2010**, 375, (9731), 2100-9.
7. Sriram, D.; Yogeeswari, P.; Devakaram, R. V., Synthesis, in vitro and in vivo antimycobacterial activities of diclofenac acid hydrazones and amides. *Bioorg Med Chem* **2006**, 14, (9), 3113-8.
8. Tarallo, M. B.; Urquiola, C.; Monge, A.; Costa, B. P.; Ribeiro, R. R.; Costa-Filho, A. J.; Mercader, R. C.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q.; Torre, M. H.; Gambino, D., Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis. *J Inorg Biochem* **2010**, 104, (11), 1164-70.
9. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **2012**, 75, (3), 311-35.
10. Mahajan, A.; Hans, R.; Chibale, K.; Kumar, V., Synthesis and medicinal chemistry of selected antitubercular natural products and natural product derivatives. *RSC Advances* **2014**, 4, (29), 15180-15215.
11. Barreiro, E. J. F., C. A. M., *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*. 2ª ed.; Editora Art Med Ltda: Porto Alegre: **2008**.
12. Balunas, M. J.; Kinghorn, A. D., Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* **2005**, 78, (5), 431-41.

13. Araujo, R. C. P.; Neves, F. A. R.; Formagio, A. S. N.; Kassuya, C. A. L.; Stefanello, M. E. A.; Souza, V. V.; Pavan, F. R.; Croda, J., Evaluation of the anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and in vivo acute toxicity of *Annona sylvatic*. *Bmc Complem Altern M* **2014**, 14.
14. Formagio, A. S.; Tonin, L. T.; Foglio, M. A.; Madjarof, C.; de Carvalho, J. E.; da Costa, W. F.; Cardoso, F. P.; Sarragiotto, M. H., 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, (22), 9660-7.
15. Nazari Formagio, A. S.; Santos, P. R.; Zanolli, K.; Ueda-Nakamura, T.; Dusman Tonin, L. T.; Nakamura, C. V.; Sarragiotto, M. H., 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**, 44, (11), 4695-701.
16. Barbosa, V. A.; Formagio, A. S.; Savariz, F. C.; Foglio, M. A.; Spindola, H. M.; de Carvalho, J. E.; Meyer, E.; Sarragiotto, M. H., Synthesis and antitumor activity of beta-carboline 3-(substituted-carbohydrazide) derivatives. *Bioorg Med Chem* **2011**, 19, (21), 6400-8.
17. Moutinho ILD. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. *Revista Médica de Minas Gerais*. 2011; 21(1):42-48.
18. Fox, W.; Ellard, G. A.; Mitchison, D. A., Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* **1999**, 3, (10 Suppl 2), S231-79.
19. Raviglione, M. C., The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis (Edinb)* **2003**, 83, (1-3), 4-14.
20. Raviglione, M. C., The new Stop TB Strategy and the Global Plan to Stop TB, 2006-2015. *Bull World Health Organ* **2007**, 85, (5), 327.
21. (Brasil), M. S., Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde: Brasília, **2011**; p 288.
22. Koul, A.; Arnoult, E.; Lounis, N.; Guillemont, J.; Andries, K., The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **2011**, 469, (7331), 483-90.
23. Sítio do Working Group on New TB Drugs (Stop TB Partnership). <http://www.newtbdrugs.org/pipeline.php>: **2015**.

24. FDA NEWS RELEASE. 31/12/2012 ed.; <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm333695.htm>: **2012**.
25. Winn Jr, W. A., S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P.; Woods, G., *Koneman, Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. sexta edição ed.; Guanabara koogan: Rio de Janeiro, **2008**; p 1565.
26. Silva, A. T. P.; Monteiro, S. G. M.; Figueiredo, P. M. S. F., Epidemiological profile of patients with extrapulmonary tuberculosis in a public hospital in state of Maranhão. *Rev Bras Clin Med* **2011**, 9, (1), 11-14.
27. Flynn, J. L.; Chan, J., What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol* **2005**, 13, (3), 98-102.
28. Ahmad, S., Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical & developmental immunology* **2011**, 2011, 814943.
29. Frieden, T. R.; Sterling, T. R.; Munsiff, S. S.; Watt, C. J.; Dye, C., Tuberculosis. *Lancet* **2003**, 362, (9387), 887-99.
30. Brasil. Ministério da Saúde/CNPS. Plano Nacional de Controle da Tuberculose/Manual de normas, 5a Ed., Brasília, MS 2001.
31. Higuchi, C. T.; Sannomiya, M.; Pavan, F. R.; Leite, S. R.; Sato, D. N.; Franzblau, S. G.; Sacramento, L. V.; Vilegas, W.; Leite, C. Q., *Byrsonima fagifolia* Niedenzu Apolar Compounds with Antitubercular Activity. *Evid Based Complement Alternat Med* **2008**.
32. Gandhi, N. R.; Nunn, P.; Dheda, K.; Schaaf, H. S.; Zignol, M.; van Soolingen, D.; Jensen, P.; Bayona, J., Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* **2010**, 375, (9728), 1830-43.
33. Arbex, M. A.; Varella Mde, C.; Siqueira, H. R.; Mello, F. A., Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. *J Bras Pneumol* **2010**, 36, (5), 641-56.
34. Arbex, M. A.; Varella Mde, C.; Siqueira, H. R.; Mello, F. A., Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: first-line drugs. *J Bras Pneumol* **2010**, 36, (5), 626-40.
35. (Brasil), M. S., O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. Saúde, S. V., Ed. Boletim Epidemiológico: Brasília, **2014**; Vol. v.44, n. 2, p 13p.
36. Negi, A. S.; Kumar, J. K.; Luqman, S.; Saikia, D.; Khanuja, S. P., Antitubercular potential of plants: a brief account of some important molecules. *Med Res Rev* **2010**, 30, (4), 603-45.

37. Rojas, R.; Caviedes, L.; Aponte, J. C.; Vaisberg, A. J.; Lewis, W. H.; Lamas, G.; Sarasara, C.; Gilman, R. H.; Hammond, G. B., Aegicerin, the first oleanane triterpene with wide-ranging antimycobacterial activity, isolated from *Clavija procera*. *J Nat Prod* **2006**, 69, (5), 845-6.
38. Gu, J. Q.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Montenegro, G.; Yang, D.; Timmermann, B. N., Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med* **2004**, 70, (6), 509-14.
39. Gutierrez-Lugo, M. T.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Suarez, E.; Timmermann, B. N., Antitubercular sterols from *Thalia multiflora* Horkel ex Koernicke. *Phytother Res* **2005**, 19, (10), 876-80.
40. Luo, X.; Pires, D.; Ainsa, J. A.; Gracia, B.; Mulhovo, S.; Duarte, A.; Anes, E.; Ferreira, M. J., Antimycobacterial evaluation and preliminary phytochemical investigation of selected medicinal plants traditionally used in Mozambique. *J Ethnopharmacol* **2011**, 137, (1), 114-20.
41. León-Díaz, R.; Meckes, M.; Said-Fernández, S.; Molina-Salinas, G. M.; Vargas-Villarreal, J.; Torres, J.; Luna-Herrera, J.; Jiménez-Arellanes, A., Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2010**, 105, 45-51.
42. Webster, D.; Lee, T. D.; Moore, J.; Manning, T.; Kunimoto, D.; LeBlanc, D.; Johnson, J. A.; Gray, C. A., Antimycobacterial screening of traditional medicinal plants using the microplate resazurin assay. *Can J Microbiol* **2010**, 56, (6), 487-94.
43. Li, H.; O'Neill, T.; Webster, D.; Johnson, J. A.; Gray, C. A., Anti-mycobacterial diynes from the Canadian medicinal plant *Aralia nudicaulis*. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, 140, (1), 141-144.
44. LIMA, M. S.; OLIVEIRA NETO, A. R.; PINTO, M. A.; SILVA, I. R.; MORAIS, S. C.; GOMES, M. L., Etnofarmacologia: o uso terapêutico de *Origanum vulgare* na medicina popular, Bragança - Pará. In *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, Caxambu - MG, **2007**.
45. Reyes-García, V., The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*. **2010**, 6, (32).
46. WHO, World Cancer Report. In *World Health Organization* Geneva, **2014**.
47. Hegedus, Z. L., The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side-products in human diseases and aging. *Toxicology* **2000**, 145, (2-3), 85-101.

48. INCA Instituto Nacional do Câncer. 16/08/2014 ed.; <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/index.asp>: **2015**.
49. Suggitt, M.; Bibby, M. C., 50 Years of Preclinical Anticancer Drug Screening: Empirical to Target-Driven Approaches. *Clinical Cancer Research* **2005**, 11, (3), 971-981.
50. Mann, J., Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature reviews. Cancer* **2002**, 2, (2), 143-8.
51. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **2007**, 70, (3), 461-77.
52. Kumar, A.; Patil, D.; Rajamohanam, P. R.; Ahmad, A., Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. *PLoS One* **2013**, 8, (9), e71805.
53. Kinghorn, A. D., Biologically active compounds from plants with reputed medicinal and sweetening properties. *J Nat Prod* **1987**, 50, (6), 1009-24.
54. da Rocha, A. B.; Lopes, R. M.; Schwartzmann, G., Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* **2001**, 1, (4), 364-9.
55. Brandão, H. N.; David, J. P.; Couto, R. D.; Nascimento, J. A. P.; David, J. M., Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova* **2010**, 33, 1359-1369.
56. NCI-National Cancer Institute. <https://ntp.cancer.gov/branches/btb/ivclsp.html>: **2015**.
57. McClellan, M.; Benner, J.; Schilsky, R.; Epstein, D.; Woosley, R.; Friend, S.; Sidransky, D.; Geoghegan, C.; Kessler, D., An accelerated pathway for targeted cancer therapies. *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, 10, (2), 79-80.
58. Amaral, A. T. d.; Montanari, C. A., Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. *Química Nova* **2002**, 25, 39-44.
59. Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G., Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados* **2010**, 24, 81-98.
60. Swinney, D. C.; Anthony, J., How were new medicines discovered? *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, 10, (7), 507-519.
61. Orme, I., Search for new drugs for treatment of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, 45, (7), 1943-6.

62. Schwarz, S.; Silley, P.; Simjee, S.; Woodford, N.; van Duijkeren, E.; Johnson, A. P.; Gaastra, W., Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother* **2010**, 65, (4), 601-4.
63. Ahmed, S. A.; Gogal, R. M., Jr.; Walsh, J. E., A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* **1994**, 170, (2), 211-24.
64. Collins, L.; Franzblau, S. G., Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, 41, (5), 1004-9.
65. Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F., Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, (8), 2720-2.
66. Martin, A.; Camacho, M.; Portaels, F.; Palomino, J. C., Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, 47, (11), 3616-9.
67. Primm, T. P.; Franzblau, S. G., Recent Advances in Methodologies for the Discovery of Antimycobacterial Drugs. *Current Bioactive Compound* **2007**, 3, 201-208.
68. Houghton, P.; Fang, R.; Techatanawat, I.; Steventon, G.; Hylands, P. J.; Lee, C. C., The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* **2007**, 42, (4), 377-87.
69. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; et al., Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* **1991**, 83, (11), 757-66.
70. Dyer, L. A.; Palmer, A. D. N., *Piper*: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution. In *Kluwer Academic/Plenum*, New York, NY, USA: **2004**.
71. Wang, Y.-H.; Morris-Natschke, S. L.; Yang, J.; Niu, H.-M.; Long, C.-L.; Lee, K.-H., Anticancer Principles from Medicinal *Piper* (胡椒 Hú Jiāo) Plants. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **2014**, 4, (1), 8-16.

72. Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P. M., Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* **1997**, 46, (4), 597-673.
73. Pessini, G. L.; Dias Filho, B. P.; Nakamura, C. V.; Cortez, D. A. G., Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2003**, 98, 1115-1120.
74. Bertol, J. W.; Santos, P. R.; Rodrigues, J.; Cortez, D. A. G.; D. Filho, B. P.; Nakamura, C. V.; Ueda-Nakamura, T., Antiviral activity of fractions from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2012**, 22, 1276-1281.
75. Pessini, G. L.; Dias Filho, B. P.; Nakamura, C. V.; Cortez, D. A. G., Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2005**, 16, 1130-1133.
76. Morandim-Giannetti, A. A.; Pin, A. R.; Pietro, N. A. S.; de Oliveira, H. C.; Mendes-Giannini, M. J. S.; Alecio, A. C.; Kato, M. J.; de Oliveira, J. E.; Furlan, M., Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. *Journal of Medicinal Plants Research* **2010**, 4, (17), 1810-1814.
77. Cáceres, A.; Cruz, S. M.; Gaitán, I.; Guerrero, K.; Álvarez, L. E.; Marroquín, M. N., Antioxidant activity and quantitative composition of extracts of *Piper* species from Guatemala with potential use in natural product industry. In *Acta Horticulturae*, **2012**; Vol. 964, pp 77-84.
78. Luize, P. S.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Cortez, D. A.; Nakamura, C. V., Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. *Biol Pharm Bull* **2006**, 29, (10), 2126-30.
79. Carrara, V. S.; Vieira, S. C.; de Paula, R. G.; Rodrigues, V.; Magalhaes, L. G.; Cortez, D. A.; Da Silva Filho, A. A., In vitro schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of *Piper* species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). *Journal of helminthology* **2014**, 88, (3), 321-6.
80. Novaes Ada, S.; da Silva Mota, J.; Barison, A.; Veber, C. L.; Negrao, F. J.; Kassuya, C. A.; de Barros, M. E., Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). *Phytomedicine* **2014**, 21, (4), 523-8.
81. Prando, T. B. L.; Baciquete, T. d. F.; Vieira, J. A. C.; Bressan, J.; Gasparotto, F. M.; Jesus, D. R.; Cardozo Junior, E. L.; Louren; o, E. L. B.; Gasparotto Junior,

- A., Amides from Piper as a Diuretic: Behind the Ethnopharmacological Uses of Piper glabratum Kunth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**, 2014, 5.
82. Longato, G. B.; Rizzo, L. Y.; Sousa, I. M.; Tinti, S. V.; Possenti, A.; Figueira, G. M.; Ruiz, A. L.; Foglio, M. A.; de Carvalho, J. E., In vitro and in vivo anticancer activity of extracts, fractions, and eupomatenoid-5 obtained from *Piper regnellii* leaves. *Planta Med* **2011**, 77, (13), 1482-8.
83. Iwamoto, L. H.; Vendramini-Costa, D. B.; Monteiro, P. A.; Ruiz, A. L. T. G.; Sousa, I. M. d. O.; Foglio, M. A.; de Carvalho, J. E.; Rodrigues, R. A. F., Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM* **2015**, 2015, 948737.
84. Achenbach, H.; Gross, J.; Portecop, J., Ishwarol, the main Sesquiterpene in *Piper amalago*. *Planta Med* **1984**, 50, (6), 528-9.
85. Carrara, V. D.; de Souza, A.; Dias, B. P.; Nakamura, C. V.; de Paulo, L. F.; Young, M. C. M.; Svidzinski, T. I. E.; Cortez, D. A. G., Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil from *Piper amalago* L. *Lat Am J Pharm* **2010**, 29, (8), 1459-1462.
86. Achenbach, H.; Fietz, W.; Worth, J.; Waibel, R.; Portecop, J., Constituents of Tropical Medicinal-Plants .19. Gc Ms-Investigations of the Constituents of *Piper amalago* - 30 New Amides of the Piperine-Type. *Planta Medica* **1986**, (1), 12-18.
87. Domínguez, X. A.; Verde, J. S.; Sucar, S.; Treviño, R., Two amides from *Piper amalago*. *Phytochemistry* **1985**, 25, (1), 239-240.
88. Cruz, S. M.; Cáceres, A.; Álvarez, L. E.; Apel, M. A.; Henriques, A. T., Chemical diversity of essential oils of 15 *Piper* species from Guatemala. In *Acta Horticulturae*, **2012**; Vol. 964, pp 39-46.
89. Carrara, V. d. S.; Cunha-Júnior, E. F.; Torres-Santos, E. C.; Corrêa, A. G.; Monteiro, J. L.; Demarchi, I. G.; Lonardon, M. V. C.; Cortez, D. A. G., Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2013**, 23, 447-454.
90. Lopes, J. J.; Marx, C.; Ingrassia, R.; Picada, J. N.; Pereira, P.; Ferraz Ade, B., Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of *Piper* genus. *Exp Toxicol Pathol* **2012**, 64, (1-2), 9-14.

91. Jacobs, H.; Seeram, N. P.; Nair, M. G.; Reynolds, W. F.; McLean, S., Amides of *Piper amalago* var. *nigrinodum*. *J Indian Chem Soc* **1999**, 76, (11-12), 713-717.
92. Rukachaisirikul, T.; Prabpai, S.; Champung, P.; Suksamrarn, A., Chabamide, a novel piperine dimer from stems of *Piper chaba*. *Planta Med* **2002**, 68, (9), 853-5.
93. Rukachaisirikul, T.; Prabpai, S.; Kongsaree, P.; Suksamrarn, A., (+)-Bornyl piperate, a new monoterpene ester from *Piper pedicellatum* Aff. roots. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2004**, 52, (6), 760-1.
94. Mata, R.; Morales, I.; Pérez, O.; Rivero-Cruz, I.; Acevedo, L.; Enriquez-Mendoza, I.; Bye, R.; Franzblau, S.; Timmermann, B., Antimycobacterial Compounds from *Piper sanctum*. *Journal of Natural Products* **2004**, 67, (12), 1961-1968.
95. Rukachaisirikul, T.; Siriwattanakit, P.; Sukcharoenphol, K.; Wongvein, C.; Ruttanaweang, P.; Wongwattanavuch, P.; Suksamrarn, A., Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, 93, (2-3), 173-176.
96. Tuntiwachwuttikul, P.; Phansa, P.; Pootaeng-on, Y.; Taylor, W. C., Chemical Constituents of the Roots of *Piper Sarmentosum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2006**, 54, (2), 149-151.
97. Hussain, K.; Ismail, Z.; Sadikun, A.; Ibrahim, P., Antioxidant, anti-TB activities, phenolic and amide contents of standardised extracts of *Piper sarmentosum* Roxb. *Nat Prod Res* **2009**, 23, (3), 238-49.
98. Mohamad, S.; Zin, N. M.; Wahab, H. A.; Ibrahim, P.; Sulaiman, S. F.; Zahariluddin, A. S. M.; Noor, S. S. M., Antituberculosis potential of some ethnobotanically selected Malaysian plants. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, 133, (3), 1021-1026.
99. Tekwu, E. M.; Askun, T.; Kuete, V.; Nkengfack, A. E.; Nyasse, B.; Etoa, F.-X.; Beng, V. P., Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethno-medically used against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, 142, (2), 374-382.
100. Diaz, L. E.; Munoz, D. R.; Prieto, R. E.; Cuervo, S. A.; Gonzalez, D. L.; Guzman, J. D.; Bhakta, S., Antioxidant, Antitubercular and Cytotoxic Activities of *Piper imperiale*. *Molecules* **2012**, 17, (4), 4142-4157.
101. Scodro, R. B. L.; Pires, C. T. A.; Carrara, V. S.; Lemos, C. O. T.; Cardozo-Filho, L.; Souza, V. A.; Corrêa, A. G.; Siqueira, V. L. D.; Lonardoní, M. V. C.; Cardoso, R. F.; Cortez, D. A. G., Anti-tuberculosis neolignans from *Piper regnellii*. *Phytomedicine* **2013**, 20, (7), 600-604.

102. Chen, S.; Huang, H.-Y.; Cheng, M.-J.; Wu, C.-C.; Ishikawa, T.; Peng, C.-F.; Chang, H.-S.; Wang, C.-J.; Wong, S.-L.; Chen, I.-S., Neolignans and phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their antiplatelet and antitubercular activities. *Phytochemistry* **2013**, 93, (0), 203-209.
103. Chen, S.; Cheng, M. J.; Wu, C. C.; Peng, C. F.; Huang, H. Y.; Chang, H. S.; Wang, C. J.; Chen, I. S., Three new phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their inhibitory activities on platelet aggregation and *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biodivers* **2014**, 11, (5), 792-9.
104. Rivas, P.; Cassels, B. K.; Morello, A.; Repetto, Y., Effects of some beta-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology* **1999**, 122, (1), 27-31.
105. Ferreira, M. E.; Nakayama, H.; de Arias, A. R.; Schinini, A.; de Bilbao, N. V.; Serna, E.; Lagoutte, D.; Soriano-Agaton, F.; Poupon, E.; Hocquemiller, R.; Fournet, A., Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Ethnopharmacol* **2007**, 109, (2), 258-63.
106. Costa, E. V.; Pinheiro, M. L.; de Souza, A. D.; Barison, A.; Campos, F. R.; Valdez, R. H.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P.; Nakamura, C. V., Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine-beta-carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). *Molecules* **2011**, 16, (11), 9714-20.
107. Tonin, L. T.; Panice, M. R.; Nakamura, C. V.; Rocha, K. J.; dos Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; da Costa, W. F.; Sarragiotto, M. H., Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted-beta-carboline)-3-carboxamides. *Biomed Pharmacother* **2010**, 64, (6), 386-9.
108. Costa, E. V.; Pinheiro, M. L.; Xavier, C. M.; Silva, J. R.; Amaral, A. C.; Souza, A. D.; Barison, A.; Campos, F. R.; Ferreira, A. G.; Machado, G. M.; Leon, L. L., A pyrimidine-beta-carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *J Nat Prod* **2006**, 69, (2), 292-4.
109. Stefanello, T. F.; Panice, M. R.; Ueda-Nakamura, T.; Sarragiotto, M. H.; Auzely-Velty, R.; Nakamura, C. V., N-butyl-[1-(4-methoxy)phenyl-9H-beta-carboline]-3-carboxamide prevents cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**, 58, (12), 7112-20.
110. Ashok, P.; Ganguly, S.; Murugesan, S., Manzamine alkaloids: isolation, cytotoxicity, antimalarial activity and SAR studies. *Drug Discov Today* **2014**.

111. Aassila, H.; Bourguet-Kondracki, M. L.; Rifai, S.; Fassouane, A.; Guyot, M., Identification of harman as the antibiotic compound produced by a tunicate-associated bacterium. *Marine biotechnology* **2003**, 5, (2), 163-6.
112. Wang, W.; Nam, S. J.; Lee, B. C.; Kang, H., Beta-carboline alkaloids from a Korean tunicate Eudistoma sp. *J Nat Prod* **2008**, 71, (2), 163-6.
113. Begum, S.; Hassan, S. I.; Siddiqui, B. S., Synthesis and antimycobacterial activity of some beta-carboline alkaloids. *Nat Prod Res* **2004**, 18, (4), 341-7.
114. Begum, S.; Ali, S. N.; Siddiqui, B. S., Antitubercular alkaloid. Google Patents: **2013**.
115. Ang, K. K.; Holmes, M. J.; Higa, T.; Hamann, M. T.; Kara, U. A., In vivo antimalarial activity of the beta-carboline alkaloid manzamine A. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, 44, (6), 1645-9.
116. 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* **2004**, 12, (17), 4613-23.
117. Cao, R.; Chen, H.; Peng, W.; Ma, Y.; Hou, X.; Guan, H.; Liu, X.; Xu, A., Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel beta-carboline derivatives. *Eur J Med Chem* **2005**, 40, (10), 991-1001.
118. 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* **2005**, 40, (3), 249-57.
119. Wu, Q.; Cao, R.; Feng, M.; Guan, X.; Ma, C.; Liu, J.; Song, H.; Peng, W., Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of novel 3,4,5-trimethoxyphenyl substituted beta-carboline derivatives. *Eur J Med Chem* **2009**, 44, (2), 533-40.
120. Wu, J.; Li, C.; Zhao, M.; Wang, W.; Wang, Y.; Peng, S., A class of novel carboline intercalators: Their synthesis, in vitro anti-proliferation, in vivo anti-tumor action, and 3D QSAR analysis. *Bioorg Med Chem* **2010**, 18, (17), 6220-9.
121. Savariz, F. C.; Foglio, M. A.; Ruiz, A. L.; da Costa, W. F.; Silva Mde, M.; Santos, J. C.; Figueiredo, I. M.; Meyer, E.; de Carvalho, J. E.; Sarragiotto, M. H., Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) beta-carbolines and their Mannich bases. *Bioorg Med Chem* **2014**, 22, (24), 6867-75.
122. Zhang, H. Z.; Crogan-Grundy, C.; May, C.; Drewe, J.; Tseng, B.; Cai, S. X., Discovery and structure-activity relationships of (2-(arylthio)benzylideneamino)guanidines as a novel series of potent apoptosis inducers. *Bioorg Med Chem* **2009**, 17, (7), 2852-8.

123. Berlinck, R. G. S., Natural guanidine derivatives. *Natural Product Reports* **1996**, 13, (5), 377-409.
124. Berlinck, R. G., Natural guanidine derivatives. *Nat Prod Rep* **2002**, 19, (5), 617-49.
125. Berlinck, R. G.; Kossuga, M. H., Natural guanidine derivatives. *Nat Prod Rep* **2005**, 22, (4), 516-50.
126. Berlinck, R. G.; Trindade-Silva, A. E.; Santos, M. F., The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Nat Prod Rep* **2012**, 29, (12), 1382-406.
127. Tahir, S.; Badshah, A.; Hussain, R. A., Guanidines from 'toxic substances' to compounds with multiple biological applications- detailed outlook on synthetic procedures employed for the synthesis of guanidines. *Bioorganic Chemistry*, (0).
128. Yu, X.; Lin, W.; Li, J.; Yang, M., Synthesis and biological evaluation of novel beta-carboline derivatives as Tat-TAR interaction inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, 14, (12), 3127-30.
129. Yu, X.; Lin, W.; Pang, R.; Yang, M., Design, synthesis and bioactivities of TAR RNA targeting beta-carboline derivatives based on Tat-TAR interaction. *Eur J Med Chem* **2005**, 40, (9), 831-9.

5. MANUSCRITO 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

ISSN: 1741-4288

Qualis: A1 - Medicina II

Fator de impacto: 1.880

Manuscrito à ser submetido

Para mais informações acesse: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/guidelines/>

Phytochemistry, anti-*Mycobacterium tuberculosis* and Antiproliferative Activities of *Piper amalago* (Piperaceae)

Flora Martinez Figueira Moreira,¹ Julio Croda,¹ Candida Aparecida Leite Kassuya,¹ Rafaela Carla Pivetta Araujo,¹ Vanessa Vilamaior de Souza,¹ Maria Helena Sarragiotto,² Mary Ann Foglio,³ Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz,³ João Ernesto de Carvalho,³ and Anelise Samara Nazari Formagio⁴

¹*Faculdade de Ciências as Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, Dourados, 79.804-970 MS, Brazil*

²*Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790 - Jardim Universitário, Maringá, 87020-900 PR, Brazil*

³*Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, 6171, Campinas, 13083-970 SP, Brazil*

⁴*Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, Dourados, 79.804-970 MS, Brazil*

Correspondence should be addressed to Anelise Samara Nazari Formagio; aneliseformagio@ufgd.edu.br

34 **Abstract**

35

36 This study determined the anti-*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) *in vitro* activity of
37 methanolic extract (MEPA) obtained from the leaves of *Piper amalago* L. (Piperaceae), in
38 addition to fractions (Hexane, Chloroform and water-alcohol) and two piperamides, *N*-[7-
39 (3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(*Z*),4(*Z*)-heptadienoyl] pyrrolidine (**PA-1**) and *N*-[7-(3',4'-
40 methylenedioxyphenyl)-2(*E*),4(*E*) heptadienoyl] pyrrolidine (**PA-2**), via reduction of resazurin
41 method on microplates (REMA). We also evaluated the antiproliferative activity *in vitro* of
42 MEPA against ten strains of human tumor cells by colorimetric method with sulforhodamine
43 B. **PA-2** was evaluated *in silico* for analysis of absorption, distribution, metabolism and
44 excretion (ADME) in the human body using parameters of Lipinski, besides the topological
45 polar surface area (TPSA) and percentage absorption (% ABS). We also investigated the acute
46 toxicity *in vivo* in Swiss mice treated with chloroform fraction (CFPA) at doses of 175, 560,
47 1.792 and 2.000 mg/kg. In general, the CFPA was more active against MTB with an MIC 15.9
48 µg/mL **PA-1** and **PA-2** had moderate activity with a MIC of 92.0 and 57.0 µg/mL, respectively.
49 MEPA was effective in PC-3 prostate cells (LC₅₀ = 4.34 µg/mL; TGI = 64.72 µg/mL) and
50 OVCAR-3 ovarian cells (LC₅₀ = 9.44 µg/mL). The *in silico* study showed that PA-2 has good
51 absorption and permeability.

52

53

54 **Keywords:** *Piper amalago* L., *Mycobacterium tuberculosis*, Antimycobacterial activity,
55 Antiproliferative activity, Piperamides, *In silico* study.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68 1. Introduction

69

70 In the last years, the number of patients with tuberculosis (TB) has rapidly increased
71 due, in part, to the emergence of multidrug-resistant strains (MDR-TB) and extensively drug-
72 resistant (XDR-TB) [1, 2]. Due to the emergence of these forms of resistance, and given the
73 high toxicity of anti-tuberculosis drugs, it is necessary to search for new original, active and
74 less toxic molecules wich reduce the time and complexity of the treatment [3, 4].

75 The same problem occurs with cancer, a disease caused due to changes in systems of
76 regulation of cell proliferation and differentiation [5]. Despite advances in the discovery of
77 anticancer drugs field, the undesirable side effects of treatment and high incidence of new cases
78 have aroused the need to the development of new agents with antitumor activity [6].

79 In this sense, bioprospecting provide the best possibilities of finding substances of
80 therapeutic interest [7]. An important example of natural source is the *Piper* (Piperaceae), which
81 contains over 2000 species widely distributed in tropical and subtropical regions, characterized
82 by small trees or shrubs with approximately 1.3 to 4.0 meters [8, 9]. Phytochemical
83 investigation reveals a variety of secondary metabolites, including alkaloids/amides,
84 propenylphenols, lignans, neolignans, terpenes, steroids, kawapyrones, piperolides, chalcones,
85 dihydrochalcones, flavones and flavanones [10]. Several pharmacological studies are reported,
86 including antibacterial [11], antiviral [12], antifungal [13, 14], antioxidant [15], antiparasitic
87 [16, 17], diuretic [18, 19], antituberculosis [20, 21] e antitumor [9, 22, 23].

88 *Piper amalago* L., popularly known as "jaborandi manso" and "pimenta-da-jamaica", is
89 used in folk medicine to relieve pain in the stomach and chest, acting as a natural anti-
90 inflammatory and anthelmintic [10]. Phytochemical studies of the leaves, fruits and roots
91 identified the presence of sesquiterpene [24, 25]; pyrrolidines, isobutylamides and piperidide
92 [26, 27]; nerolidol [28]; chalconas and flavonol [18]. Biological investigations of *P. amalago*
93 revealed leishmanicidal [29], schistosomicidal [17], anxiogenic [30], diuretic and natriuretic
94 [18] activities.

95 This study aims to evaluate the anti-*M. tuberculosis* and antiproliferative activity, as
96 well as the acute toxicity of *P. amalago* L. leaves.

97

98 2. Materials and Methods

99

100 2.1 *Plant material.* The leaves of *P. amalago* were collected in Dourados, Mato Grosso do Sul,
101 Brazil and identified by Dr. Zefa Valdevina Pereira. A voucher specimen (DDMS 5203) was

102 deposited at the Herbarium of the Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS,
103 Brazil.

104

105 *2.2 Extraction, fractionation and isolation procedure.* The air-dried leaves of *P. amalago* (530
106 g) were submitted to exhaustively extractions with 4x2L of methanol by maceration process.
107 The methanolic extract (MEPA) was obtained after the evaporation of the solvent under reduced
108 pressure at 45 °C. The MEPA (25 g) was dissolved was dissolved in MeOH–H₂O 1:1 and
109 partitioned with n-hexane and CHCl₃, showed the hexane (HFPA), CHCl₃ (CFPA) and
110 hidromethanolic (HidroFPA) fractions. The CFPA (4.10 g) was subjected to chromatographic
111 column on silica gel (50 g; 70–230 mesh) eluted with hexane, hexane-CHCl₃ (8:2; 1:1), CHCl₃,
112 CHCl₃-MeOH mixtures of increasing polarity. Repeated preparative TLC (CHCl₃-MeOH 30%)
113 of the fraction eluted with CHCl₃-MeOH 20% afforded compounds **PA-1** (6.2 mg) and **PA-2**
114 (7.4 mg).

115

116 *2.3. Identification of compounds.* The isolated compounds were identified by analysis of their
117 NMR. NMR measurements were carried out on a Varian Mercury Plus BB spectrometer
118 operating at 300 MHz for ¹H and 75.5 for ¹³C, using CD₃OD as solvent and tetramethylsilane
119 (TMS) as internal standard. The structure of the compounds *N*-[7-(3',4'-
120 methylenedioxyphenyl)-2(*Z*),4(*Z*)-heptadienoyl] pyrrolidine (**PA-1**) and *N*-[7-(3',4'-
121 methylenedioxyphenyl)-2(*E*),4(*E*) heptadienoyl] pyrrolidine (**PA-2**) were elucidate by
122 comparison of their NMR data with literatura values [31, 32].

123 *N*-[7-(3',4'-Methylenedioxyphenyl)-2(*Z*),4(*Z*)-heptadienoyl]pyrrolidine (**PA-1**): ¹H-NMR
124 (CD₃OD) δ: 1.87– 2.10 (m, 4H); 2.45–2.50 (m, 2H); 2.63–2.68 (m, 2H); 3.55 (t, *J* = 6.5 Hz,
125 2H); 3.58 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H); 5.82 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H); 5.96 (s, 2H); 6.04–6.06 (m, 1H); 6.42
126 (t, *J* = 11.6 Hz, 1H); 6.70 (dd, *J* = 2.5; 8.2 Hz, 1H); 6.68 (d, *J* = 2.5 Hz; 1H); 6.77 (d, *J* = 8.2
127 Hz; 1H); 7.65–7.45 (m; 1H). ¹³C-NMR (CD₃OD) δ: 24.50; 27.20; 35.11; 35.20; 45.60; 47.07;
128 100.44; 107.80; 109.10; 117.23; 121.30; 128.10; 135.33; 141.11; 142.28; 144.30; 147.62;
129 165.77.

130 *N*-[7-(3',4'-Methylenedioxyphenyl)-2(*E*),4(*E*)-heptadienoyl]pyrrolidine (**PA-2**): ¹H-NMR
131 (CD₃OD) δ: 1.80–2.10 (m; 2H); 2.47-2.55 (m; 2H); 2.39–2.42 (m; 2H); 2.63–2.72 (m; 2H);
132 3.33–3.46 (m; 2H); 3.55–3.62 (m; 2H); 6.06 (s; 2H); 6.14 (d, *J* = 15.4 Hz; 1H); 6.20 (dd, *J* =
133 6.4, 15.4 Hz; 1H); 6.26 (dd, *J* = 10.8, 15.4 Hz, H₄; 1H); 6.70 (dd, *J* = 2.0; 7.8 Hz, H_{6'}; 1H);
134 6.76 (d, *J* = 2.0 Hz; 1H); 6.78 (d, *J* = 7.8 Hz; 1H); 7.30 (dd, *J* = 10.8, 15.4 Hz; 1H). ¹³C-NMR

135 (CD₃OD) δ : 24.58; 26.66; 36.04; 36.44; 47.10; 47.28; 100.10; 108.10; 109.26; 120.44; 121.48;
136 129.54; 135.35; 141.72; 142.32; 144.45; 147.32; 165.77.

137

138 *2.4 Anti-Micobacterium tuberculosis activity.* The strains *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC27294)
139 were grown in the Ogawa–Kudoh (OK) medium for 10 days at 37°C. For testing a heave was
140 removed and cultured in Middlebrook 7H9 broth (Difco) supplemented with oleic acid, bovine
141 serum albumin, dextrose and catalase (OADC enrichment BBL / Becton-Dickinson), also added
142 were 0.5% glycerol as carbon source and 0.5% Tween 80 to prevent the appearance of lumps.
143 The broth was maintained for 15 days at 37°C. The bacterial suspensions were prepared and
144 adjusted to the n¹° McFarland scale. The stock solutions of tested extract, fractions and isolated
145 compounds were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) and diluted in
146 Middlebrook 7H9 broth (Difco) supplemented with oleic acid, bovine serum albumin, dextrose
147 and catalase (OADC enrichment BBL/Becton Dickinson). Rifampicin and Isoniazid were
148 solubilized according to the manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
149 - USA) and used as positive control drugs. The determination of antimicrobial activity was
150 performed using the Resazurin Microtitre Assay (REMA) [33]. Briefly, 100 μ l of Middlebrook
151 7H9 broth (Difco) supplemented was dispensed in each well of a sterile flat-bottom 96-well
152 plate, then serial dilutions were made of solutions in order to obtain varying concentrations of
153 test compounds (0.98 to 250 μ g/mL) and reference drug (0.004 to 1 μ g/mL). Made dilutions,
154 was added to each well 100 μ l of bacterial suspension (5×10^5 UFC/mL). Plates were incubated
155 for 7 days at 37°C, after this period, 30 μ L of resazurin solution (Sigma-Aldrich) diluted in
156 0.01% sterile water was added to each well and the samples were incubated for 24 hours at
157 37°C. The reading was performed based on the color change and the absorbance on a microplate
158 reader TP-Reader (Thermo Plate[®]) at a wavelength of 492 nm. Each compound was analyzed
159 in triplicate on alternate days. The MIC was defined as the lowest concentration that results in
160 90% inhibition of growth of *M. tuberculosis* [34]. Extract with a MIC value < 150 μ g/mL were
161 defined as active against *M. tuberculosis*.

162

163 *2.5 In vitro antiproliferative assay.* The National Cancer Institute, Frederick MA/USA, kindly
164 provided ten human cancer cell lines: U251 (glioma, CNS), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES
165 (ovarian expressing phenotype multiple drug resistance), 786–0 (renal), NCI-H460 (lung, non-
166 small cells), PC-3 (prostate), OVCAR-03 (ovarian), K-562 (leukaemia), HT29 (colon) and
167 HaCaT (keratinocyte). The stock and experimental cultures were grown in medium containing
168 5 mL of RPMI 1640 (GIBCO BRL) supplemented with 5% foetal bovine serum (GIBCO BRL).

169 The stock cultures were grown in 5 mL of RPMI-1640 (GIBCO BRL) supplemented with 5%
170 foetal bovine serum (FBS, GIBCO). A penicillin:streptomycin mixture (1000 U/mL:1000
171 µg/mL, 1 mL/L RPMI, Nutricel) was added to the experimental cultures. The cells were plated
172 in 96-well plates (100 µL cells/well) and exposed to different concentrations of the MEPA
173 (0.25, 2.5, 25 and 250 µg/mL) in DMSO/RPMI (0.1% v/v) at 37°C and 5% CO₂ for 48 h. The
174 final DMSO concentration did not affect cell viability. The cells were then fixed with a
175 trichloroacetic acid solution (50%, v/v), and cell proliferation was determined via
176 spectrophotometric quantification (540 nm, Molecular Devices Versa Max Microplate Reader)
177 of the cellular protein content using a sulphorhodamine B assay [35]. Doxorubicin (0.025-25
178 µg/mL) was used as a positive control. Three measurements were obtained: first at time zero
179 (T_0 , at the beginning of incubation) and then 48 h post-incubation for both the compound-free
180 (C) and tested (T) cells. Cell proliferation was determined using the equation $100 \times [(T - T_0)/C - T_0]$.
181 A cytostatic effect was observed when $T \geq T_0$, while a cytotoxic effect occurred
182 when $T < T_0$. The experiments were performed in triplicate.

183

184 *2.6 Animals and acute toxicity.* The experiments were performed using female Swiss mice (28
185 - 32g, n = 9) provided by the Federal University of Grande Dourados (UFGD). Animals were
186 maintained at a controlled temperature (22 ± 1 ° C) and humidity (60-80%) with a constant 12h
187 light-dark cycle and free access to food and water. The animals were acclimatized to the
188 experimentation room for at least 2 h before testing and were used only once throughout the
189 experiments. The procedures were performed based on the guidelines of the Ethical Principles
190 in Animal Research and approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation at
191 the Federal University of Grande Dourados (Protocol no. 005/2010). The acute toxicity study
192 was based on the protocol 425 conducted according to Organization for Economic Cooperation
193 and Development (OECD) and the protocols established by Brazilian Health Surveillance
194 Agency (ANVISA) [36, 37]. According to the protocol established, 9 animals were used, each
195 received a single oral administration by gavage of the chloroform fraction (CFPA). Initially one
196 of the animals received a dose of 175 mg/kg and was observed at 30 minutes, 1h, 2h, 4h, 6h,
197 12h, 24h and 48 hours. After this period a second animal received a dose of 560 mg/ kg, after
198 48 hours the third animal received a dose of 1792 mg/kg and after an additional 48 hours a
199 fourth animal received a dose of 2000 mg/kg. After the last dose administered, no deaths were
200 observed and according to protocol 4 more animals received 2000 mg/kg, the control group
201 received the vehicle used for diluting CF (drops of DMSO + distilled water). The animals were
202 observed for signs of toxicity over 14 days. Behavioral observations (reflexes, tremors,

203 convulsions, lacrimation, cyanosis, salivation, piloerection, muscle tone and motor
 204 coordination), mortality, the weight of the animals, and the amount of water and feed were
 205 analyzed. After 14 days of treatment, the animals were weighed and subsequently euthanized
 206 by cervical dislocation, the presence of macroscopic alterations in organs such as spleen, heart,
 207 liver, lungs and kidneys were assessed for appearance, color, size, weight and consistency.

208

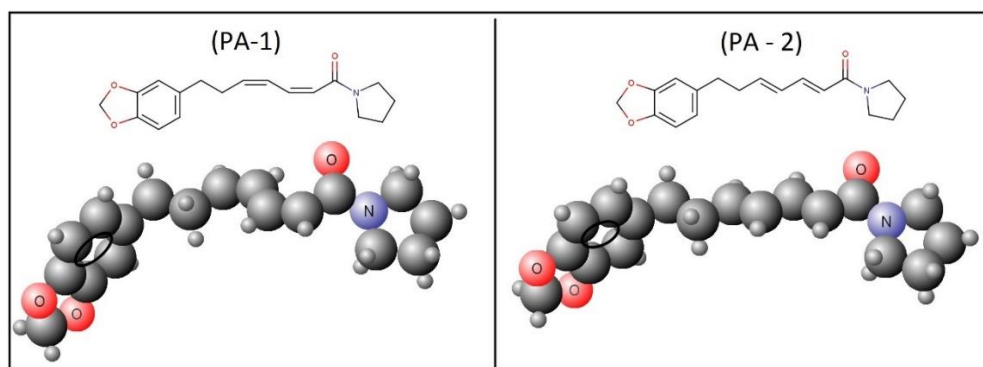
209 *2.7. In silico study.* An *in silico* computational study of the compound **PA-2** was performed to
 210 determine Lipinski's rules, topological polar surface area (TPSA) and percentage of absorption
 211 (%ABS). Calculations were performed using Molinspiration online property calculation toolkit
 212 software [38] and OSIRIS property explorer software [39]. The percentage of absorption was
 213 estimated using the following equation: $\%ABS = 109 - [0.345 \times TPSA]$. The Lipinski's rule or
 214 "rule of 5" [40] states that poor absorption or permeation the drug are more likely when:
 215 Hydrogen bond donors > 5 (OH and NH groups); Hydrogen bond acceptors > 10 (N and O
 216 atoms); Molecular weight (MW) > 500; The Log P is > 5 (or MLogP is over 4.15).

217

218 3. Results and Discussion

219 *3.1 Chemical Identification.* In our search for natural products with anticancer and MTB
 220 activity, the piperamide PA-1 and PA-2 (Figura 1) isolated of the CHCl₃ fraction resulting of
 221 the methanolic extract (MEPA) were first available. Futhermore, antipyretic, analgesic, anti-
 222 inflammatory, antimicrobial, antifungal, antitumoral, and insecticide activity [10, 41] has been
 223 reported for several compounds possessing the piperamide moiety. The **PA-1** was found
 224 previously in the species *P. hispidum* [31]. The structure **PA-2** showed lower dipole moment
 225 and charge distribution of the groups between different pieces of the molecule, being able to
 226 confer greater stability.

227



228

229 **Figure 1 - Three-dimensional chemical structure of the compounds found in the leaves of**
 230 ***Piper amalago* (Piperaceae)** (By program MarvinBans version 15.6.29.0).

231 3.2 *Anti-Mycobacterium tuberculosis* activity (MTB). MEPA and HFPA, CFPA and HidroFPA
 232 fractions, as well as isolated compounds (**PA-1** and **PA-2**) from leaves of *P. amalago* were
 233 evaluated *in vitro* for their anti-mycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC
 234 27294) using the method REMA [33]. The values of MIC ($\mu\text{g/mL}$) were compared to two
 235 standard anti-tuberculosis drugs, isoniazid (MIC = 0.05 $\mu\text{g/mL}$ and rifampicin (MIC = 0.01
 236 $\mu\text{g/mL}$), screening results are shown in **Table 1**. Franzblau and collaborators [42] suggest as a
 237 cut range to extracts the MIC value equal to or less than 200 $\mu\text{g/mL}$. However, for this to work,
 238 we suggest the MIC values: idle, values > 150 $\mu\text{g/mL}$; moderate between 10 and 150 $\mu\text{g/mL}$
 239 and potent < 10 $\mu\text{g/mL}$.

240

241 **Table 1:** MIC^a of *P. amalago* extract, fractions and isolated compounds against *M. tuberculosis*
 242 H₃₇RV using the REMA assay.

Samples	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Methanolic extract (MEPA)	45.5
Hexane fraction (HFPA)	>250
Chloroform fraction (CFPA)	15.9
Hidromethanolic fraction (HidroFPA)	48.5
PA-1	92.0
PA-2	57.0
Isoniazid	0.05
Rifampin	0.01

243 ^a Values are means of triplicate samples.

244

245 MEPA showed promising activity against MTB. There are no reports in the literature about the
 246 antimycobacterial activity of *P. amalago*, but *in vivo* studies, using mice as an experimental
 247 model, report that the methanolic extract of the leaves acts on the central nervous system,
 248 causing an anxiogenic effect [30] and that oral administration of ethanolic extract of the leaves
 249 exhibits diuretic and natriuretic effect, in addition to inhibiting the crystallization of calcium
 250 oxalate [18]. The CFPA showed moderate activity, with MIC value similar to the second-line
 251 drugs used for the treatment of TB as cycloserine (MIC = 12.50-50 $\mu\text{g/mL}$) and clarithromycin
 252 (MIC = 8-16 $\mu\text{g/mL}$) [43]. A more impressive result against MTB was observed in a previous
 253 study, in which the fraction ethyl acetate isolated from the methanol extract of *P. sarmentosum*
 254 leaves, showed a value of MIC at 3.12 $\mu\text{g/mL}$ [44], this result is equal to or better than
 255 gentamicin (MIC = 2-4 $\mu\text{g/mL}$), kanamycin (MIC = 1.25-5 $\mu\text{g/mL}$), tobramycin (MIC = 4-8
 256 $\mu\text{g/mL}$) and clarithromycin drugs (MIC = 8-16 $\mu\text{g/mL}$). In our study, piperamides (**PA-1** and

257 **PA-2**) showed moderate anti-*M. tuberculosis* activity. The results of this study indicate that the
258 effect of CFPA may be associated with other extract metabolites (not isolated). The search in
259 amides in *P. amalago* is due to similarity of functional groups were compared to standard anti-
260 tuberculosis drugs as isoniazid. The mechanism of action of isoniazid is not known, but it is
261 thought to work through its effects on lipids (fats) and DNA within the tuberculosis bacterium.
262 When isoniazid is broken down by the liver, one of the products is acetylhydrazine, a potent
263 toxin for the liver.

264

265 *3.3 Antiproliferative activity.* The antiproliferative *in vitro* assay of MEPA was evaluated
266 against ten tumor cell lines. Three response parameters (GI₅₀ and TGI) were calculated for each
267 cell line tested, the results are shown in **Table 2**. The values GI₅₀ (Growth inhibitory activity)
268 refers to the extract concentration which reduces 50 % of cell growth relative to control cells
269 (without addition of extract) and TGI (cytostatic activity) refers to the concentration of extract
270 required for total inhibition of cell growth. The GI₅₀ values were used to classify the activity of
271 the extract the following manner: inactive, values > 100 µg/mL; moderate between 10 and 100
272 µg/mL and potent <10 µg/mL. The results demonstrate that MEPA has antiproliferative activity
273 among potent and moderate, with GI₅₀ values ranging from 4.34 - 57.77 µg/mL. Particularly,
274 MEPA was effective in PC-3 prostate cells (GI₅₀ = 4.34 µg/mL; TGI = 64.72 µg/mL) and
275 OVCAR-3 ovarian cells (GI₅₀ = 9.44 µg/mL). Study using methanolic extracts of *P. nigrum*
276 and *P. retrofractum* demonstrated from moderate to potent cytotoxicity (IC₅₀ 4.9 µg/mL and
277 12.27 µg/mL respectively) against the breast tumor lines (MDA-MB-468) [45]. The
278 dichloromethane extract from the leaves of *Piper umbellatum*, showed potent antiproliferative
279 activity with inhibition of the growth of six tumor cell lines UACC-62 (TGI = 6.8 µg/mL);
280 U251 (TGI = 8.2 µg/mL), PC-3 (TGI = 8.2 µg/mL); OVCAR-3 (TGI = 8.3 µg/mL, MCF-7
281 (TGI = 9.3 µg/mL) and 786-0 (TGI = 9.1 µg/mL) and also reduced the growth of Ehrlich solid
282 tumor 38.7 and 52.2% at doses of 200 and 400 mg/kg, respectively [46]. Piperdardine, isolated
283 from *Macropiper excelsum* (Piperaceae) was active against tumor cell lines of colon cancer (HT
284 29), with IC₅₀ = 14 µM [47]. There are no reports in the literature about the antiproliferative
285 activity of *P. amalago*.

286

287

288

289

290

291 **Table 2:** Antiproliferative activity of MEPA and Dox against ten human cancer cell lines.

Cells lines	<u>MEPA</u>		<u>Dox</u>	
	<u>GI₅₀</u>	<u>TGI</u>	<u>GI₅₀</u>	<u>TGI</u>
U251 (Glioma)	57.77	>100	0.05	0.15
MCF7 (Breast)	40.60	>100	0.45	0.79
NCI-ADR/RES (Ovarian resistant)	37.56	-	0.69	26.0
786-0 (Kidney)	34.34	>100	0.06	26.0
NCI-H460 (Lung)	37.56	>100	0	0.37
HT29 (Colon)	34.75	92.64	0.07	2.47
K-562 (Leukemia)	15.32	>100	0.06	26.0
HaCaT (Keratinocyte)	50.4	>100	0.13	1.24
PC-3 (Prostate)	4.34	64.72	0.09	0.72
OVCAR-3 (Ovarian)	9.44	>100	0.13	1.24

292 Methanolic extract of *P. amalago* (MEPA); Dox (doxorubicin); GI₅₀ (growth inhibitory activity) and TGI
 293 (cytostatic activity) values were determined by nonlinear regression analysis using ORIGIN 8.0 (OriginLab
 294 Corporation). Values in µg/mL.

295 - not determined

296

297 *3.4 Acute toxicity.* The assessment of acute toxicity was conducted for 14 days to determine
 298 the maximum tolerated dose (MTD). The animals used in this study were exposed to CFPA and
 299 were not observed clinical signs of toxicity in doses or significant changes related to drinking
 300 water and food between the control group and any of the treated groups. No deaths have been
 301 reported. Furthermore, the relative and absolute weight of the organs (liver, kidneys, and lungs)
 302 showed no difference compared to control group.

303

304 *3.5 Lipinski's Rule of Five.* Through computational study, we analyzed the oral bioavailability
 305 of **PA-2** compound, this analysis is of great importance to discover new chemical entities that
 306 resemble the most of existing drugs as regards the physicochemical and biological properties.
 307 The drug-likeness concept helps optimize the pharmacokinetic properties of a compound, such
 308 as absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) in the human body [48]. These
 309 parameters were provisionally assessed using theoretical calculations following *Lipinski's Rule*
 310 *of Five*, which states that the absorption or penetration of a compound orally administered is
 311 effective if the drug meets the established criteria: molecular weight (MW) ≤500, calculation
 312 of log P ≤5, the hydrogen bond donor (HBD) ≤5 and hydrogen bond acceptors (HBA) ≤10.
 313 Molecules that violate more than one of these rules may have problems with bioavailability. The
 314 **PA-2** compound showed molecular weight (MW = 299.37) HBD number (nOHNH = 0), HBA
 315 (n-ON = 4), revealing good lipophilicity due to the value of log P = 3.32, all these values are
 316 consistent with Lipinski's rules, suggesting that these compounds have no problems with oral
 317 bioavailability. The calculated percent absorption (% ABS = 95.63) of the compound indicates
 318 a good cell membrane permeability. Other rules include: the number of rotatable bonds

319 (indicating the flexibility of the molecule); the volume and area polar surface topological
320 (TPSA). TPSA values below 140 \AA^2 indicate a good absorption of the drug in the intestine and
321 A2 values below 60 \AA^2 indicate good penetration of the blood-brain barrier. **PA-2** presented the
322 computational TPSA value of 38.77 \AA^2 indicating a good intestinal absorption and adequate
323 penetration of the blood-brain barrier. The empirical conditions to satisfy Lipinski's rule and
324 show a good oral bioavailability involve a balance between the solubility of a compound and
325 its ability to passively diffuse through the various biological barriers. Compounds with high
326 solubility are easily metabolized and eliminated from the body, thus resulting in a lower
327 probability of adverse effects and bioaccumulation. Thus, the compound showed good
328 solubility analysis ($\log S = -3.52$) because reference value is within the optimum between -1
329 and -5. This value encourages the use of **PA-2** as a precursor for developing new drug better
330 absorption, thereby reducing undesirable effects.

331 **4. Conclusions**

332 This is the first report of anti-tuberculosis and anti-proliferative activities of methanolic extract
333 and the isolated chemical constituents of the of *Piper amalago* L. leaves. Our study showed
334 moderate anti-mycobacterial activity of CFPA and potent antiproliferative activity of the
335 EMPA. The *in silico* analysis showed that **PA-2** compound follows the rules established by
336 *Lipinski*, suggesting that this compound has no problems with oral bioavailability, and indicates
337 good permeability in cell plasma membrane. Studies are now in progress for evaluated of
338 antiproliferative activity of the PA-2 especially against cells of PC-3 and OVCAR-3 cells and
339 also isolated and characterize others constituents present in CFPA that could account for the
340 reported pharmacological effects.

341 **Conflict of Interests**

342 The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.
343

344 **Acknowledgments**

345 We are grateful to CNPq for providing financial support (564506/2010-9), to FUNDECT
346 (0001/12), to CAPES and UFGD. In addition, we are grateful to Dr^a. Zefa Valdevina Pereira
347 for the botanical identification of plant material.

348

349 **References**

- 350 [1] WHO, "Global Tuberculosis Report," in *World Health Organization* pp. 1-155, Geneva:
351 2014.
- 352 [2] N.R. Gandhi, P. Nunn, K. Dheda, et al. "Multidrug-resistant and extensively drug-
353 resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis," *Lancet*, vol. 375, no. 9728, pp.
354 1830-1843, 2010.
- 355 [3] Z. Ma, C. Lienhardt, H. McIlleron, A.J. Nunn, and X. Wang. "Global tuberculosis drug
356 development pipeline: the need and the reality," *Lancet*, vol. 375, no. 9731, pp. 2100-2109,
357 2010.
- 358 [4] A. Koul, E. Arnoult, N. Lounis, J. Guillemont, and K. Andries. "The challenge of new
359 drug discovery for tuberculosis," *Nature*, vol. 469, no. 7331, pp. 483-490, 2011.
- 360 [5] O.M. Sieber, K. Heinemann, and I.P. Tomlinson. "Genomic instability--the engine of
361 tumorigenesis?," *Nat Rev Cancer*, vol. 3, no. 9, pp. 701-708, 2003.
- 362 [6] G.C. Jagetia, P. Venkatesh, and M.S. Baliga. "*Aegle marmelos* (L.) Correa inhibits the
363 proliferation of transplanted Ehrlich ascites carcinoma in mice," *Biol Pharm Bull*, vol. 28, no.
364 1, pp. 58-64, 2005.
- 365 [7] D.J. Newman and G.M. Cragg. "Natural products as sources of new drugs over the last
366 25 years," *J Nat Prod*, vol. 70, no. 3, pp. 461-477, 2007.
- 367 [8] L.A. Dyer and A.D.N. Palmer, "*Piper*: a model genus for studies of phytochemistry,
368 ecology, and evolution," in *Kluwer Academic/Plenum*: New York, NY, USA: 2004.
- 369 [9] Y.-H. Wang, S.L. Morris-Natschke, J. Yang, H.-M. Niu, C.-L. Long, and K.-H. Lee.
370 "Anticancer Principles from Medicinal *Piper* (胡椒 Hú Jiāo) Plants," *Journal of Traditional*
371 *and Complementary Medicine*, vol. 4, no. 1, pp. 8-16, 2014.
- 372 [10] V.S. Parmar, S.C. Jain, K.S. Bisht, et al. "Phytochemistry of the genus *Piper*,"
373 *Phytochemistry*, vol. 46, no. 4, pp. 597-673, 1997.
- 374 [11] G.L. Pessini, B.P. Dias Filho, C.V. Nakamura, and D.A.G. Cortez. "Antibacterial
375 activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.)
376 Yunck," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 98, pp. 1115-1120, 2003.
- 377 [12] J.W. Bertol, P.R. Santos, J. Rodrigues, et al. "Antiviral activity of fractions from leaves
378 of *Piper regnellii* var. *pallescens*," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 22, pp. 1276-1281,
379 2012.
- 380 [13] G.L. Pessini, B.P. Dias Filho, C.V. Nakamura, and D.A.G. Cortez. "Antifungal activity
381 of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.)
382 Yunck," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 16, pp. 1130-1133, 2005.

- 383 [14] A.A. Morandim-Giannetti, A.R. Pin, N.A.S. Pietro, et al. "Composition and antifungal
384 activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus*
385 *neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species," *Journal of Medicinal*
386 *Plants Research*, vol. 4, no. 17, pp. 1810-1814, 2010.
- 387 [15] A. Cáceres, S.M. Cruz, I. Gaitán, K. Guerrero, L.E. Álvarez, and M.N. Marroquín,
388 "Antioxidant activity and quantitative composition of extracts of *Piper* species from Guatemala
389 with potential use in natural product industry," in *Acta Horticulturae*, pp. 77-84: 2012.
- 390 [16] P.S. Luize, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias Filho, D.A. Cortez, and C.V. Nakamura.
391 "Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.)
392 YUNCK against *Trypanosoma cruzi*," *Biol Pharm Bull*, vol. 29, no. 10, pp. 2126-2130, 2006.
- 393 [17] V.S. Carrara, S.C. Vieira, R.G. de Paula, et al. "In vitro schistosomicidal effects of
394 aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of *Piper* species and the isolation
395 of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae)," *J Helminthol*, vol. 88, no. 3, pp. 321-326,
396 2014.
- 397 [18] S. Novaes Ada, J. da Silva Mota, A. Barison, et al. "Diuretic and antilithiasic activities
398 of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae)," *Phytomedicine*, vol. 21, no. 4, pp. 523-
399 528, 2014.
- 400 [19] T.B.L. Prando, T.d.F. Baciquete, J.A.C. Vieira, et al. "Amides from *Piper* as a Diuretic:
401 Behind the Ethnopharmacological Uses of *Piper glabratum* Kunth," *Evidence-Based*
402 *Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, Article ID 615109, p. 5, 2014.
- 403 [20] R.B.L. Scodro, C.T.A. Pires, V.S. Carrara, et al. "Anti-tuberculosis neolignans from
404 *Piper regnellii*," *Phytomedicine*, vol. 20, no. 7, pp. 600-604, 2013.
- 405 [21] S. Chen, M.J. Cheng, C.C. Wu, et al. "Three new phenylpropanoids from the roots of
406 *Piper taiwanense* and their inhibitory activities on platelet aggregation and *Mycobacterium*
407 *tuberculosis*," *Chem Biodivers*, vol. 11, no. 5, pp. 792-799, 2014.
- 408 [22] G.B. Longato, L.Y. Rizzo, I.M. Sousa, et al. "In vitro and in vivo anticancer activity of
409 extracts, fractions, and eupomatenoid-5 obtained from *Piper regnellii* leaves," *Planta Med*, vol.
410 77, no. 13, pp. 1482-1488, 2011.
- 411 [23] L.H. Iwamoto, D.B. Vendramini-Costa, P.A. Monteiro, et al. "Anticancer and Anti-
412 Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L.
413 Leaves," *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, vol. 2015, p.
414 948737, 2015.
- 415 [24] H. Achenbach, J. Gross, and J. Portecop. "Ishwarol, the main Sesquiterpene in *Piper*
416 *amalago*," *Planta Med*, vol. 50, no. 6, pp. 528-529, 1984.

- 417 [25] V.D. Carrara, A. de Souza, B.P. Dias, et al. "Chemical Composition and Antifungal
418 Activity of the Essential Oil from *Piper amalago* L.," *Latin American Journal of Pharmacy*,
419 *vol. 29*, no. 8, pp. 1459-1462, 2010.
- 420 [26] H. Achenbach, W. Fietz, J. Worth, R. Waibel, and J. Portecop. "Constituents of Tropical
421 Medicinal-Plants .19. Gc Ms-Investigations of the Constituents of *Piper amalago* - 30 New
422 Amides of the Piperine-Type," *Planta Medica*, no. 1, pp. 12-18, 1986.
- 423 [27] X.A. Domínguez, J.S. Verde, S. Sucar, and R. Treviño. "Two amides from *Piper*
424 *amalago*," *Phytochemistry*, *vol. 25*, no. 1, pp. 239-240, 1985.
- 425 [28] S.M. Cruz, A. Cáceres, L.E. Álvarez, M.A. Apel, and A.T. Henriques, "Chemical
426 diversity of essential oils of 15 *Piper* species from Guatemala," in *Acta Horticulturae*, pp. 39-
427 46: 2012.
- 428 [29] V.d.S. Carrara, E.F. Cunha-Júnior, E.C. Torres-Santos, et al. "Antileishmanial activity
429 of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs," *Revista Brasileira de Farmacognosia*,
430 *vol. 23*, pp. 447-454, 2013.
- 431 [30] J.J. Lopes, C. Marx, R. Ingrassia, J.N. Picada, P. Pereira, and B. Ferraz Ade.
432 "Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants
433 of *Piper* genus," *Exp Toxicol Pathol*, *vol. 64*, no. 1-2, pp. 9-14, 2012.
- 434 [31] A.C. Alécio, V.d.S. Bolzani, M.C.M. Young, M.J. Kato, and M. Furlan. "Antifungal
435 Amide from Leaves of *Piper hispidum*," *Journal of Natural Products*, *vol. 61*, no. 5, pp. 637-
436 639, 1998.
- 437 [32] V.d.S. Carrara, L.Z. Serra, L. Cardozo-Filho, E.F. Cunha-Júnior, E.C. Torres-Santos,
438 and D.A.G. Cortez. "HPLC Analysis of Supercritical Carbon Dioxide and Compressed Propane
439 Extracts from *Piper amalago* L. with Antileishmanial Activity," *Molecules*, *vol. 17*, no. 1, pp.
440 15-33, 2011.
- 441 [33] J.C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, and F. Portaels.
442 "Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug
443 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*," *Antimicrob Agents Chemother*, *vol. 46*, no. 8, pp.
444 2720-2722, 2002.
- 445 [34] F.R. Pavan, G.V. Poelhsitz, M.I. Barbosa, et al. "Ruthenium(II)
446 phosphine/diimine/picolinate complexes: inorganic compounds as agents against tuberculosis,"
447 *Eur J Med Chem*, *vol. 46*, no. 10, pp. 5099-5107, 2011.
- 448 [35] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, et al. "Feasibility of a high-flux anticancer drug
449 screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines," *J Natl Cancer Inst*, *vol. 83*,
450 no. 11, pp. 757-766, 1991.

- 451 [36] OECD, *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*. OECD
452 Publishing, 2008.
- 453 [37] ANVISA, "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.
454 2004", <http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelinlink.php?numlink=1-9-34-2004-03-16-90>.
- 455 [38] P. Ertl, "Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score.",
456 <http://www.molinspiration.com>.
- 457 [39] T. Sander, "Molecular Property Explorer.", <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo>.
- 459 [40] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, and P.J. Feeney. "Experimental and
460 computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and
461 development settings," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 46, no. 1-3, pp. 3-26, 2001.
- 462 [41] M.J. Kato and M. Furlan. "Chemistry and evolution of the Piperaceae," *Pure and*
463 *Applied Chemistry*, vol. 79, no. 4, pp. 529-538, 2007.
- 464 [42] S.G. Franzblau, R.S. Witzig, J.C. McLaughlin, et al. "Rapid, low-technology MIC
465 determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate
466 Alamar Blue assay," *J Clin Microbiol*, vol. 36, no. 2, pp. 362-366, 1998.
- 467 [43] L. Collins and S.G. Franzblau. "Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460
468 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and
469 *Mycobacterium avium*," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 41, no. 5, pp. 1004-1009, 1997.
- 470 [44] K. Hussain, Z. Ismail, A. Sadikun, and P. Ibrahim. "Antioxidant, anti-TB activities,
471 phenolic and amide contents of standardised extracts of *Piper sarmentosum* Roxb," *Nat Prod*
472 *Res*, vol. 23, no. 3, pp. 238-249, 2009.
- 473 [45] S. Sriwiriyanjan, T. Ninpesh, Y. Sukpondma, T. Nasomyon, and P. Graidist.
474 "Cytotoxicity screening of plants of genus *Piper* in breast cancer cell lines," *Tropical Journal*
475 *of Pharmaceutical Research*, vol. 13, no. 6, pp. 921-928, 2014.
- 476 [46] L.H. Iwamoto, D. Vendramini-Costa, et al. "Anticancer and Anti-Inflammatory
477 Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves,"
478 *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, Article ID 948737, p. 8,
479 2015.
- 480 [47] J. Lei, E.J. Burgess, A.T.B. Richardson, et al. "Cytotoxic Amides from Fruits of
481 Kawakawa, *Macropiper excelsum* *," *Planta Medica*, 2015.
- 482 [48] G. Vistoli, A. Pedretti, and B. Testa. "Assessing drug-likeness – what are we missing?,"
483 *Drug Discovery Today*, vol. 13, no. 7–8, pp. 285-294, 2008.

6. MANUSCRITO 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

Chemical and Pharmaceutical Bulletin

ISSN: 0009-2363

Qualis: B2 - Medicina II

Manuscrito submetido

Para mais informações acesse: http://cpb.pharm.or.jp/document/inst_e.pdf

Synthesis, *in vitro* antiproliferative and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activities of novel β -carboline derivatives

Flora Martinez Figueira Moreira^a, Julio Croda^a, Maria Helena Sarragiotto^b, Mary Ann Foglio^c,
Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz^c, João Ernesto de Carvalho^c and Anelise Samara Nazari
Formagio^{d*}

^a*Faculdade de Ciências as Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia
Dourados - Itahum, Km 12, Dourados, 79.804-970 MS, Brazil*

^b*Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790 -
Jardim Universitário, Maringá, 87020-900 PR, Brazil*

^c*Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade
Estadual de Campinas, 6171, Campinas, 13083-970 SP, Brazil*

^d*Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia
Dourados - Itahum, Km 12, Dourados, 79.804-970 MS, Brazil*

* Corresponding author. Tel.: +55-67-3410-2426; e-mail: aneliseformagio@ufgd.edu.br (A.S.N. Formagio)

30 A series of β -carboline derivatives with amino (2a-c; 3a-c) or guanidinium (4a-c) group-
31 terminal side chains at C-3 were synthesized and evaluated for *in vitro* anti-*Mycobacterium*
32 *tuberculosis* and antiproliferative activities against nine human cancer cell lines. Antimycobacterial
33 activity was evaluated using resazurin microtiter assay (REMA), and antiproliferative activity was measured according to NCI standard
34 protocol. Of the compounds with amino group-terminated side chains at C-3, compounds **2a** (24.9
35 $\mu\text{g/mL}$) and **2b** (26.9 $\mu\text{g/mL}$), which had phenyl and p-methoxyphenyl at position 1,
36 respectively, were the most active against *M. tuberculosis* (MTB). Compounds **2a** and **3b**,
37 which had the same substituted groups, inhibited the growth of all human tumor cell lines with
38 GI_{50} values from 1.37 to 12.20 μM . Also in this series, compounds **2c**, **3a** and **3c** demonstrated
39 significant activity against multiple drug-resistant ovarian cancer cells cell lines (NCI / ADR).
40 Among compounds with a terminal guanidine group, compounds **4a** (27.8 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and **4c**
41 (37.4 $\mu\text{g/mL}$) demonstrated the greatest activity against MTB. Additionally, compounds **4b**
42 ($\text{GI}_{50} = 0.45 \mu\text{M}$; $\text{TGI} = 72.09 \mu\text{M}$) and **4c** ($\text{GI}_{50} = 1.71 \mu\text{M}$) effectively inhibited growth and
43 were highly selective against NCI/ADR.

44

45 **Key words** synthesis, β -carboline, *Mycobacterium tuberculosis*, anti-mycobacterial,
46 antiproliferative activity

47

48

49 Introduction

50 Tuberculosis (TB) exhibits high morbidity and mortality. The long-term treatment regimen
51 can cause patients to be non-compliant in completing the treatment, thus leading to emergence
52 of multidrug-resistant (MDR-TB) and extensively drug-resistant (XDR-TB) TB strains.
53 Infections caused by MDR-TB and XDR-TB do not respond to first-line drugs that are used to
54 treat TB, and alternative treatment regimens include mostly injected drugs and prolonged
55 treatments.^{1, 2)}

56 Due to the appearance of resistant strains and given high toxicity of anti-tuberculosis drugs,
57 to the need to develop new drugs that are more effective and less toxic than current drugs, which
58 would reduce time and complexity of treatment is urgent.^{3, 4)} The discovery of new drugs is also
59 necessary for the treatment of cancer, because most chemotherapeutic agents exhibit severe
60 toxicity and cause many undesirable side effects; additionally, current agents are very
61 expensive, mutagenic, carcinogenic and teratogenic.⁵⁾

62 Synthetic β -carboline derivatives exhibit a wide range of pharmacological activities,
63 including anti-tumor and anti-tuberculosis activities.⁶⁻¹³⁾ This β -carboline alkaloids are
64 aromatic, heterocyclic organic compounds that contain an indole fused with a pyridine ring.

65 Our research group demonstrated that β -carboline derivatives with various substituents at
66 positions-1, 3 and 9 of the β -carboline skeleton presented significant *in vitro* antitumoral,
67 antiviral, antitrypanosomal and antileishmanial activities.¹⁴⁻²¹⁾ Other studies have shown that β -
68 carboline derivatives with a methyl-substituted group at position-1 and a guanidinium group-
69 terminated side chain at C-3 exhibited anti-HIV-1 activity in MT4 cells by hindering the
70 essential interaction of the regulatory protein Tat with trans-activation response region
71 (TAR).^{22, 23)} This led us to study novel β -carboline analogs that might serve as antitumoral and
72 anti-tuberculosis agents as part of our ongoing research program.

73 Based on the idea that the addition of appropriate substituents at positions-1 and -3 might
74 result in more potent compounds, we synthesized a novel 1-substituted-phenyl- β -carboline with
75 an amino or guanidinium group-terminated side chain at C-3 and evaluated the *in vitro* anti-
76 tuberculosis and antitumoral properties. The expectation was that incorporation of these
77 substituents might improve the anti-tuberculosis and antitumoral activities of β -carboline.

78

79 **Experimental**

80 **Chemistry**

81 ¹H and ¹³C spectra were recorded on a Varian spectrometer model Mercury Plus BB at 300
82 MHz and 75 MHz, respectively. Mass spectra (MS) were recorded on a Thermoelectron
83 Corporation Focus-DSQ II spectrometer. IR spectra were obtained on a BOMEM spectrometer
84 model MB-100. All reagents were purchased from commercial suppliers. The reactions were
85 monitored by thin layer chromatography conducted on Merck TLC plates (Silica Gel 60 F254).

86

87 **General**

88 Synthesis and spectral characterization of the compounds (1a-c) were described in previous
89 work ²¹⁾. The 1-(substituted-phenyl)- β -carboline-3-ethylamine-carboxamide (2a-c) were
90 obtained by reaction of the methyl esters 1a-c (2.0 mmol) with 1,2-ethylenediamine (6 mL) at
91 room temperature. The mixture was stirred for 36 h. The formed solids were collected by
92 filtration. The 1-(substituted-phenyl)- β -carboline-3-propylamine-carboxamide (3a-c) were
93 obtained by reaction of the methyl esters 1a-c (1.7 mmol) with 1,3-propanediamine (5 mmol)
94 in 25 mL MeOH/CHCl₃ was refluxed for 32 h. The formed solids were collected by filtration.
95 The preparation 1-(substituted-phenyl)- β -carboline-3-ethylguanidine-carboxamide (4a-c): to a

96 solution of S-methylisothiourea sulfate (0.5 mmol) in water (1.5 mL) and 2N NaOH (0.5 mL)
97 was added to 0 °C, a suspension of β -carboline-3-ethylamine-carboxamide (2a-c). The mixture
98 was kept under stirring, at room temperature by 1 h and later under reflux for 24 h. Was again
99 added a solution of S-methylisothiourea sulfate (0.5 mmol) in water (1.5 mL) and 2N NaOH
100 (0.5 mL) and reflux for 24 h. The formed solids were collected by filtration and washed with
101 cold water.

102 Compound 2a: yield: 68%. mp: 171-174. IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1623 cm⁻¹ (C=O), 3230 -
103 3347 (NH₂; OH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 3.07 (t, J = 6.0 Hz; 2H, H-2''); 3.69 (t, J =
104 6.0 Hz; 2H, 1''); 7.34 (m; 1H, H-6); 7.52-7.66 (m, 4H, Ar-H); 7.56 (d, J = 7.8 Hz; 1H, H-8);
105 8.01 (dd, J = 6.6 and 3.0 Hz; 1H, H-7); 8.04 (dd, J = 6.0 and 2.1 Hz; 1H, H-4'); 8.21 (d, J = 7.8
106 Hz; 1H, H-5); 8.82 (s, 1H, H-4). δ_{C} ¹³C NMR (CD₃OD): 41.2, 41.5, 112.2, 113.5, 120.6, 121.8,
107 121.9, 128.4, 128.7, 128.8, 128.9, 129.1, 129.2, 130.4, 135.0, 137.8, 139.1, 141.4, 167.1.

108 Compound 2b: yield: 74%. mp: 180-182. IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1636 cm⁻¹ (C=O), 3300
109 (NH₂). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 2.84 (t, J = 6.0 Hz; 2H, 1''); 3.87 (t, J = 6.0 Hz; 2H,
110 H-1''); 3.95 (s, 3H, OCH₃); 7.17 (d, J = 8.5 Hz; 2H, H-3'/5'), 7.36 (ddd, J = 7.8; 7.5 and 2.1
111 Hz; 1H, H-6); 7.58 (d, J = 7.5 Hz; 1H, H-8), 7.61 (ddd, J = 7.8; 7.5 and 2.1 Hz; 1H, H-7); 8.02
112 (d, J = 8.5 Hz; 2H, H-2'/6'), 8.24 (d, J = 7.8 Hz; 1H, H-5). δ_{C} ¹³C NMR (CD₃OD): 37.6, 39.3,
113 55.4, 113.1, 114.6, 115.1, 121.0, 122.4, 122.8, 130.8, 131.6, 132.3, 132.9, 133.6, 139.5, 141.9,
114 142.0, 144.3, 162.5.

115 Compound 2c: yield: 66%. mp: 172-175. IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1636 cm⁻¹ (C=O), 2932-2465
116 (OH, NH₂). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 2.77 (t, J = 6.0 Hz; 2H, H-2''); 3.40 (t, J = 6.0
117 Hz; 2H, H-1''); 3.82 (s, 3H, OCH₃); 7.03 (d, J = 7.5 Hz; 1H, H-8); 7.29 (t, J = 7.5 Hz; 1H, H-
118 6); 7.54 (dd, J = 8.5 and 2.1 Hz; 1H, H-6'); 7.57 (ddd, J = 7.5, 7.5 and 2.5 Hz; 1H, H-7); 7.65
119 (d, J = 2.1 Hz; 1H, H-2'); 7.68 (d, J = 8.5 Hz; 1H, H-5'); 8.38 (d, J = 7.5 Hz; 1H, H-5); 8.74
120 (s, 1H, H-4). δ_{C} ¹³C NMR (CD₃OD): 41.6, 42.0, 56.1, 112.5, 113.1, 113.2, 116.0, 120.5, 121.7,
121 121.9, 122.4, 128.8, 129.1, 130.0, 134.3, 140.0, 141.5, 141.8, 148.1, 148.2, 165.6.

122 Compound 3a: yield: 72%. mp: 180-182. IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1633 cm⁻¹ (C=O); 3300
123 (NH₂). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 1.67 (qt, J = 6.5 Hz; 2H, H-2''); 2.65 (t, J = 6.5 Hz;
124 2H, H-3''); 3.37 (t, J = 6.0 Hz; 2H, H-1''); 7.30 (t, J = 7.2 Hz; 1H, H-6); 7.53 – 7.69 (m, 5H,
125 H-7/H-8/H-3'/H-4'/H-5'); 8.17 (m, 2H, H-2'/H-6'); 8.41 (d, J = 7.5 Hz; 1H, H-5); 8.81 (s, 1H,
126 H-4); δ_{C} ¹³C NMR (CD₃OD): 32.1, 36.6, 36.8, 112.8, 113.0, 120.3, 121.3, 122.0, 128.3, 128.6,
127 128.7, 128.8, 128.9, 130.0, 139.6, 139.9, 140.7, 141.7, 164.3.

128 Compound 3b: yield: 60%. mp: 188-193 IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1669 cm⁻¹ (C=O); 3411-3363
129 (NH₂); 2956 (NH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 1.69 (qt, $J = 6.6$ Hz; 2H, H-2''); 2.64 (t, J
130 = 6.6 Hz; 2H, H-3''). 3.44 (q, $J = 6.6$ Hz; 2H, H-1''); 3.88 (s, 3H, OCH₃); 7.18 (d, $J = 8.7$ Hz;
131 2H, H-3'/H-5'); 7.30 (t, $J = 7.8$ Hz; 1H, H-6); 7.58 (t, $J = 8.1$ Hz; 1H, H-7); 7.67 (d, $J = 8.1$ Hz;
132 1H, H-8); 8.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2'/H-6'); 8.38 (d, $J = 7.8$ Hz; 1H, H-5); 8.75 (s, 1H, H-
133 4). δ_{C} ¹³C NMR (CD₃OD): 33.0, 36.9, 37.0, 55.4, 112.3, 112.6, 114.2, 120.1, 121.3, 121.9,
134 128.4, 129.7, 130.0, 130.1, 133.9, 139.8, 140.4, 141.6, 159.9, 164.5.

135 Compound 3c: yield: 55%. mp: 178-180. IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1644 cm⁻¹ (C=O); 3357-2933
136 (NH₂; OH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 1.65 (qt, $J = 6.5$ Hz; 2H, H-2''); 2.65 (t, $J = 6.0$
137 Hz; 2H, H-3''); 3.46 (q, $J = 6.0$ Hz; 2H, H-1''); 3.93 (s, 3H, OCH₃); 7.01 (d, $J = 7.8$ Hz; 1H,
138 H-5'); 7.28 (dd, $J = 7.8$ and 2.1 Hz; 1H, H-6'); 7.33 (t, $J = 7.8$ Hz; 1H, H-6); 7.56 (m; 1H, H-
139 7); 7.64 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-2'); 7.68 (d, $J = 7.8$ Hz; 1H, H-8); 8.38 (d, $J = 7.8$ Hz; 1H, H-5);
140 8.73 (s, 1H, H-4). δ_{C} ¹³C NMR (CD₃OD): 32.8, 36.8, 37.0, 55.6, 112.1, 112.6, 112.7, 115.6,
141 120.0, 121.3, 121.5, 121.9, 128.4, 128.6, 129.5, 133.9, 139.7, 141.1, 141.4, 147.7, 147.8, 164.8.

142 Compound 4a: yield: 30%. mp: 176-178. IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1645 cm⁻¹ (C=O); 3465-3346
143 (NH₂; OH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 3.27 (t, $J = 6.5$ Hz; 2H, H-2''); 3.49 (t, $J = 6.5$
144 Hz; 2H, H-1''); 5.48 (s, 2H, NH₂); 6.22 (t, $J = 7.5$; 1H, NH); 7.40 (m; 1H, H-6); 7.56-7.68 (m,
145 4H, Ar-H); 7.60 (d, $J = 7.5$ Hz; 1H, H-8); 8.10 (dd, $J = 7.5$ and 2.5 Hz; 1H, H-7); 8.12 (dd, J
146 = 7.5 and 2.5 Hz; 1H, H-4'); 8.28 (d, $J = 8.1$ Hz; 1H, H-5); 8.80 (s, 1H, H-4). δ_{C} ¹³C NMR
147 (CD₃OD): 37.3, 40.5, 112.5, 113.8, 120.6, 121.8, 121.9, 128.4, 128.7, 128.8, 128.9, 129.0,
148 129.1, 131.5, 134.2, 136.7, 139.8, 142.5, 160.2, 168.4.

149 Compound 4b: yield: 45%. mp: 190-194. IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1648 cm⁻¹ (C=O); 3485-3357
150 (NH₂). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 3.25 (q, $J = 6.0$; 2H, H-2''). 3.45 (q, $J = 6.0$; 2H, H-
151 1''); 3.96 (s, 3H, OCH₃); 5.54 (s, 2H, NH₂); 6.18 (t, $J = 7.5$; 1H, NH); 7.22 (d, $J = 8.7$ Hz; 2H,
152 H-3'/H-5'); 7.34 (t, $J = 7.0$ Hz; 1H, H-6); 7.60 (t, $J = 7.5$ Hz; H-7); 7.70 (d, $J = 8.0$ Hz; H-8);
153 8.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2'/H-6'); 8.41 (d, $J = 8.1$ Hz; 1H, H-5); 8.78 (s, 1H, H-4); 8.84 (t, J
154 = 7.5; 1H, NH); 11.81 (s, 1H, NH). δ_{C} ¹³C NMR (CD₃OD): 38.6, 40.3, 55.4, 112.3, 112.6,
155 114.2, 120.8, 121.2, 121.9, 129.7, 129.9, 130.1, 133.8, 138.4, 139.6, 140.5, 141.5, 159.0, 159.9,
156 165.1.

157 Compound 4c: yield: 38%. mp: 192-194. IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1660 cm⁻¹ (C=O); 3460-3350
158 (NH₂). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 3.32 (q, $J = 6.5$; 2H, H-2''); 3.42 (q, $J = 6.5$; 2H, H-
159 1''); 3.84 (s, 3H, OCH₃); 5.50 (s, 2H, NH₂); 6.20 (t, $J = 7.0$; 1H, NH); 7.10 (d, $J = 7.5$ Hz; 1H,
160 H-8); 7.41 (t, $J = 7.5$ Hz; 1H, H-6); 7.60 (dd, $J = 7.5$ and 1.5 Hz; 1H, H-6'); 7.67 (ddd, $J = 7.5$,

161 7.5 and 1.5 Hz; 1H, H-7); 7.70 (d, $J = 1.5$ Hz; 1H, H-2'); 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz; 1H, H-5'); 8.35
162 (d, $J = 7.5$ Hz; 1H, H-5); 8.74 (s, 1H, H-4); 8.80 (t, $J = 7.0$; 1H, NH); 11.80 (sl, 1H, NH). δ_C
163 ^{13}C NMR (CD_3OD): 39.6, 40.4, 56.5, 112.8, 113.8, 114.2, 116.4, 121.0, 121.7, 121.8, 122.6,
164 128.8, 129.6, 130.8, 134.3, 140.4, 141.5, 141.8, 150.4, 152.2, 159.7, 165.6.

165

166 ***Anti-Mycobacterium tuberculosis* activity**

167 *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC27294) strains were grown in Ogawa–Kudoh (OK) medium
168 for 10 days at 37°C. For testing, aliquots were removed and cultured in Middlebrook 7H9 broth
169 (Difco) supplemented with oleic acid, bovine serum albumin, dextrose and catalase (OADC
170 enrichment BBL / Becton-Dickinson); 0.5% glycerol was added as a carbon source, and 0.5%
171 Tween 80 was added to prevent the appearance of lumps. The culture was maintained for 15
172 days at 37°C. The bacterial suspensions were prepared and adjusted to the n1° McFarland scale.

173 Stock solutions of the test compounds were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO)
174 (Sigma-Aldrich) and diluted in Middlebrook 7H9 broth (Difco) supplemented with OADC
175 enrichment BBL/Becton Dickinson. Rifampicin and Isoniazid were solubilized according to the
176 manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and used as positive
177 controls.

178 Anti-mycobacterial activity was determined using the Resazurin Microtiter Assay
179 (REMA).²⁴ Briefly, 100 μl of supplemented Middlebrook 7H9 broth (Difco) was dispensed
180 into each well of a sterile flat-bottom 96-well plate; then, serial dilutions of the test compounds
181 (0.98 to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and reference drugs (0.004 to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were prepared. One hundred
182 microliters of bacterial suspension (5×10^5 UFC/mL) was then added to each well. Plates were
183 incubated for 7 days at 37°C, after was added 30 μl of resazurin (Sigma-Aldrich) in sterile water
184 (0.01%) in whole plate, and the samples were incubated for 24 hours at 37°C.

185 The change in absorbance, at 492 nm wavelength, was measured using a microplate reader
186 TP-Reader (Thermo Plate®). Each compound was analyzed in triplicate on alternate days. The
187 MIC was defined as the lowest concentration that resulted in 90% inhibition of the growth of
188 *M. tuberculosis*.²⁵ MIC values were used to classify a compound's activity as follows: inactive,
189 >150 $\mu\text{g}/\text{mL}$; moderate, between > 10 and < 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; and active, < 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

190

191 ***In vitro* anticancer assay**

192 The tested compounds were evaluated *in vitro* against a nine-cell line panel comprising
193 melanoma UACC-62, breast MCF7, lung NCI-460, leukemia K-562, ovarian OVCAR, prostate
194 PCO-3, colon HT29, renal 786-0 and adriamycin drug-resistant ovarian cancer NCI/ADR cells.

195 The tests were performed using the colorimetric method with sulforhodamine B according to
196 the NCI standard protocol; doxorubicin was used as a positive control.²⁶⁾ Assays were
197 performed in a 96-well plate using four serial 10-fold dilutions (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for
198 each test compound. The anticancer activity was determined based on concentration-response
199 curves, and three concentration response parameters (GI_{50} , TGI and LC_{50}) were calculated. The
200 response parameter GI_{50} (growth inhibitory activity) refers to the drug concentration that
201 produces 50% reduction of cell growth when compared to untreated control cells. The TGI
202 (growth inhibition) and LC_{50} (cytotoxic activity) parameters refer to the drug concentrations
203 required for total growth inhibition and for 50% cell mortality, respectively. Compounds with
204 GI_{50} values $< 100 \mu\text{M}$ were considered active.

205

206 **Results and Discussion**

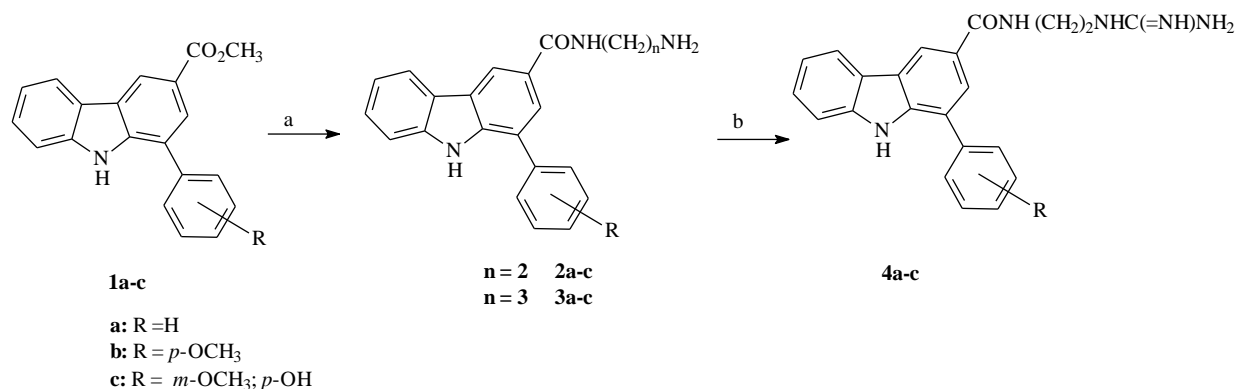
207 **Synthesis**

208 The synthetic pathway for the preparation of 1,3-disubstituted β -carbolines is presented in
209 **Scheme 1**. The methyl esters in **1a-c** were prepared by a Pictet–Spengler condensation of L-
210 tryptophan with the appropriate aromatic aldehydes in acidic media, subsequent esterification
211 of the resulting carboxylic acids with methanol and sulfuric acid, and oxidation with sulfur in
212 refluxing xylene ²¹⁾. Compounds **2a-c** and **3a-c** were obtained by the reaction of β -carboline
213 methyl ester with 1,2-ethylenediamine and 1,3-propanediamine, respectively, and resulted in
214 an amino group-terminated side chain at C-3. Finally, the coupling of β -carboline carboxamide
215 derivatives (**2a-c**) with S-methylisothiourea yielded compounds **4a-c**, which include a terminal
216 guanidinium group.

217 The novel compounds **2a-c**, **3a-c** and **4a-c** were characterized using IR, ^1H and ^{13}C NMR
218 spectroscopy, as detailed in the Experimental Section. The ^1H NMR spectra of carboxamides
219 **2a-c** and **3a-c** showed additional signals at δ_{H} 1.69 - 3.87 (reflecting the integration of two
220 protons) and at δ_{H} 7.01 – 8.84 (corresponding to methylene and aromatic hydrogens). The
221 presence of the carboxamide group was confirmed by ^{13}C NMR, which showed signals at δ_{C}
222 32.1 – 41.5 (CH_2) and δ_{C} 162.5 – 168.4 ($\text{C}=\text{O}\text{N}$). Derivatives **4a-c** was characterized by the
223 presence of an additional signal at δ_{C} 159.7 – 160.2, corresponding to the guanidinium group.

224

225



226

227

228

229 **Scheme 1.** Synthetic route for the preparation of the β -carbolines derivatives. Reagents and
 230 conditions: (a) 1,2-ethylenediamine, rt, 36 h and/or 1,3-propanediamine, CHCl₃/MeOH, reflux,
 231 32 h, 55-72%; (b) S-methylisothiurea, 2N NaOH, 4 °C to rt, reflux, 48 h, 30-45%.

232

233

Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity (MTB)

234 Derivatives **2a-c**, **3a-c** and **4a-c** were evaluated *in vitro* for their anti-mycobacterial activity
 235 against *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) using the REMA method²⁴⁾. The MIC values
 236 ($\mu\text{g/mL}$ and μM) were measured with respect to two standard antitubercular drugs, isoniazid
 237 (INH) and rifampicin (RFP), and the screening results are presented in **Table 1**. Among the
 238 nine compounds evaluated against MTB, seven presented moderate activity, with MIC values
 239 ranging from 58.3 to 24.9 $\mu\text{g/mL}$; in particular, compounds **2a** (24.9 $\mu\text{g/mL}$), **2b** (26.9 $\mu\text{g/mL}$),
 240 **4a** (27.8 $\mu\text{g/mL}$) and **4c** (37.4 $\mu\text{g/mL}$) presented interesting activity. Compounds **2a** and **2b**,
 241 which had phenyl and *p*-methoxyphenyl substituents, respectively, at position 1 and
 242 ethylenediamine moieties at C-3 were the most active derivatives in this series. The length of
 243 the terminated side chains affected the activities of these compounds. Substituting the
 244 guanidinium group led to reduced activity (compare compounds **2a** and **4a**). The effect of the
 245 guanidinium group was particularly significant when comparing compounds **2c** (57.9 $\mu\text{g/mL}$)
 246 and **4c** (37.4 $\mu\text{g/mL}$). The substituents at positions 1 and 3 strongly affected anti-MTB activities
 247 of these compounds.

248 Synthesis and molecular modeling study showed that aminopyrimidine derivatives exhibit
 249 moderate to potent antitubercular activity against *M. tuberculosis*, with MIC values ranging
 250 from 12.5 to 3.12 $\mu\text{g/mL}$.²⁷⁾ The introduction of an ethylguanidinium group at the upper rim
 251 resulted in high anti-mycobacterial activities for the unsubstituted, 5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridyl
 252 and 4,4'-dimethyl-2,2'-bithiazolyl analogs, with MIC values of 1.51 and 2.69 $\mu\text{g/mL}$,

253 respectively, values that were similar to those of current commercially available anti-
254 tuberculosis agents.²⁸⁾

255

256 **Table 1:** Anti-*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇RV activity of compounds **2a-c**, **3a-c** and **4a-**

257

c.			
Compound	R	n	MIC^a µg/mL (µM)
2a	H	2	24.9 (75.4)
2b	<i>p</i> -OCH ₃	2	26.9 (74.6)
2c	<i>m</i> -OCH ₃ ; <i>p</i> -OH	2	57.9 (153.5)
3a	H	3	>250 (>500)
3b	<i>p</i> -OCH ₃	3	58.3 (155.7)
3c	<i>m</i> -OCH ₃ ; <i>p</i> -OH	3	>250 (>500)
4a	H	2	27.8 (74.4)
4b	<i>p</i> -OCH ₃	2	57.5 (142.6)
4c	<i>m</i> -OCH ₃ ; <i>p</i> -OH	2	37.4 (88.3)
Isoniazid	-	-	0.05 (0.3)
Rifampicin	-	-	0.01 (0.01)

258

^a REMA assay. Values quoted are the means of results for triplicate samples.

259

260

Antiproliferative activity

261

262

263

264

265

266

267

268

269

The antiproliferative activities of the synthesized 1,3-disubstituted β -carbolines derivatives (**2a-c**, **3a-c** and **4a-c**) were evaluated *in vitro* against nine human tumor cell lines. The results for compounds **2a-c** and **3a-c**, which were amino group-terminated at C-3, demonstrated that compounds **2a** and **3b**, with phenyl and *p*-methoxyphenyl groups, respectively, at position 1, inhibited growth in all human tumor cell lines with GI₅₀ values ranging from 1.37 to 12.20 μ M. Also in this series, compounds **2c** (GI₅₀ = 2.42 μ M, TGI = 79.13 μ M), **3a** (GI₅₀ = 0.33 μ M, TGI = 50.28 μ M) and **3c** (GI₅₀ = 0.71 μ M, TGI = 11.08, LC₅₀ = 26.62 μ M) showed significant activity and high selectivity against adriamycin drug-resistant ovarian cancer cells (NCI/ADR) (**Tables 2** and **3**).

270

271

272

273

274

The compounds with terminal guanidinium groups, including compounds **4b** (GI₅₀ = 0.45 μ M; TGI = 72.09 μ M) and **4c** (GI₅₀ = 1.71 μ M), effectively inhibited growth and were highly selective against adriamycin drug-resistant ovarian cancer cell lines (NCI/ADR) when compared with compounds **2a-c**, which are amino group-terminated. However, the guanidinium-terminated compounds did not demonstrate any important interaction that could

275 account for the cell growth inhibition. Substituting the phenyl group with electron-donating
276 substituents at position 1 influenced each series differently.

277 A previous study evaluated the *in vitro* anti-tumor activities of several benzenesulfonamide
278 derivatives with various substituted amino-guanidine groups. Compound 1-allyl-2-[4-
279 chlorophenylcarbamoyl]-2-methylthiobenzenesulfonyl]-3-(5-nitrofurfurylideneamino)
280 exhibited remarkable activity against 21 human tumor cell lines representing leukemia and
281 melanoma and lung, colon, ovarian, renal, prostate and breast cancers ($GI_{50} = 0.3\text{--}3.0 \mu\text{M}$).²⁹⁾
282

Table 2: *In vitro* cell growth inhibition of compounds **2a-c**, **3a-c** and **4a-c** against neoplastic cells.

Compounds	R	n	GI ₅₀ (in μM) ^b								
			UACC-62	MCF7	NCI-460	K-562	OVCAR	PCO-3	HT29	786-0	NCI/ADR
2a	H	2	5.15	9.55	9.64	2.93	12.20	8.69	4.27	9.64	8.18
2b	<i>p</i> -OCH ₃	2	38.75	44.49	44.49	53.07	17.14	*	>100	33.11	8.36
2c	<i>m</i> -OCH ₃ ; <i>p</i> -OH	2	10.34	11.72	88.26	>100	9.36	*	25.82	21.64	2.42
3a	H	3	25.14	16.19	13.59	13.01	22.75	23.57	23.57	18.71	0.33
3b	<i>p</i> -OCH ₃	3	9.66	6.98	7.35	5.20	7.09	2.39	9.02	4.40	1.37
3c	<i>m</i> -OCH ₃ ; <i>p</i> -OH	3	43.22	23.94	55.16	18.89	16.76	11.18	27.48	27.48	0.71
4a	H	2	>100	>100	-	-	>100	-	-	3.61	>100
4b	<i>p</i> -OCH ₃	2	95.93	35.46	27.17	63.41	39.94	15.54	75.64	63.41	0.45
4c	<i>m</i> -OCH ₃ ; <i>p</i> -OH	2	51.85	99.17	>100	31.03	87.51	91.82	25.02	31.03	1.71

^b Cell lines: Melanoma (UACC-62), Breast (MCF7), Lung (NCI-460), Leukemia (K-562), Ovarian (OVCAR), Prostate (PCO-3), Colon (HT29), Renal (786-0), Ovarian-resistant to adriamycin (NCI/ADR).

- not determined

* not tested

Table 3: TGI and LC₅₀ (in parentheses), of compounds **2a-c**, **3a-c** and **4a-c**.

Compounds	R	n	UACC-62	MCF7	NCI-460	K-562	OVCAR	PCO-3	HT29	786-0	NCI/ADR
			Melanoma	Breast	Lung	Leukemia	Ovarian	Prostate	Colon	Renal	Ovarian-resistant
2a	H	2	15.44 (37.5)	38.27	34.32	23.87	24.75 (51.7)	24.75 (74.42)	73.52	24.75 (64.37)	24.75
2b	<i>p</i> -OCH ₃	2	>100	>100	>100	>100	>100	*	>100	>100	26.45
2c	<i>m</i> -OCH ₃ ; <i>p</i> -OH	2	20.35 (70.93)	22.41 (43.42)	>100	44.27	19.33 (30.85)	*	>100	87.41	79.13
3a	H	3	-	42.55	-	36.01	-	>100	-	-	50.28
3b	<i>p</i> -OCH ₃	3	-	15.38 (32.8)	20.83 (51.25)	15.38 (37.3)	21.47 (46.84)	10.56 (35.2)	21.47 (49.15)	16.71 (46.84)	11.97 (28.94)
3c	<i>m</i> -OCH ₃ ; <i>p</i> -OH	3	>100	>100	-	>100	>100	43.09	>100	>100	11.08 (26.62)
4a	H	2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
4b	<i>p</i> -OCH ₃	2	-	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	72.09
4c	<i>m</i> -OCH ₃ ; <i>p</i> -OH	2	90.86	-	-	55.07	-	-	99.28	>100	>100

TGI: drug concentration required for total growth inhibition; LC₅₀: drug concentration required to kill 50% of cells.

TGI and LC₅₀: Values in μM .

- not determined

*not tested

283 Conclusion

284 Herein the presence of an amino or guanidinium group-terminated side chain at C-3 of a 1-
285 substituted-phenyl- β -carboline nucleus enhancing antitumor and anti-MTB activity is reported.
286 Compounds **2a**, **2b** and **4a** were the most active against *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC27294).
287 Eight compounds inhibited the cell growth of adriamycin drug-resistant ovarian cancer cell
288 lines (NCI/ADR) (GI₅₀ \leq 8.36 μ M), not including compound **4a**. Compound **2a** demonstrated
289 promising antitumor and anti-MTB activity and might represent a precursor for development
290 of new molecules. Further studies are required to explore the mechanism of action of these
291 compounds in detail.

292

293 Acknowledgments

294 We are grateful to CNPq for providing financial support (564506/2010-9), to FUNDECT
295 (0001/12), to CAPES and UFGD.

296

297 Conflicts of Interest

298 The authors declare that they have no competing interests.

299

300 References

- 301 1) WHO, *Global tuberculosis report*, 1-155, (2014).
- 302 2) Gandhi, N. R.; Nunn, P.; Dheda, K.; Schaaf, H. S.; Zignol, M.; van Soolingen, D.;
303 Jensen, P.; Bayona, J., *Lancet*, **375**, 1830-1843, (2010).
- 304 3) Ma, Z.; Lienhardt, C.; McIlleron, H.; Nunn, A. J.; Wang, X., *Lancet*, **375**, 2100-2109,
305 (2010).
- 306 4) Koul, A.; Arnoult, E.; Lounis, N.; Guillemont, J.; Andries, K., *Nature*, **469**, 483-490,
307 (2011).
- 308 5) Jagetia, G. C.; Venkatesh, P.; Baliga, M. S., *Biol Pharm Bull*, **28**, 58-64, (2005).
- 309 6) Ang, K. K.; Holmes, M. J.; Higa, T.; Hamann, M. T.; Kara, U. A., *Antimicrob Agents*
310 *Chemother*, **44**, 1645-1649, (2000).
- 311 7) Cao, R.; Chen, Q.; Hou, X.; Chen, H.; Guan, H.; Ma, Y.; Peng, W.; Xu, A., *Bioorg Med*
312 *Chem*, **12**, 4613-4623, (2004).
- 313 8) Cao, R.; Chen, H.; Peng, W.; Ma, Y.; Hou, X.; Guan, H.; Liu, X.; Xu, A., *Eur J Med*
314 *Chem*, **40**, 991-1001, (2005).
- 315 9) Cao, R.; Peng, W.; Chen, H.; Hou, X.; Guan, H.; Chen, Q.; Ma, Y.; Xu, A., *Eur J Med*
316 *Chem*, **40**, 249-257, (2005).
- 317 10) Wu, Q.; Cao, R.; Feng, M.; Guan, X.; Ma, C.; Liu, J.; Song, H.; Peng, W., *Eur J Med*
318 *Chem*, **44**, 533-540, (2009).
- 319 11) Wu, J.; Li, C.; Zhao, M.; Wang, W.; Wang, Y.; Peng, S., *Bioorg Med Chem*, **18**, 6220-
320 6229, (2010).
- 321 12) Begum, S.; Hassan, S. I.; Siddiqui, B. S., *Nat Prod Res*, **18**, 341-347, (2004).
- 322 13) Begum, S.; Ali, S. N.; Siddiqui, B. S., Antitubercular alkaloid. Google Patents: 2013.

- 323 14) Stefanello, T. F.; Panice, M. R.; Ueda-Nakamura, T.; Sarragiotto, M. H.; Auzely-Velty,
324 R.; Nakamura, C. V., *Antimicrob Agents Chemother*, **58**, 7112-7120, (2014).
- 325 15) Savariz, F. C.; Foglio, M. A.; Ruiz, A. L.; da Costa, W. F.; Silva Mde, M.; Santos, J. C.;
326 Figueiredo, I. M.; Meyer, E.; de Carvalho, J. E.; Sarragiotto, M. H., *Bioorg Med Chem*,
327 **22**, 6867-6875, (2014).
- 328 16) Savariz, F. C.; Foglio, M. A.; de Carvalho, J. E.; Ruiz, A. L.; Duarte, M. C.; da Rosa,
329 M. F.; Meyer, E.; Sarragiotto, M. H., *Molecules*, **17**, 6100-6113, (2012).
- 330 17) Barbosa, V. A.; Formagio, A. S.; Savariz, F. C.; Foglio, M. A.; Spindola, H. M.; de
331 Carvalho, J. E.; Meyer, E.; Sarragiotto, M. H., *Bioorg Med Chem*, **19**, 6400-6408,
332 (2011).
- 333 18) Savariz, F. C.; Formagio, A. S. N.; Barbosa, V. r. A.; Foglio, M. A.; Carvalho, J. o. E.
334 d.; Duarte, M. C. T.; Dias Filho, B. P.; Sarragiotto, M. H., *Journal of the Brazilian*
335 *Chemical Society*, **21**, 288-298, (2010).
- 336 19) Tonin, L. T.; Panice, M. R.; Nakamura, C. V.; Rocha, K. J.; dos Santos, A. O.; Ueda-
337 Nakamura, T.; da Costa, W. F.; Sarragiotto, M. H., *Biomed Pharmacother*, **64**, 386-389,
338 (2010).
- 339 20) Nazari Formagio, A. S.; Santos, P. R.; Zanolli, K.; Ueda-Nakamura, T.; Dusman Tonin,
340 L. T.; Nakamura, C. V.; Sarragiotto, M. H., *Eur J Med Chem*, **44**, 4695-4701, (2009).
- 341 21) Formagio, A. S.; Tonin, L. T.; Foglio, M. A.; Madjarof, C.; de Carvalho, J. E.; da Costa,
342 W. F.; Cardoso, F. P.; Sarragiotto, M. H., *Bioorg Med Chem*, **16**, 9660-9667, (2008).
- 343 22) Yu, X.; Lin, W.; Li, J.; Yang, M., *Bioorg Med Chem Lett*, **14**, 3127-3130, (2004).
- 344 23) Yu, X.; Lin, W.; Pang, R.; Yang, M., *Eur J Med Chem*, **40**, 831-839, (2005).
- 345 24) Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F.,
346 *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 2720-2722, (2002).
- 347 25) Pavan, F. R.; Poelhsitz, G. V.; Barbosa, M. I.; Leite, S. R.; Batista, A. A.; Ellena, J.;
348 Sato, L. S.; Franzblau, S. G.; Moreno, V.; Gambino, D.; Leite, C. Q., *Eur J Med Chem*,
349 **46**, 5099-5107, (2011).
- 350 26) Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.;
351 Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; et al., *J Natl Cancer Inst*, **83**, 757-766,
352 (1991).
- 353 27) Singh, N.; Pandey, S. K.; Anand, N.; Dwivedi, R.; Singh, S.; Sinha, S. K.; Chaturvedi,
354 V.; Jaiswal, N.; Srivastava, A. K.; Shah, P.; Siddiqui, M. I.; Tripathi, R. P., *Bioorganic*
355 *& Medicinal Chemistry Letters*, **21**, 4404-4408, (2011).
- 356 28) Mourer, M.; Massimba Dibama, H.; Constant, P.; Daffé, M.; Regnouf-de-Vains, J.-B.,
357 *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20**, 2035-2041, (2012).
- 358 29) Brzozowski, Z.; Sączewski, F.; Sławiński, J., *European Journal of Medicinal*
359 *Chemistry*, **42**, 1218-1225, (2007).

7. ANEXO



Flora Martinez <f.floramoreira@gmail.com>

ENC: [Possível SPAM] - [CPB-BPB] Submission Confirmation for Synthesis, in vitro antiproliferative and anti-Mycobacterium tuberculosis activities of novel \square -carboline derivatives

1 mensagem

Anelise Samara Nazari Formagio <AneliseFormagio@ufgd.edu.br>
Para: Flora Martinez <f.floramoreira@gmail.com>

19 de agosto de 2015 09:44

De: em.cpb-bpb.0.44f606.dacb4f88@editorialmanager.com <em.cpb-bpb.0.44f606.dacb4f88@editorialmanager.com> em nome de Bulletins of the Pharmaceutical Society of Japan <em@editorialmanager.com>

Enviado: quarta-feira, 5 de agosto de 2015 21:19

Para: Anelise Samara Nazari Formagio

Assunto: [Possível SPAM] - [CPB-BPB] Submission Confirmation for Synthesis, in vitro antiproliferative and anti-Mycobacterium tuberculosis activities of novel \square -carboline derivatives

Dear Dr. Formagio,

Your submission entitled "Synthesis, in vitro antiproliferative and anti-Mycobacterium tuberculosis activities of novel \square -carboline derivatives" (CPB-Regular Article) has been received by journal Bulletins of the Pharmaceutical Society of Japan

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://cpb-bpb.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Bulletins of the Pharmaceutical Society of Japan

Esta mensagem e seus anexos se dirigem exclusivamente ao seu destinatário, pode conter informação privilegiada ou confidencial e é para uso exclusivo da pessoa ou entidade de destino. Se não é vossa senhoria o destinatário indicado, fica notificado de que a leitura, utilização, divulgação e/ou cópia sem autorização pode estar proibida em virtude da legislação vigente. Se recebeu esta mensagem por erro, rogamos-lhe que nos comunique imediatamente por esta mesma via e proceda a sua destruição.

The information contained in this transmission is privileged and confidential information intended only for the use of the individual or entity named above. If the reader of this message is not the intended recipient, you are hereby notified that any dissemination, distribution or copying of this communication is strictly prohibited. If you have received this transmission in error, do not read it. Please immediately reply to the sender that you have received this communication in error and then delete it.

Este mensaje y sus adjuntos se dirigen exclusivamente a su destinatario, puede contener información privilegiada o confidencial y es para uso exclusivo de la persona o entidad de destino. Si no es usted, el destinatario indicado, queda notificado de que la lectura, utilización, divulgación y/o copia sin autorización puede estar prohibida en virtud de la legislación vigente. Si ha recibido este mensaje por error, le rogamos que nos lo comunique inmediatamente por esta misma vía y proceda a su destrucción.