

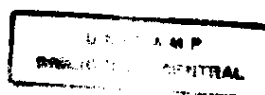
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
ATIVIDADE BIOLÓGICA DA MISTURA ISOMÉRICA DE
3-(4'-bromo - [1,1'-bifenil] -4- il)-3-(4-bromo-
fenil)N,N- dimetil-2-propeno-1-amina
E DE SEUS ISÔMEROS GEOMÉTRICOS

Candidata: ANNA MARIA ALVES DE PILOTO FERNANDES
Orientador: NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO

Campinas, São Paulo
1997



UNIDADE	IQ
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	F391/2
V.	Er
TOMBO BC/	32160
PROC.	281197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/11/97
N.º CPD	04.001.022.3

Fernandes, Ana Maria Alves de
Piloto

Síntese, caracterização e avaliação de atividade biológica da mistura isomérica de...

T/UNICAMP/F391s

(32160/97)

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

F391s Fernandes, Anna Maria Alves de Piloto
Síntese, caracterização e avaliação de atividade biológica da mistura isomérica de 3-(4'-Bromo-[1,1'-Bifenil]-4-IL)-3-(4-Bromo-Fenil)-N,N-Dimetil-2-Propano-1-Amina e de seus isômeros geométricos / Anna Maria Alves de Piloto Fernandes. -- Campinas, [SP : s.s.], 1997.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Chagas. 2. Tripanossoma cruzi. 3. *Alilaminas. I. Durán Caballero, Nelson Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

*Aos meus pais
Aldaisa e
Adalberto*

AGRADECIMENTOS I

Ao Prof. “chefe” Dr. Nelson Durán pela orientação, apoio, compreensão e paciência tão necessários, principalmente nas horas mais difíceis.

À Profa. Dra. Marcela Haun pela orientação nos testes de citotoxicidade.

À Profa. Dra. Solange de Castro pela realização dos testes de atividade tripanocida.

À amiga Denise por todo apoio, amizade e companherismo dedicados.

À amiga Sandrinha pelo apoio nos ensaios de toxicidade aguda.

À Patrícia, Jaime, Adriana, Stella e Endrigo pelo apoio na realização dos testes de citotoxicidade, amizade e agradável convivência durante a realização destes experimentos.

Aos técnicos Chico, Cida e Vanda pelo apoio sempre tão necessário.

Às técnicas Paula e “Soninhas” pela realização dos espectros, Soninha pelo apoio no HPLC e ao Sr. Fontana.

À Adriana, Alana e Profa. Lúcia Baptistella.

Aos funcionários da Biblioteca do IQ, sempre tão prestativos e gentis.

Ao amigo Daniel por estimulantes e enriquecedoras discussões.

Ao prof. Jaime por tão significativas contribuições.

À todos os amigos do laboratório: Parafraseando o Daniel “existe um pedacinho de cada um dentro deste trabalho”.

AGRADECIMENTOS II

À minha super-hiper-maxi mãe, por todo apoio durante a realização deste trabalho e sempre. A minha eterna gratidão.

Aos meus amigos, “inseparáveis isômeros”, Denise e Euler por toda a força e “colo” principalmente nas horas mais difíceis.

Às amigas magenta Raquel e Claudinha pela amizade, ombros amigos e “magentisses”, sempre tão necessárias.

À todas as outras amigas magentas: Paula, Rosana, Nadja, Teresa, Roberta, Cris, Carlinha, Andréa, Rita, e Malu por todos momentos alegres e amizade que compartilhamos neste período.

Aos amigos Sandrinha, Edgard e Patrício, com todo carinho.

Aos amigos de Pastoral Serginho, Luiz, Ana Paula, Andrés, Maria Helena, Eduardo, Andréa, Germano, Luciana e Daniel pela amizade e companherimo.

À minha irmã, Gabi.

À todos os meus amigos sem os quais tudo ficaria bem mais difícil.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário que causa a Doença de Chagas, um mal que aflige entre 16 a 18 milhões de pessoas nas Américas. Apesar dos esforços nessa área, não existe ainda uma quimioterapia segura e eficaz no tratamento da Doença. No Brasil, apenas o benzonidazol - Rochagam, Roche - é comercializado, nas áreas endêmicas, para o tratamento. Neste trabalho, o composto *cis/trans*-3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-ii)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina foi sintetizado e seus isômeros foram separados por HPLC. Tanto a mistura isomérica quanto os isômeros, foram testados *in vitro* contra tripomastigotas de *T. cruzi*. Ensaios de toxicidade frente à bactérias *Escherichia coli* e células V-79 *in vitro* também foram realizados. Observou-se que, frente à tripomastigotas de *T. cruzi* o isômero E demonstrou ser o mais ativo. Nos ensaios realizados com *E. coli* o mesmo isômero demonstrou maior toxicidade. Nos experimentos de citotoxicidade (determinação do conteúdo de DNA e incorporação do corante vermelho neutro) o mesmo resultado foi obtido, com exceção ao método de redução de MTT onde a mistura demonstrou ser o mais tóxico. Estes resultados nos levam a inferir uma provável toxicidade maior do isômero *cis* a qual se relaciona com sua superior atividade tripanocida comparada ao isômero Z.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the protozoan that causes Chaga's disease, a disorder that had attained about 16 to 18 million people in Americas. Although many efforts have being done in these area still there is no safety and effective chemotherapy in the treatment of this disease. In Brazil, only benznidazol - Rochagam, Roche - is sold for treatment in the endemic areas. In this thesis the compound *E/Z*-3-(4'-bromine-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-3-(4-bromine-phenyl)-N,N-dimethyl-2-propen-1-amine was synthetized and their isomers were separated by HPLC. Both isomeric mixture and the isolated isomers were tested *in vitro* against *T. cruzi*'s trypomastigotes, acute toxicity in *Escherichia coli* and cytotoxicity experiments on V-79 cells were also carried out. *E* isomer was the most active isomer on *T. cruzi*'s trypomastigotes. In the acute toxicity test with *E. coli* the same isomer showed the same trails. In the citotoxicity experiments (DNA contents and neutral red uptake) the same result was observed, except by the MTT method in with the mixture showed to be the most toxic one. This results suggest that the *E* isomer is the most toxic and higher trypanocide active than the other isomer.

CHAGAS DE SALITRE

*Olha-me este país a esboroar-se
em chagas de salitre
e os muros, negros, dos fortes
roídos pelo vegetar
da urina e do suor
a carne virgem mandada
cavar glórias e grandezas
do outro lado do mar*

*Olha-me a história de um país perdido:
marés vazantes de gente amordaçada,
a ingênua tolerância aproveitada
em carne. Pergunta ao mar,
que é manso e afaga ainda
a mesma velha costa erosionada.*

*Olha-me as brutas construções quadradas:
embarcadouros, depósitos de gente.
Olha-me os rios renovados de cadáveres,
os rios turvos de espesso deslizar
dos braços e das mãos do meu país.*

*Olha-me as igrejas restauradas
sobre ruínas de propalada fé:
paredes brancas de um urgente brio
escondendo ferros de educar gentio.*

*Olha-me a noite herdada, nestes olhos
de um povo condenado a amassar-te o pão.
Olha-me amor, atenta podes ver
uma história de pedra a construir-se
sobre uma história morta a esboroar-se
em chagas de salitre*

RUY DUARTE DE CARVALHO
(Santarém, Portugal)
Chão de Oferta, 1972

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å - Ângstrom
AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA - Análise de Variância
ATV - Associação Tripsina Versene
ATP - Trifosfato de Adenosina
c.c.d.p. - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DL₅₀ - Dose Letal para 50% dos animais
DNA - Ácido Desoxi-ribonucleico
DMEM - Meio Eagle Modificado por Dullbeco
EC₅₀ - Concentração responsável por 50% de inibição no crescimento bacteriano
EDTA - Sal Dissódico do Ácido Etilenodiaminotetraacético
EM - espectro de massa
eV - elétron-Volt
FDA - Food and Drug Administration
FIA - Análise por Injeção em Fluxo
FiOCruz - Fundação e Instituto Oswaldo Cruz
FTIR - Infravermelho com Transformada de Fourier
HPLC - High Performance Liquid Chromatograph
Hz - Hertz
IC₅₀ - Concentração responsável por uma inibição de 50% do efeito observado
ID₅₀ - Concentração que elimina 50% dos parasitas
m/e - massa/carga
MHz - megahertz
MTT - Sal de Tetrazólio
NADP - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
NOE - Nuclear Overhauser Effect
OMS - Organização Mundial de Saúde
ONU - Organização das Nações Unidas
P - nível de probabilidade
PBS - Solução de Tampão Fosfato
PCR - Reação da Polimerase em Cadeia
PTFE - Politetrafluoretileno
p/v - peso/volume
RMN-¹H - Ressonância Magnética de Prótons
RMN-¹³C - Ressonância Magnética de Carbono
TMS - Tetrametilsilano
TR - Tripanotiona Redutaze
T. cruzi - *Tripanossoma cruzi*
u.m.a. - unidades de massa atômica
VIS - visível

VN - Vermelho Neutro
Y - cepa Y

ÍNDICE

1. Introdução	
1.1 Doença de Chagas	1
1.2 Avaliação de Toxicidade de Novas Substâncias	13
2. Objetivos	17
3. Resultados e Discussão	
3.1 Síntese de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina	18
3.2 Separação dos Isômeros Geométricos	19
3.3 Identificação dos Isômeros Geométricos	22
3.4 Avaliação da Atividade Tripanocida	29
3.5 Avaliação de Citotoxicidade	31
3.6 Avaliação da Toxicidade em bactérias <i>Escherichia coli</i>	40
3.7 Conclusão	43
4. Experimental	
4.1 Materiais e métodos	44
4.2 Síntese de 4'-bromo-(1,1'-bifenil)-4-il, 4-bromo fenil metanona	46
4.3 Síntese de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina	53
4.4 Separação dos Isômeros Geométricos	57
4.5 Avaliação da Atividade Tripanocida	68
4.6 Avaliação de Citotoxicidade	68
4.7 Avaliação da Toxicidade em bactérias <i>Escherichia coli</i>	70
5. Bibliografia	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A tripanossomíase americana, ou Doença de Chagas, é endêmica na América Central e do Sul. Estima-se em 16 a 18 milhões o número de pessoas atualmente infectadas e em 25% o percentual da população exposta ao risco nestas regiões. Cerca de 1.000.000 de novos casos e 45.000 mortes ao ano são registrados (OMS, 1995). No Brasil estima-se em aproximadamente 5 milhões o número de pessoas infectadas (Salles, 1996).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde, este mal é a maior doença parasitária da América Latina e a maior causa de doenças do coração neste continente. Segundo o Banco Mundial é o quarto problema de saúde na região, precedido por doenças respiratórias, diarreia e AIDS (Rocha, 1995).

A Doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanossoma cruzi* pertencente à família *Trypanosomatidae*. Este protozoário tem distribuição geográfica coincidente a de seu inseto vetor -hemípteros hematófagos da sub-família *Triatominae* -, desde o paralelo 40° de latitude norte nos EUA, até o paralelo 45° da latitude sul na Argentina e Chile. Os insetos são hematófagos obrigatórios e são capazes de transmitir o protozoário ao homem ao se alimentar do sangue deste último. No Brasil recebem mais comumente a denominação popular de "barbeiro".

Após a infecção a doença evolui passando por duas fases - a aguda e a crônica esta última podendo levar a complicações cardíacas e digestivas fatais.

No Brasil, a Doença afeta quase todo território nacional, com exceção a Região Amazônica e a Mata Atlântica. A endemicidade é maior nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Paraná e Rio Grande do Sul (Siqueira-Batista *et alli*, 1993).

A explicação atualmente aceita para o aparecimento e a distribuição da Doença é a seguinte: antes da descoberta das Américas, a infecção pelo *T.*

cruzi era exclusivamente selvagem, havendo perfeito equilíbrio entre o parasita, os triatomíneos e os mamíferos silvestres. Com a chegada do europeu ao continente, a colonização foi realizada com habitações rústicas, que possibilitaram a domiciliação dos triatomíneos e, conseqüentemente a infecção humana. Como estas habitações existem até hoje em áreas rurais dos países sul-americanos, a enfermidade apresenta alta prevalência nestas localidades. Estes aspectos podem ser comprovados pela verificação do que ocorre em outras áreas da América aonde verifica-se a existência do *T. cruzi* e de insetos vetores porém não se registram casos da Doença. Nestas regiões o barbeiro não encontrou abrigos propícios para sua adaptação e colonização (Teixeira, 1987; News, 1988; Dias, 1992 e Siqueira- Batista *et alli*, 1993).

As melhores condições da população é as espécies locais de triatomíneos, fez a infecção humana pelos vetores ser extremamente rara nos Estados Unidos. Entretanto, devido à constantes migrações, calcula-se em 100.000 o número de pessoas infectadas naquele país, a maioria delas imigrantes do México e da América Central (Dias, 1992). A recente constatação de um caso de Doença de Chagas na Suíça, em uma mulher boliviana em visita ao país, chamou a atenção da comunidade médica naquela região sabendo-se uma vez da possibilidade de transmissão da Doença por transfusão ou doação de órgãos (Sztajzel *et alli*, 1996).

A transmissão da Doença de Chagas por transfusão sanguínea também é um problema crescente na América Latina. Desde a década de 50 muitos artigos científicos tem mostrado que a transmissão do *T. cruzi* por esta via é extremamente frequente em algumas áreas endêmicas (Dias, 1992). Por esta mesma razão, tem sido registrados casos em regiões anteriormente isentas, como por exemplo algumas regiões dos Estados Unidos (Kirchhoff, 1993).

Nos últimos 30 anos tem se verificado um grande aumento no número de pessoas infectadas residentes em áreas urbanas como um resultado da migração a partir de zonas rurais e transmissão transfusional fazendo com que este aspecto da transmissão do *T. cruzi* se torne um importante problema de saúde pública em centros brasileiros urbanos. Em tais áreas, como São Paulo, onde a transmissão vetorial não ocorre desde 1970, a transfusão sanguínea

permanece um dos poucos modos de se adquirir esta infecção (Teixeira, 1987 ; Salles *et alli*, 1996).

Outras formas de transmissão de menor importância epidemiológica são: transplante de órgãos, transmissão congênita, transmissão oral - através da ingestão acidental de fezes de animais contaminados e insetos - transmissão sexual e acidentes de laboratório (Kirchhoff, 1993 ; Siqueira-Batista *et alli*, 1996).

Muitos autores se referem a Doença de Chagas como um mal de grande impacto social. Verificando as condições da população nas áreas atingidas observa-se um nível de qualidade de vida extremamente baixo tanto nos aspectos nutricionais como culturais e econômicos (Siqueira-Batista *et alli*, 1993). Além disso, os principais sintomas da Doença acometem o indivíduo principalmente na faixa etária aonde este se encontra mais produtivo levando a uma diminuição da mão de obra local disponível e conseqüente contribuição para um aumento no quadro de miséria (News, 1988).

Dentre os 18 países Latino Americanos aonde a Doença é endêmica, programas nacionais de controle existem apenas em 4, e mesmo assim apresentam frequentemente dificuldades em manter a necessária continuidade e os mínimos níveis de cobertura (Dias, 1992). Na XXIII Conferência Sanitária Pan Americana em 1990, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai firmaram um acordo - "Iniciativa para os Países do Cone Sul" - para eliminação da transmissão da Doença de Chagas de seus territórios baseada em estratégias de controle combinando controle de vetor e "screening" sanguíneo (OMS, 1995).

Melhorias nas condições sociais da população nas áreas endêmicas, eliminação ou controle dos insetos vetores e triagem de pacientes e do sangue utilizado em bancos de sangue, figuram entre as principais medidas a serem tomadas no controle desta enfermidade. Entretanto, com relação aos dois primeiros aspectos, estas mudanças dependem de profundas e substanciais modificações na estrutura político-social e econômica das regiões assoladas pela endemia (Siqueira-Batista *et alli*, 1996).

A Doença

O *Tripanossoma cruzi* apresenta-se sob três formas ao longo do seu ciclo de vida: a forma infectiva tripomastigota e as formas proliferativas amastigota e epimastigota.

Seu ciclo de vida e transmissão compreende os hospedeiros vertebrados e os insetos vetores, hematófagos obrigatórios, os quais constituem os hospedeiros invertebrados. Quando um inseto se alimenta do sangue de um animal contaminado, as formas tripomastigotas circulantes na corrente sanguínea passam para o interior do inseto e na porção inferior do intestino deste se transformam na forma proliferativa epimastigota

Ainda no interior do inseto, as formas epimastigotas sofrem sucessivas divisões e ao ocuparem a porção inferior do intestino do hospedeiro invertebrado se transformam em tripomastigotas metacíclicos. O inseto possui o hábito de defecar ao se alimentar. Quando da ocorrência de uma posterior alimentação do inseto, as formas tripomastigotas metacíclicas invadem a corrente sanguínea de um segundo indivíduo humano, ou pelo próprio local da picada ou por mucosas. Ao penetrarem em um macrófago, os tripomastigotas sofrem uma segunda transformação e adquirem a forma proliferativa no hospedeiro mamífero - forma amastigota. Quando da incidência de um grande número de amastigotas intracelularmente, estes novamente se transformam em tripomastigotas e rompem a célula podendo atingir células vizinhas ou, via corrente sanguínea, atingir células distantes. O ciclo se fecha quando um segundo inseto vetor se alimenta de sangue infectado, contraindo o parasita, tornando-se apto para continuar a disseminação do parasita.

Após a infecção e um curto período de incubação, o indivíduo contaminado adquire a chamada forma aguda da doença. Nesta fase, que também pode ser assintomática, observa-se uma doença suave que pode envolver febre, mau estar, edema da face e de extremidades inferiores e linfadenopatia generalizada. O parasita pode invadir vários órgãos, inclusive o sistema nervoso central causando meningoencefalites (Kirchhoff, 1993). A mortalidade nesta fase é de 2 a 8% com a maioria das mortes ocorrendo entre crianças (De Castro, 1993).

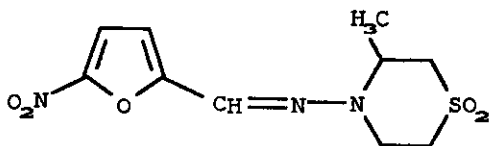
A Doença de Chagas aguda desaparece espontaneamente em 4 ou 8 semanas e os pacientes então adentram na chamada fase indeterminada da doença. Nesta fase, os pacientes são assintomáticos, apresentam parasitemia de longa duração e possuem anticorpos para a maioria dos antígenos de *T. cruzi*. Anos ou mesmo décadas após infecção com *T. cruzi* ter sido adquirida, estima-se que 10 a 30% das pessoas desenvolvam sintomas cardíacos ou gastrointestinais da fase crônica da doença. O coração é o órgão mais frequentemente afetado desenvolvendo arritmias, eventos trombolíticos, insuficiência cardíaca ou crescimento anormal (casos mega). Podem também apresentar um crescimento anormal do esôfago e do cólon (megaesôfago e megacólon) os quais estão associados a complicações como regurgitação e malnutrição causando severos incômodos ao paciente. Podem ocorrer também acometimentos cardíacos e digestivos simultaneamente (Tanowitz *et alli*, 1992; Kirchhoff, 1993 e Siqueira-Batista *et alli*, 1996).

Duas teorias tem interpretado antagonisticamente a relação entre as infecções por *T. cruzi* e a Doença de Chagas. De um lado existe o conceito de que a doença é uma consequência direta da infecção pelo protozoário. Por outro lado, existem fortes evidências que sugerem a existência de complexos processos imuno biológicos resultantes da interação parasita-hospedeiro como causa para a doença. Esta questão continua aberta e é foco de muitas discussões (Teixeira, 1994 ; Kierszenbaum, 1996).

Tratamento

Na lista de medicamentos essenciais divulgada pela OMS, somente dois fármacos foram aceitos para o tratamento desta doença: um derivado nitrofurano - Nifurtimox -NFX- comercializado com o nome de Lampit (Bayer) (I) - e um derivado nitroimidazólico - Benzonidazol - BZ - (Rochagan - Roche) (II) . Nifurtimox não é mais encontrado no mercado brasileiro e nos Estados Unidos é somente encontrada no Centro para Controle de Doenças (CDC). Benzonidazol por sua vez não é encontrado nos EUA e é o único medicamento

específico para Doença de Chagas comercializado no Brasil (Siqueira-Batista *et alli*, 1996).



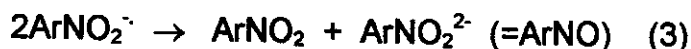
I - NFX



II - BZ

Estes fármacos possuem ação restrita à fase aguda da doença, eliminando os sintomas e diminuindo o curso da infecção. O uso em pacientes crônicos é restrito devido à pouca eficácia observada. Além disso, em muitos casos, pacientes são refratários ao tratamento, um fato que deve ser devido, ao menos em parte, à heterogeneidade das populações de parasitas (Stoppani *et alli*, 1996).

Nitrocompostos são uma classe de drogas para as quais prova direta da produção de radicais em organismos alvo tem sido demonstrada. As reações 1, 2 e 3 representam respectivamente a produção de radicais nitroânions, a redução ou metabolismo em condições aeróbicas e uma reação de transferência de 1 elétron para uma variedade destas drogas :



onde ArNO_2 = nitroaromáticos.

Para NFX, a produção de radicais parece estar envolvida no mecanismo de ação tripanocida deste fármaco, que tem ação citotóxica de maior efetividade no parasita do que no hospedeiro. O primeiro é deficiente em enzimas capazes de estabilizar tais compostos. Os efeitos colaterais deste composto também podem estar relacionados à produção de radicais. No caso

do BZ, sua ação sobre *T. cruzi* deve envolver interferência direta na síntese de macromoléculas, como DNA (Stoppani *et alli*, 1996).

Ambos medicamentos possuem sérios efeitos colaterais, fato que torna-se particularmente importante quando da necessidade de administração prolongada do fármaco para obtenção de bons resultados clínicos. Estudos de avaliação de mutagenicidade indicaram que ambos fármacos são possivelmente genotóxicos. Coelhos tratados com ambas drogas demonstraram uma alta incidência de linfomas malignos. Crianças tratadas com BZ demonstraram aumento nos danos cromossomais em linfócitos periféricos, enquanto que para NFX o dano genético espontâneo demonstrou ser treze vezes superior ao grupo controle (De Castro, 1993).

Além disso, ensaios de susceptibilidade à BZ e NFX realizados com 47 cepas de *T. cruzi* revelou cerca de 30% da população parasitária induz infecção resistente a ambas ou a uma das drogas (Filardi e Brener, 1987).

A toxicidade relacionada a estes fármacos, bem como o uso restrito à fase aguda e a não uniformidade na ação terapêutica, leva a necessidade de produção de novas drogas, mais eficazes e menos tóxicas com uso recomendado até para a fase crônica.

Pesquisas de Novos Fármacos para o Tratamento da Doença de Chagas

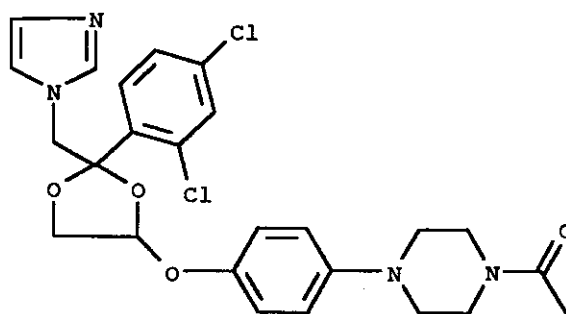
A pesquisa de drogas alternativas para a Doença de Chagas é baseada em duas principais abordagens: testar novas drogas sintetizadas (ou comercialmente disponíveis) e detectar moléculas alvo específicas para um planejamento racional de drogas (De Conti, 1996).

Dentro desta primeira abordagem, destaca-se o alopurinol. Este composto foi primeiramente conhecido pela comunidade médica por seu efeito hipourecemiante no tratamento da gota devido a competição do fármaco ao nível da enzima xantina oxidase na transformação de purinas em ácido úrico. Embora com algumas variações dependentes da cepa sob estudo, alopurinol demonstrou ser efetivo tanto *in vitro* quanto *in vivo* em camundongos. Em

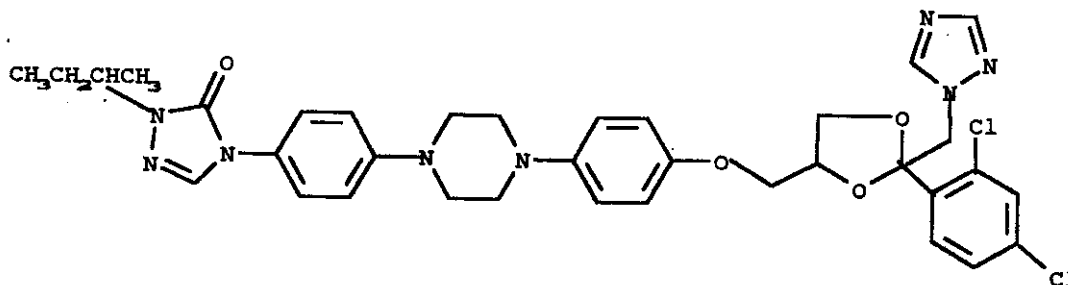
humanos na fase aguda, a experiência até 1988 do Centro de Patologia Regional de Santiago del Estero, Argentina, não revelou grandes avanços com relação ao tratamento convencional. Na fase crônica, estudos também realizados na Argentina, não demonstraram grandes avanços com relação ao tratamento convencional. A vantagem do alopurinol, porém, reside no fato deste apresentar baixa incidência de efeitos colaterais (Tanowitz *et alli*, 1992; De Castro, 1993; Siqueira-Batista *et alli*, 1996).

Outros medicamentos testados no tratamento da Doença de Chagas pertencem a classe de compostos conhecidos como inibidores da biossíntese de esteróis (IBE). Quimioterápicos relativamente seguros, de largo espectro e ativos por via oral, que atualmente compreendem a primeira escolha para o tratamento de várias doenças causadas por fungos.

Estes compostos induzem inibição de crescimento e perda da viabilidade celular em organismos sensíveis como consequência da diminuição de esteróis fúngicos essenciais e/ou acumulação de intermediários tóxicos. O *Tripanossoma cruzi* mostrou-se muito sensível, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, aos derivados azólicos antifúngicos como cetoconazol (III) e itraconazol (IV) (Siqueira-Batista *et alli*, 1996).



III - cetoconazol



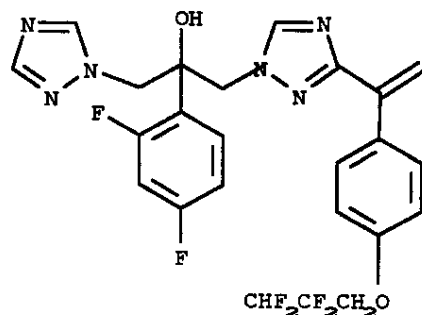
IV - Itraconazol

O *T. cruzi*, assim como leveduras, plantas e fungos, tem necessidades estruturais específicas aos esteróis, que são diferentes do seu grande papel de dar fluidez à membrana. Entretanto, os efeitos antiproliferativos dos IBE contra fungos e leveduras são compreendidos atualmente como resultado, principalmente, da acumulação de precursores esteróis citotóxicos. Considerando a natureza intracelular do *T. cruzi*, a combinação de drogas que bloqueiam enzimas diferentes na rota sintética de esteróis, foi utilizada, visando potencializar os IBE atualmente disponíveis. Assim foram combinados cetoconazol e itraconazol com terbinafina. Esta combinação, assim como outras demonstrou *in vivo* e *in vitro* que a diminuição dos esteróis endógenos é letal para as formas epimastigotas e amastigotas do parasita (Siqueira-Batista *et alli*, 1996).

Provavelmente, o desenvolvimento mais promissor neste campo trata-se do derivado DO870. O trabalho publicado recentemente por Urbina *et alli* (1996) atraiu muita atenção. Demonstrou-se que o tratamento com o agente antifúngico DO870 **(V)** (um derivado bis-triazol que inibe a biossíntese de ergosterol) eliminou o parasita de camundongos infectados sem causar toxicidade visível ao hospedeiro. Estas observações são uma importante extensão de recentes estudos *in vitro* que estabeleceram que o tratamento com DO870 induz severas anomalias morfológicas em epimastigotas e amastigotas inibindo também o crescimento dos parasitas.

Urbina *et alli* (1996) demonstrou recentemente que a maioria dos camundongos que receberam DO870 oralmente (iniciando o tratamento 1 a 7 dias após infecção com dose letal de *T. cruzi*, Y) não apenas sobreviveu como também não apresentou evidência de parasitas circulantes nos testes

parasitológicos convencionais ou testes de PCR (Polimerase Chain Reaction) para detecção de seqüências de DNA específicas do *T. cruzi*. A dose mais efetiva de DO870 foi 15 ou 20 mg/kg/dia, mas mesmo a pequenas doses, DO870 mostrou ser mais eficaz do que NFX e cetoconazol.



V - DO870

Objetivando-se um desenvolvimento mais racional de drogas contra *T. cruzi*, o estudo de enzimas que realizam um importante papel no metabolismo e/ou diferenciação do parasita deve prover novos alvos para a quimioterapia. A busca por enzimas e/ou etapas metabólicas que são únicas ao parasita ou são diferentes no parasita e no hospedeiro mamífero tem sido o principal objetivo em muitos laboratórios (Goldenberg, 1993). Neste campo muita ênfase tem sido dada à inibição do metabolismo de esteróis, de proteinases de *Trypanosoma* e de poliaminas como descrevem recentes revisões (Chance e Goad, 1997; Coombs e Mottram, 1997 e Fairlamb e Quesne, 1997).

Dentro desta linha encontram-se inibidores da tripanotiona redutase (TR), inibidores de topoisomerasas, inibidores de proteases e análogos de poliaminas.

O *T. cruzi* é extremamente dependente de uma pequena molécula chamada tripanotiona para protegê-lo contra os danos causados por espécies de oxigênio produzidas durante o metabolismo normal. A concentração de tripanotiona nas células é mantida por uma enzima chamada tripanotiona redutase (Faerman e Gillilan, 1997).

A TR juntamente com a tripanotiona peroxidase catalisam as reações 4 e 5 respectivamente:



onde $T[S]_2$ = tripanotiona e $T[SH]_2$ = tripanotiona reduzida, protegendo tripanossomatídeos contra espécies radicalares, desenvolvendo nestes o mesmo papel que o sistema glutaciona redutase/glutaciona peroxidase em outros organismos. Considerando sua especificidade para tripanossomatídeos, o sistema tripanotiona pode ser um conveniente alvo para drogas aplicável no tratamento de diferentes tripanossomíases, incluindo Doença de Chagas (Stoppani *et alli*, 1996).

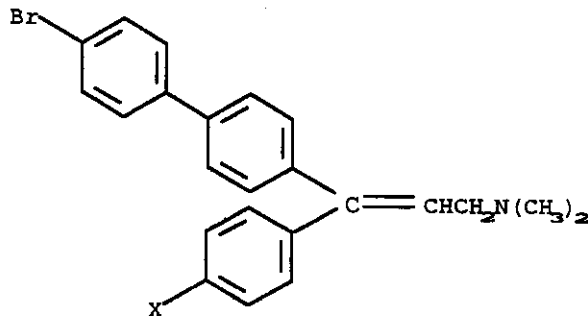
Dois compostos, uma naftoquinona e um nitrofurano, quando incubados com formas tripomastigotas antes da interação parasito - cultura de músculo liso reduziram os níveis de infecção. A violeta genciana inibiu a TR *in vitro* (De Castro, 1993; Siqueira-Batista *et alli*, 1996). Um grande número de compostos tripanocidas existentes interagem com esta importante área em tripanossomatídeos. Entre eles: os compostos nitroaromáticos de arsênio trivalentes inibidores da tripanotiona redutase, o óxido de melarsem, o qual forma adutos estequiométricos (1:1) com tripanotiona reduzida, os nitroarenos nifurtimox e benzonidazol e naftoquinonas que agem "in vitro" contra *T. cruzi* também por inibição da tripanotiona redutase (De Conti, 1996).

Uma abordagem nessa linha é o desenho de ligantes usando a estrutura tridimensional da enzima (Siqueira-Batista *et alli*, 1996; Faerman e Gillilan, 1997).

Muitos outros compostos foram testados empiricamente contra *T. cruzi*, dentre eles antibióticos, compostos tricíclicos clinicamente utilizados como antidepressivos, nitroimidazóis, complexos metálicos, produtos naturais, antitumorais, análogos de hormônios de insetos jovens e inibidores de proteases (De Castro, 1993; Rodriguez e Gros, 1995).

Em 1976 Barret *et alli* sintetizou e testou *in vivo*, contra infecção por *T. cruzi*, uma série de 130 derivados de 3-aminopropenos. Dentro desta série, o composto 353-C (E) - 3 - (4' - bromo - [1,1' - bifenil] - 4 - il) - 3 - (4 - clorofenil) - N,N - dimetil - 2 - propeno - 1 - amina (VI) demonstrou uma atividade

triperidocida 10 vezes maior que BZ e 20 vezes maior que NFX, além de não apresentar efeitos tóxicos hematológicos, bioquímicos e histopatológicos em camundongos e cachorros (Barret *et alli*, 1982).



onde X= H, Br, Cl, OMe, NO₂, Me, SO₂Me, I

VI

Posteriormente De Conti *et alli* (1996a;b) sintetizou e testou *in vitro* contra *T. cruzi*, uma série de 8 derivados de propenaminas: os compostos 3 - (4' - bromo - [1,1' - bifenil] - 4 - il) - 3 - (4 - X - fenil) - N,N - dimetil - 2 - propeno - 1 - amina, 6 deles inéditos. Dentro desta série os composto onde X= Br e H demonstraram ser os mais ativos sob as formas tripomastigotas, sendo o primeiro 13 vezes mais ativo do que nifurtimox testado sob as mesmas condições. Ainda neste trabalho, os ensaios de citotoxicidade em cultura de células V-79 e ensaios de toxicidade em bactérias *E. coli* demonstraram que os compostos halogenados estavam entre os menos tóxicos da série.

Em vista dos resultados obtidos com o derivado bromo, Pereira *et alli* (1996) avaliou em camundongos infectados com *T. cruzi* o potencial tripanocida deste composto. A administração de 20 mg/kg/dia por 9 dias a partir da data de infecção ou uma dose única de 100 mg/kg foram suficientes para levar a eliminação do parasita sanguíneo e prevenir a mortalidade.

Muitos compostos tem sido testados contra *T. cruzi* como mostram amplas e recentes revisões (De Castro, 1993; Rodriguez e Gros, 1995; Siqueira-Batista, *et alli*, 1996). Entretanto, ao menos a metade deles foram

testadas contra a forma epimastigota do parasita, o que pode ser particularmente problemático devido a existência de diferenças significativas entre o efeito da droga quando usada em culturas e em hospedeiros vertebrados (De Castro, 1993).

Mesmo apesar da existência de fármacos comercialmente disponíveis para o tratamento e de novas moléculas testadas contra *T. cruzi* a Doença de Chagas é amplamente vista como incurável e a busca por uma terapia mais segura e menos tóxica continua.

1.2 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE NOVAS SUBSTÂNCIAS

A introdução no mercado de novas drogas, cosméticos, aditivos de alimentos e etc., exige que os mesmo passem por extensivos testes de toxicidade antes de obterem autorização para comercialização (Freshney, 1994).

Testes de toxicidade aguda realizados em animais, envolvem avaliação de um efeito tóxico geral de uma única dose de um produto químico, ou em muitos casos, o efeito de múltiplas doses dadas dentro de 24 horas. Estes dados fornecem a base para classificar produtos químicos com relação a sua manipulação, transporte e uso. Também para definir modos de ação tóxica, estabelecer níveis de doses para outros testes e para propor recomendações médicas em caso de envenenamento (Seibert *et alli*, 1996).

Estes testes envolvem normalmente um grande número de experimentos em animais os quais são caros e acarretam em constantes problemas de ordem ética. Existe muita pressão, tanto por razões humanitárias quanto econômicas para que pelo menos uma parte dos testes de toxicidade seja feita *in vitro* (Riddel *et alli*, 1986; Ratner, 1990; Cingi *et alli*, 1991; Triglia *et alli*, 1991; Freshney, 1994; Seibert *et alli*, 1996).

Testes de toxicidade celular *in vitro* - citotoxicidade *in vitro* - geralmente são rápidos, sensíveis, passíveis de automação e econômicos fazendo com

que os mesmos tenham recebido crescente atenção, por parte da comunidade científica, na substituição ao uso de animais (Renzi *et alli*, 1993).

A capacidade destes ensaios *in vitro* em substituir completamente o uso de animais nos testes de toxicidade ainda é uma dúvida. Entretanto, eles podem, quando adequadamente padronizados, servir para um pré-screening de agentes com potencial tóxico desconhecido reduzindo grandemente o número de animais necessários (Borenfreund e Puerner, 1984).

É improvável que mesmo sistemas *in vitro* cito ou genotoxicológicos irão prover dados tóxicos que serão totalmente equivalentes àqueles derivados de um sistema *in vivo*, da mesma forma que os resultados dos testes com animais não são totalmente representativos da experiência humana à exposição a uma substância tóxica. Apesar das diferenças, o uso de sistemas experimentais *in vitro* e *in vivo* para simular a experiência atual nas populações humanas, tem se mostrado muito útil na proteção do público e avançou nossa compreensão dos sistemas biomédicos (Stark, 1986).

Muitos estudos tem demonstrado boa correlação entre citotoxicidade *in vitro* obtida com linhagens celulares indiferenciadas e dados de DL₅₀ (Roguet *et alli*, 1993 e Gülden *et alli*, 1994). Entretanto, a toxicidade aguda pode ser causada por uma variedade de mecanismos, muitos dos quais podem não estar operantes em tais testes de citotoxicidade basal assim, metodologias mais sofisticados são necessárias principalmente ao lidarmos com substâncias que requerem receptores muito específicos ou que são absorvidos internamente e modificados para se tornarem metabólitos tóxicos (Seibert *et alli*, 1996).

Ensaio de avaliação de toxicidade *in vitro* podem ser utilizados, após a identificação de um candidato líder, como uma ferramenta de informação para a análise de relações estrutura-atividade e para o desenho de análogos de toxicidade reduzida (Ratner, 1990).

Neste trabalho três testes distintos para avaliação de citotoxicidade *in vitro* foram utilizados:

-Determinação do Conteúdo de DNA

-Incorporação do Corante Vermelho Neutro

-Redução do MTT

Cada uma das metodologias citadas acima avalia diferentes domínios no âmbito das funções celulares. O método de determinação do conteúdo de DNA nos informa sobre a capacidade das células de sobreviverem à exposição à um agente tóxico. (Cingi *et alli*, 1991).

No ensaio de incorporação de corante Vermelho Neutro, o armazenamento deste no interior dos lisossomas celulares é uma medida direta do correto funcionamento destas organelas (Riddel *et alli*, 1986).

No método de redução do Sal de Tetrazólio, ou MTT, estamos avaliando o correto funcionamento da desidrogenase mitocondrial (Mosmann, 1983). O MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio - ou sal de tetrazólio, é clivado por esta enzima o que leva à formação de um produto azul - formazam. Esta reação se faz apenas em células vivas e a quantidade de formazam produzida é proporcional ao número de células "funcionais" presentes. Este é um método muito útil na determinação de sobrevivência celular e correto funcionamento mitocondrial (Denizot e Lang, 1986).

O uso de metodologias que avaliem diferentes funções celulares para a estimativa da citotoxicidade é a abordagem mais adequados na avaliação de compostos cujo mecanismo tóxico é ainda desconhecido (Renzi *et alli*, 1993).

Testes de toxicidade aguda utilizando microorganismos são amplamente utilizados desde que eles podem render informação útil em um curto período de tempo. Embora a toxicidade pode ser seguida pelo monitoramento da variação dos "pools" internos de ATP ou DNA, a inibição de algumas funções vitais microbianas internas são facilmente medidas. Respiração por exemplo, é um confiável parâmetro para ser monitorado em testes de toxicidade aguda. A produção de CO₂ por bactérias reflete uma série completa de reações bioquímicas as quais constituem o processo de respiração do organismo. A inibição deste processo irá alterar a quantidade de CO₂ produzida e trapeada no meio de cultura aquoso. Desde os primeiros estudos em testes de toxicidade , via densidade ópticas ou valores de peso

seco, técnicas mais sofisticadas (e exatas) estão agora disponíveis para quantificar respostas microbianas a agentes tóxicos (Jardim *et alli*, 1990).

Neste trabalho também se utilizou de uma metodologia de avaliação de toxicidade utilizando-se bactérias *Escherichia coli*. O parâmetro utilizado foi a respiração microbiana que foi monitorada com o auxílio de um sistema FIA condutimétrico.

2. OBJETIVOS

Esta dissertação teve por objetivos:

- Síntese e caracterização de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil-4-il)-3-(4-bromofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina,
- Separação de seus isômeros geométricos *E* e *Z*,
- Avaliação da atividade tripanocida da mistura isomérica e dos isômeros,
- Avaliação da toxicidade da mistura e dos isômeros frente à bactérias *Escherichia coli*,
- Avaliação da citotoxicidade *in vitro* da mistura e dos isômeros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE DE 3-(4'-BROMO-[1,1'-BIFENIL-4-IL])-3-(4-BROMO-FENIL)-N,N-DIMETIL-2-PROPENO-1-AMINA

O composto 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil-4-il])-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (**5**) foi obtido por uma rota sintética (**Esquema 1**) já anteriormente descrita (De Conti, 1996) que compreende duas etapas a saber: uma acilação de Friedel-Crafts entre 4-bromobifenila (**1**) e cloreto de p-bromo benzoíla (**2**) fornecendo o composto 4'-bromo-(1,1'-bifenil)-4-il,4-bromo fenil metanona (**3**), seguida de uma reação de Wittig entre esta cetona e o ílideo do brometo de (2-dimetilaminoetil)-trifenilfosfônio, formado no meio reacional (**4**), de onde se obtém (**5**).

ACILAÇÃO DE FRIEDEL-CRAFTZ:

A cetona (**3**) foi obtida com 80% de rendimento e caracterizada por RMN-¹H (300 Mhz), RMN-¹³C (75 Mhz), IV, EM, UV e ponto de fusão.

REAÇÃO DE WITTIG:

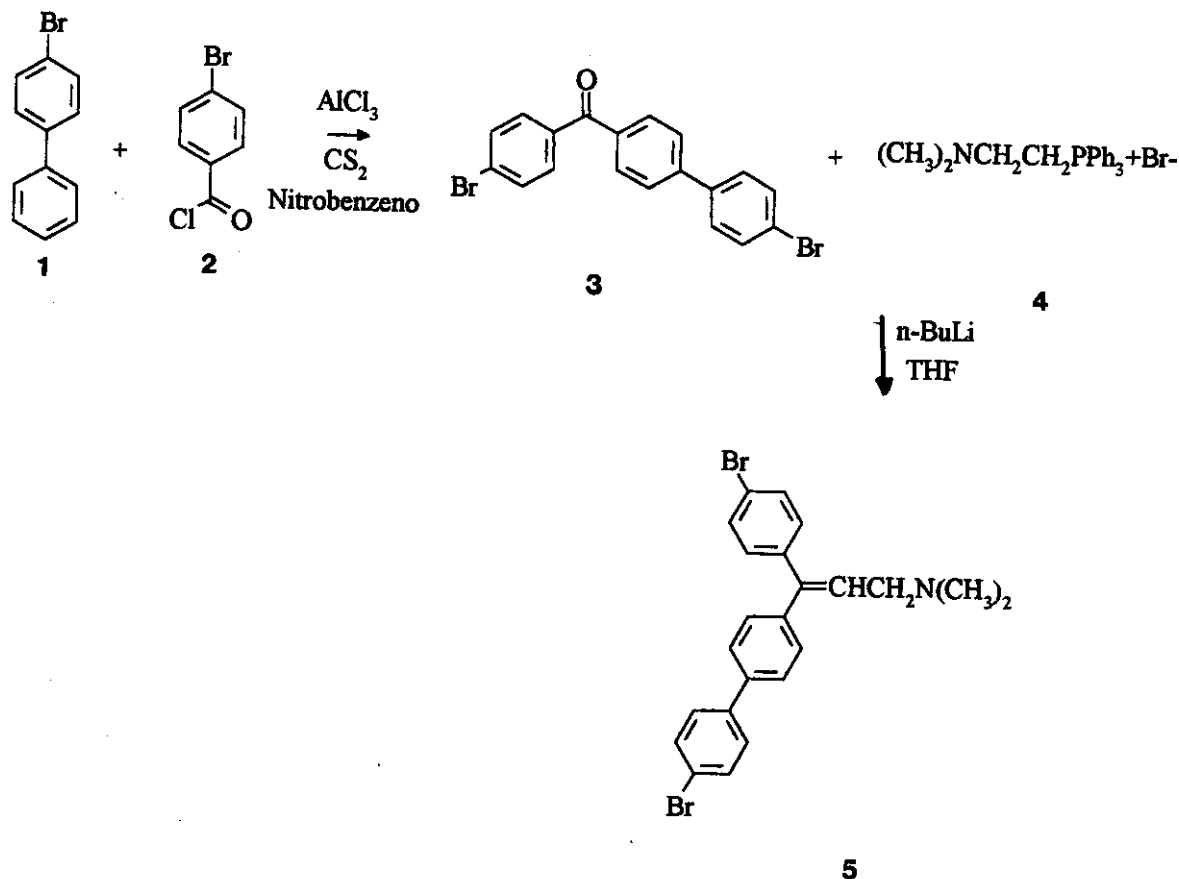
Na sequência, a mistura isomérica de (**5**) foi obtida com um rendimento de 35% e caracterizada por RMN-¹H (300 Mhz), IV e UV. Os isômeros *E* e *Z* foram obtidos na proporção 1:1.

A obtenção de alquenos através de reações de Wittig, apresenta a possibilidade de produção dos isômeros *E* e/ou *Z* no produto final.

Acredita-se que a estereoseletividade das reações de Wittig é o resultado de efeitos estéricos que se desenvolvem quando os dois reagentes se aproximam um do outro. Ela depende fortemente da estrutura do ílideo e das condições de reação. A generalização mais ampla é a de que ílideos não estabilizados produzem predominantemente alquenos *Z*, enquanto que

ilídeos estabilizados produzem principalmente alquenos *E* (Carey e Sundberg, 1990).

Esquema 1: Rota de síntese de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil-4-il]-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (5)



3.2) SEPARAÇÃO DOS ISÔMEROS GEOMÉTRICOS

Na avaliação da atividade biológica de uma nova molécula, a pureza da substância química é desejada.

É frequente isômeros geométricos apresentarem diferenças na intensidade da ação biológica. Isto acontece porque, em geral, suas propriedades físicas e químicas são diferentes. Diversamente do que ocorre nos isômeros ópticos, nos pares de isômeros geométricos os grupos estão separados por distâncias diferentes. Isso, ou facilita ou dificulta, conforme o caso, a interação de um dos dois isômeros com a superfície receptora (figura 1) e explica por que não é igual a intensidade da ação farmacológica (Korolkovas, 1977).

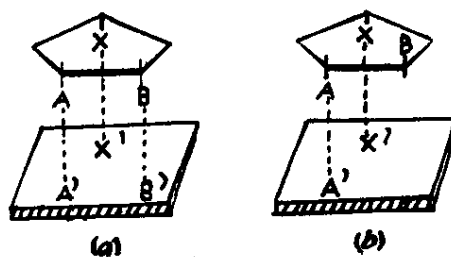


Figura 1: Interação de isômeros geométricos com uma superfície receptora. A, B, e X representam grupos de átomos e A', B' e X' representam seus pontos de ligação à superfície. Em (a), a ligação é mais forte, pois se faz por três pontos; em (b), só por dois, por isso é mais fraca (Korolkovas, 1977).

Vários exemplos de isômeros geométricos em que um dos isômeros é mais potente do que o outro podem ser citados. O psicotrópico *trans*-clorprotixeno é dezenas de vezes mais ativo que o *cis*-clorprotixeno e o *trans*-estilbestrol é muito mais ativo que o isômero *cis* (Korolkovas, 1977).

O composto 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina apresenta isomerismo geométrico (**figura 2**).

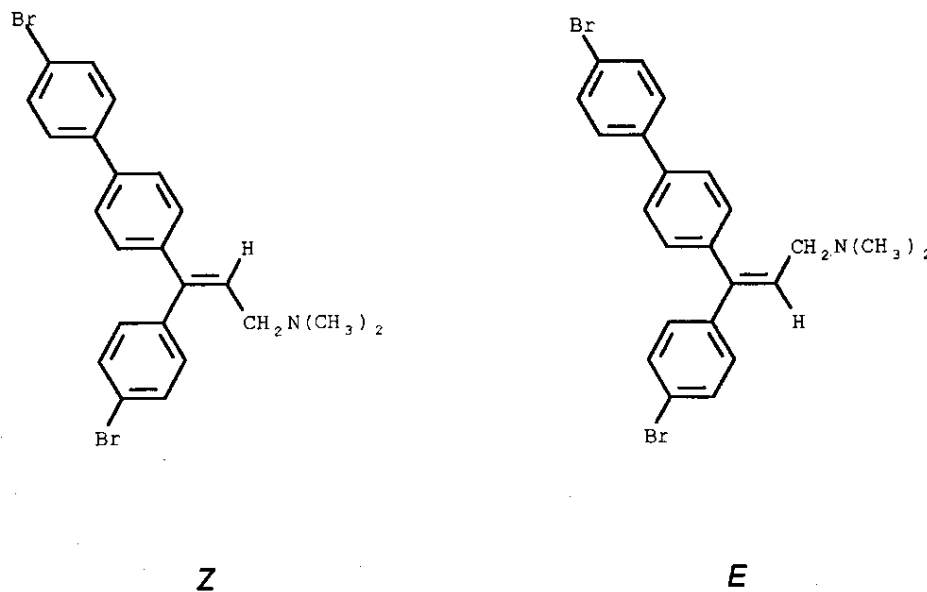


Figura 2: Isômeros geométricos de composto 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina.

Partindo de estudos previamente realizados para a separação desses isômeros (De Conti, 1996) iniciou-se a separação através de c.c.d.p., eluindo-se a mistura com uma solução de clorofórmio/acetona/hexano na proporção 50:6:44 saturada com solução aquosa de hidróxido de amônio.

Com a finalidade de melhorar a separação e aumentarmos a massa de isômero puro obtida, iniciou-se um estudo para a separação desses isômeros por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semipreparativo.

Iniciou-se o estudo da separação com uma mistura de acetato de etila/hexano/trietilamina nas proporções 79/20/1 com um fluxo inicial de 1ml/min. Um aumento na proporção do hexano e diminuição do acetato de etila, mantendo-se a concentração de trietilamina constante, levou a uma melhora na separação, com um aumento no tempo de retenção. A proporção ideal para a separação, 80/19/1 hexano/acetato de etila/trietilamina, foi alcançada com um tempo de retenção razoável ao se aumentar o fluxo para 3ml/min. Os isômeros geométricos foram obtidos em 63 minutos para *E* e 68 minutos para *Z* (figura 3).

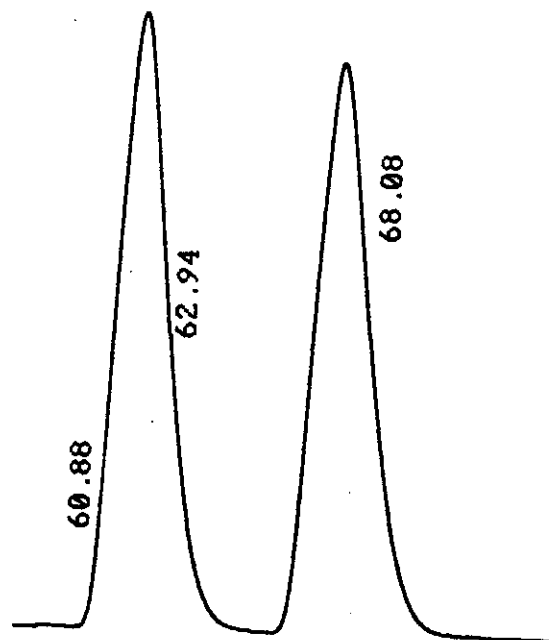


Figura 3: Cromatograma de separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina. Tempos de retenção: 63 minutos para *E* e 68 para *Z*. Detector UV em 270 nm.

A **tabela 1** apresenta algumas propriedades físicas dos isômeros isolados

Tabela 1: Propriedades físicas dos isômeros separados

Isômero	Aspecto físico	Absorção no UV ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm)
E	óleo amarelo	264
Z	sólido branco	280

3.3) IDENTIFICAÇÃO DOS ISÔMEROS GEOMÉTRICOS

Inicialmente a designação *E* e *Z* para os isômeros separados foi feita baseada em argumentos de disposição espacial para os anéis aromáticos do grupo bifenila em relação à dupla ligação e comprimento de onda de absorção máxima do composto na região de ultra-violeta.

Dessa forma ao isômero com comprimento de onda de máxima de absorção igual a 280 nanômetros, atribuiu-se a configuração *Z* pois, neste, os anéis do grupo bifenila estão em oposição ao grupo dimetil metileno amina e portanto livres para assumir o plano da dupla ligação aumentando assim a conjugação na molécula causando uma diminuição na energia do sistema deslocando a absorção para um comprimento de onda maior.

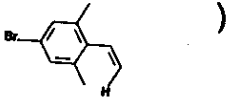
Em oposição, atribui-se ao composto que absorve em 260 nm a configuração *E* pois neste existe um maior impedimento com relação à dupla ligação.

Esta mesma atribuição já havia sido feita anteriormente com o derivado metilsulfonil de 2-propeno-1-amina (De Conti, 1996) e confirmados por experimentos de diferença de NOE (Nuclear Overhauser Effect).

O NOE é uma técnica de efeitos laterais de ressonância dupla que causa um aumento nas intensidades observadas em núcleos próximos aos núcleos duplamente irradiados. O aumento da intensidade de sinais não precisa ser devido a espaços próximos através de ligações, os núcleos

podem estar separados por várias ligações mas, devem estar acoplados no espaço, numa distância de aproximadamente 4 Å, por algum movimento de geometria ou conformação de preferência (Brown *et alli*, 1988). Este método é muito útil na distinção entre estereoisômeros quando for possível a obtenção dos espectros de ressonância dos mesmos (Silverstein *et alli*, 1991).

Para confirmar os argumentos de absorbância descritos acima, foram realizados experimentos de diferença de NOE.

Inicialmente irradiou-se o próton olefínico do isômero *E* de (5) em 6,2 ppm que levou a um efeito positivo de NOE a 7,15 ppm. Atribuiu-se então este deslocamento à prótons aromáticos do grupo fenila () (figuras 4 e 7a).

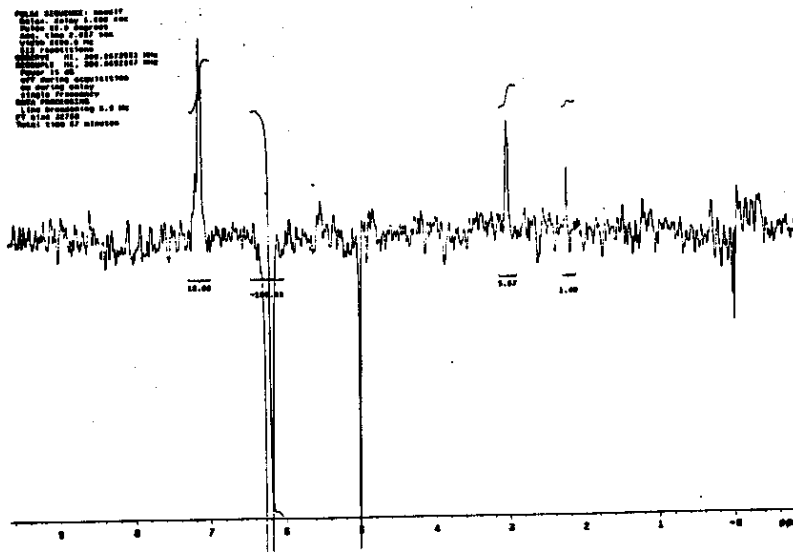
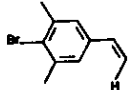
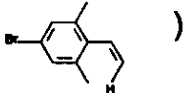


Figura 4: Dupla irradiação à 6,2ppm levou à um sinal positivo em 7,15 ppm.

Em seguida, o sinal em 7,15 ppm foi irradiado observando-se um efeito positivo de NOE a 7,4 ppm, sinal este que foi atribuído ao par de prótons em meta no grupo fenila () (figuras 5 e 7b).

Estas atribuições foram confirmadas quando a dupla irradiação em 7,4 ppm resultou em um efeito positivo de NOE apenas em 7,15 () (figura 6 e 7c).

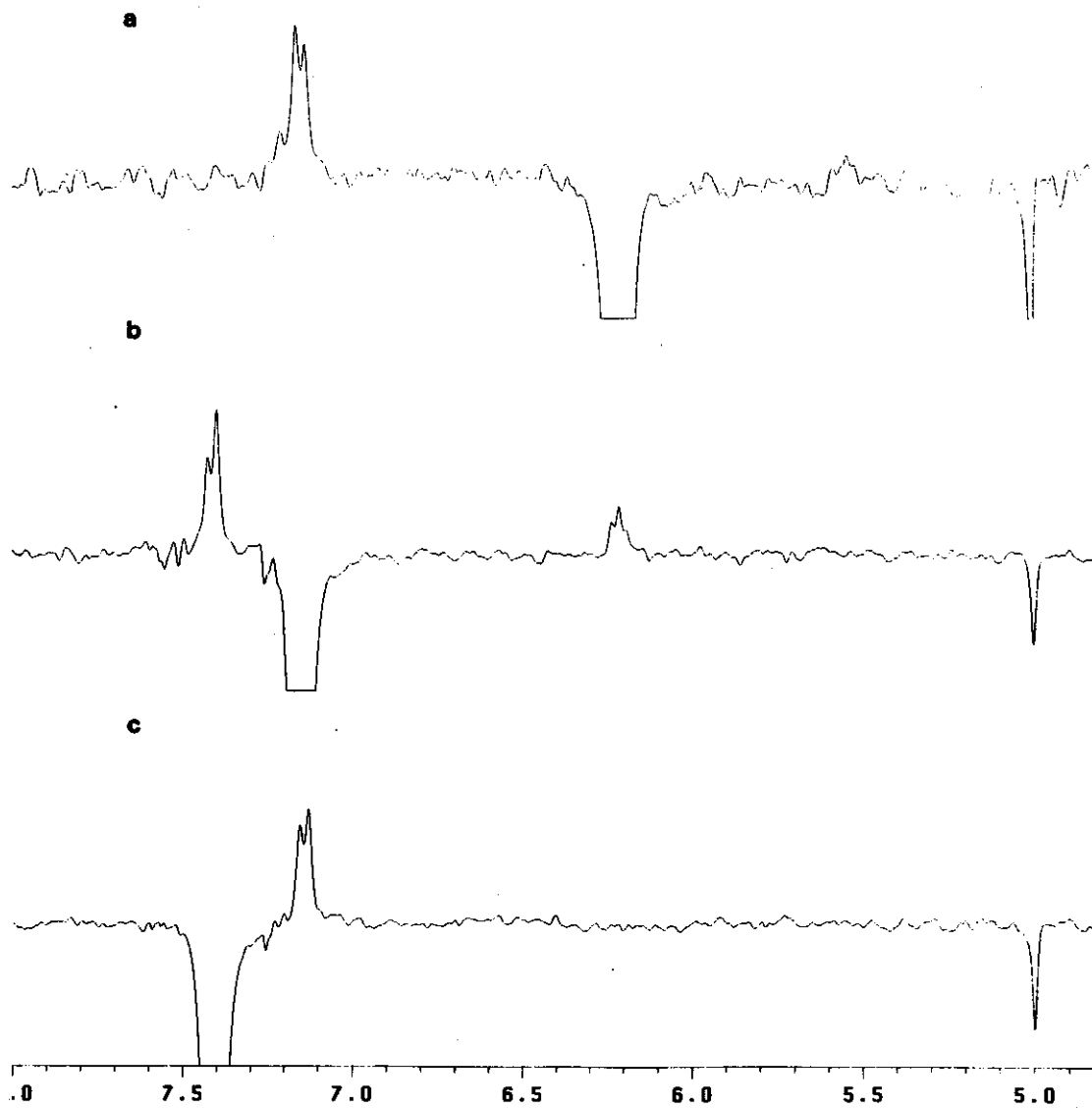
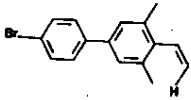


Figura 7: Experimentos de diferença de NOE para o isômero *E* de (5). a) irradiação a 6,2 ppm, b) irradiação a 7,15 ppm e c) irradiação a 7,4 ppm.

Para o isômero Z utilizou-se metodologia semelhante. A dupla irradiação inicial sobre o próton olefínico a 6,28 ppm levou a um efeito positivo de NOE a 7,31 ppm. Este sinal foi atribuído a prótons no primeiro anel aromático do grupo bifenila () (figuras 8 e 12a).

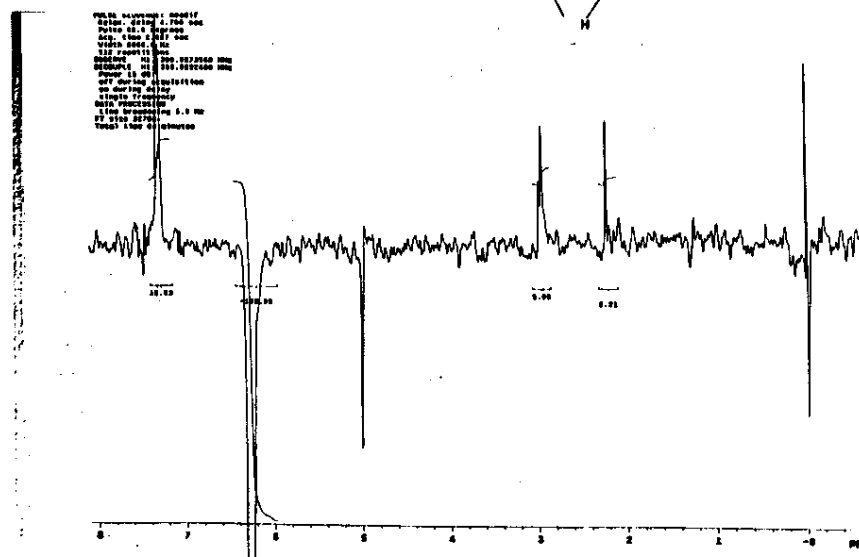
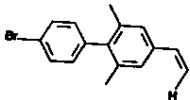


Figura 8: Dupla irradiação à 6,28 ppm levou à um sinal positivo em 7,31 ppm.

Em seguida, irradiou-se duplamente o sinal a 7,31 ppm que levou a um efeito positivo a 7,46 ppm (figuras 9 e 12b). Este sinal foi atribuído aos prótons acoplados no primeiro anel do grupo bifenila ().

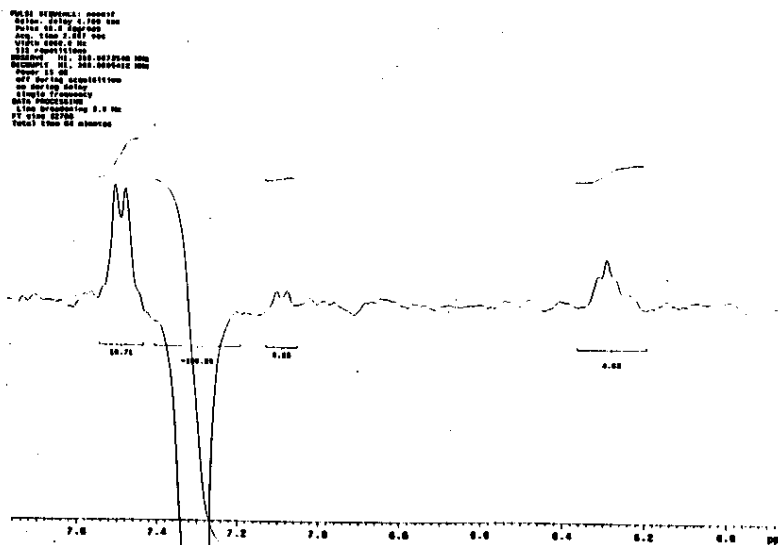
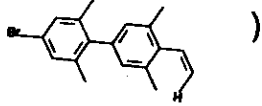


Figura 9: Dupla irradiação à 7,31 ppm levou à um sinal positivo em 7,46 ppm.

Estas atribuições foram confirmadas pela irradiação a 7,46 ppm quando se observou um efeito positivo em duas regiões: 7,31 e 7,55 ppm sugerindo a proximidade do próton a 7,46 ppm com outros prótons além daqueles em 7,31 ppm, diferindo assim do composto *E* () (figuras 10 e 12c).

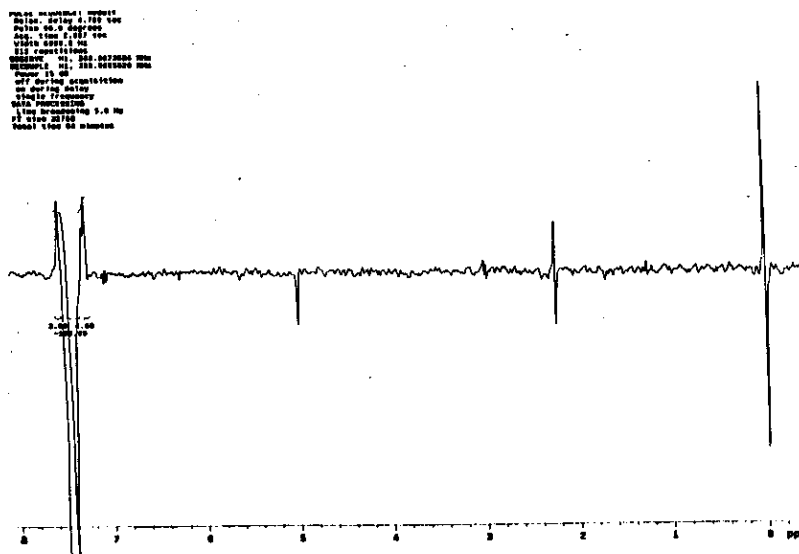


Figura 10: Dupla irradiação à 7,46 ppm levou à um sinal positivo em 7,31 e 7,55 ppm.

Para uma melhor compreensão dos experimentos realizados a figura 11 esquematiza as dupla-irradiações

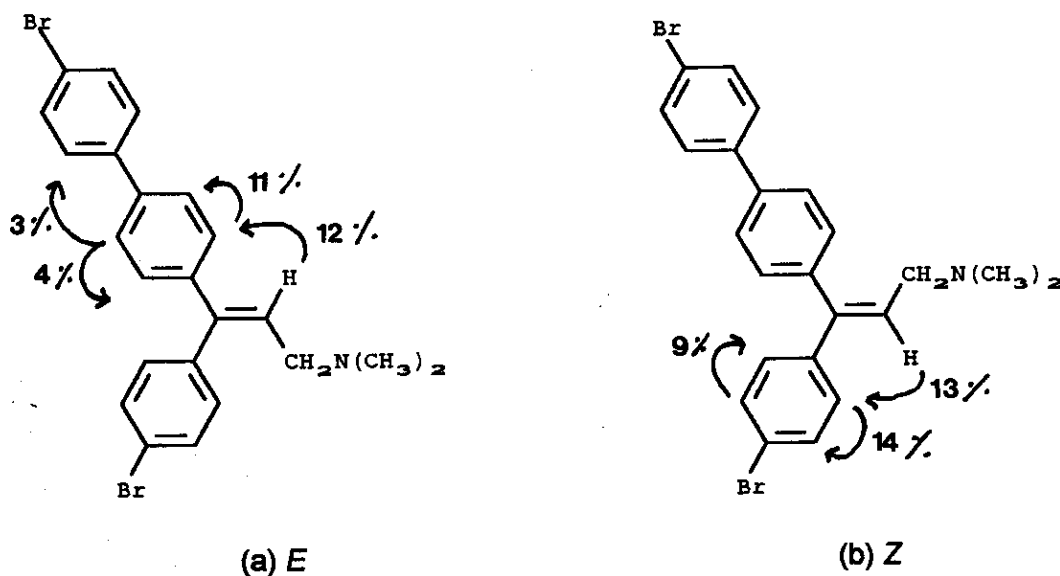


Figura 11: Experimentos de diferença de NOE realizados para identificação dos isômeros *E* e *Z* de (5). a) irradiação inicial em *Z* à 6,28 ppm, b) irradiação inicial em *E* à 6,20 ppm.

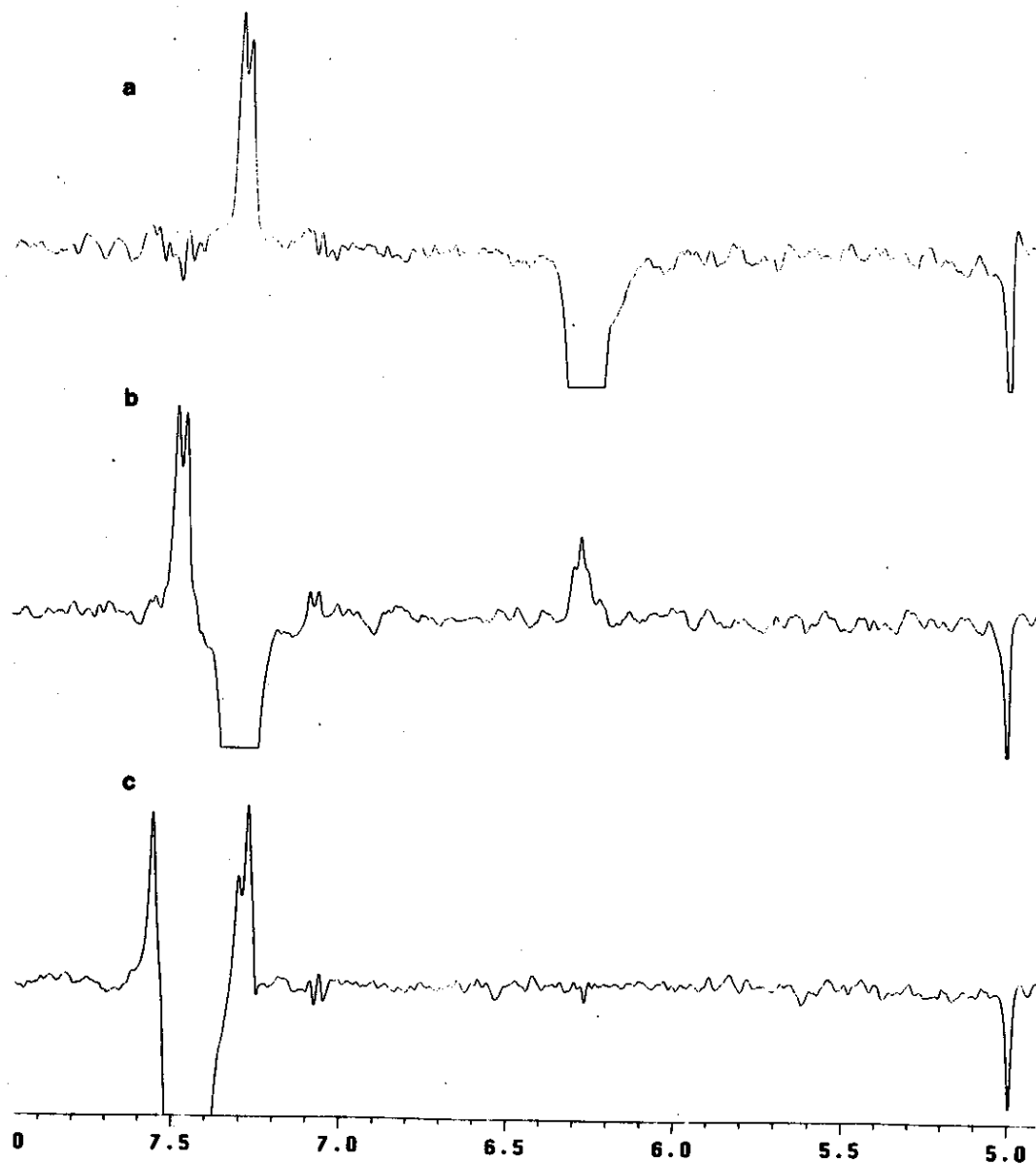


Figura 12: Experimentos de diferença de NOE para o isômero Z de (5): a) irradiação a 6,28 ppm, b) irradiação a 7,31 ppm e c) irradiação a 7,46 ppm.

3.4) AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA

Foi utilizada a forma tripomastigota (ver item 1.1 - Introdução) de *Trypanossoma cruzi* cepa Y - cepa brasileira - obtidas de camundongos infectados (De Castro *et alli*, 1987).

A forma tripomastigota foi escolhida por ser estar circulante na corrente sanguínea e portanto aquela encontrada no sangue disponível para transfusões. Além disso ensaios relacionados com a forma amastigota talvez não reproduzissem o que realmente ocorre quando da administração do fármaco pois nos indivíduos contaminados o parasita se encontra intracelularmente e nos experimentos estes se encontram em um meio de cultura.

Nestes experimentos avaliou-se o ID₅₀ - concentração de droga responsável pela eliminação de 50% dos parasitas com relação a um controle - para a mistura isomérica e para os isômeros isolados a fim de que pudessemos discriminar a existência de um isômero mais ativo ou não (**tabela 2**).

Tabela 2: ID₅₀ para tripomastigotas de *T. cruzi* submetidas a tratamento com mistura isomérica e isômeros isolados de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina

COMPOSTO	ID₅₀ /24 horas (μM)
mistura isomérica	13,1 +/- 0,6
Z	47,3 +/- 1,5
E	13,5 +/- 0,7

Os dados da **tabela 2** indicam que o isômero *E* é mais ativo que o isômero *Z* sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi* neste experimento.

Com relação a mistura podemos dizer que não existe diferença entre a atividade tripanocida desta e a atividade do isômero *E* e ao mesmo tempo é superior a do *Z*.

Em síntese, podemos estabelecer a seguinte ordem crescente para atividade tripanocida em *T. cruzi*:



Estes resultados estão de acordo ao observado anteriormente por Oliveira *et alli* (1996) mesma susceptibilidade da forma tripomastigota de *T. cruzi* a um análogo o composto 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-fenil-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (**6**) e a seus isômeros geométricos. Neste composto, o isômero com os grupos bifenila e dimetil-amino do mesmo lado recebe a denominação Z ao outro isômero atribui-se a configuração E.

Constatou-se que, semelhante a (**5**), o isômero Z ($ID_{50}=30,2$) (**6**) demonstrou ser mais ativo que o isômero E ($ID_{50}=79,0$).

Estes dados indicam uma certa afinidade do isômero *cis* aos receptores do tripomastigota, o que seria a causa de sua superior atividade (ver item 3.2 - Resultados e Discussão).

Da mesma forma podemos confirmar a importância de se avaliar a atividade biológica das diferentes formas isoméricas de uma molécula. Embora a separação dos isômeros seja mais uma etapa na obtenção do produto, o que representa custos econômicos, pode levar a um composto mais ativo, o que pode acabar representando um ganho ao final do processo.

A Violeta Genciana (VG) é o principal composto utilizado no tratamento profilático em bancos de sangue. Experimentos realizados sob as mesmas condições em formas tripomastigotas (De Conti, 1996) indicam que a mistura isomérica e os isômeros de (**5**) são mais ativos em tripomastigotas do que a VG que apresentou um ID_{50} igual a $536,6 \pm 3,0 \mu\text{M}$.

Da mesma forma os valores de ID_{50} obtidos para (**5**) podem ser comparados ao obtido com Nifurtimox (Lampit - Bayer), fármaco que foi durante anos a primeira escolha no tratamento da Doença de Chagas e que constitui, ao lado do Benzonidazol (Rochagam - Roche), os únicos fármacos recomendados pela ONU no tratamento desta doença (Siqueira-Batista *et alli*, 1996). O composto (**5**) e seus isômeros, demonstrou atividade superior

ao Nifurtimox para o qual se obteve um valor de ID_{50} igual a $157,0 \pm 3,0 \mu M$ (De Conti 1996).

3.5 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

Futuros fármacos que sobrevivem aos processos iniciais de pesquisa e caracterização quanto a sua provável ação terapêutica, precisam ser cuidadosamente avaliados quanto aos seus riscos potenciais, antes de se iniciarem os testes clínicos, ou seja, em humanos. No quadro 1 apresentam-se os testes existentes. Dependendo do uso proposto, os testes pré-clínicos podem incluir todos ou a maioria deles (Katzung, 1994):

Quadro 1: Testes pré-clínicos, realizados em animais, necessários para aprovação de um novo fármaco. (Katzung, 1994).

Teste de segurança	Abordagem
Toxicidade Aguda	Dose aguda letal em aproximadamente 50% dos animais. Determinar a dose máxima tolerada.
Toxicidade Subaguda	Administração de três dose diferentes durante um certo período (até 6 meses). Quanto mais prolongada a duração do uso clínico mais longo o teste subagudo.
Toxicidade Crônica	Um a dois anos. Necessário quando pretende-se o uso do medicamento em seres humanos por períodos prolongados. Habitualmente efetuado com o ensaio clínico.
Efeito sobre o Aparelho Reprodutor	Efeitos sobre o comportamento do acasalamento animal, reprodução, parturição, progênie, defeitos congênitos.
Potencial Carcinogênico	Dois anos. Necessário quando se pretende utilizar o medicamento em seres humanos durante períodos prolongados.
Potencial Mutagênico	Efeitos sobre a estabilidade genética das bactérias (teste de Ames) ou das células de mamíferos cultivadas; teste letal dominante em camundongos.
Pesquisa Toxicológica	Determina a sequência e os mecanismos da ação tóxica. Desenvolve novos métodos para a avaliação da toxicidade.

Embora os testes apresentados acima se refiram à legislação vigente nos Estados Unidos, a legislação é muito semelhante em quase todo o mundo. No Brasil segue-se as normas da FDA (USA).

Para a obtenção dos dados pré-clínicos é necessário utilizar um grande número de animais. Devido à constantes pressões, tanto econômicas quanto sociais, muitos esforços estão sendo despendidos no sentido de substituir os ensaios pré-clínicos, ou pelo menos uma parte deles, por ensaios *in vitro* (Riddel *et alli*, 1986; Ratner, 1990; Triglia *et alli*, 1991, Freshney, 1994, Katzung, 1994 ; Seibert *et alli*, 1996).

Dentre os ensaios que estão sendo propostos em substituição ao uso de animais, destacam-se os testes de citotoxicidade *in vitro* com culturas de células.

O uso destes sistemas *in vitro* apresenta uma série de vantagens, como p. ex. controle do ambiente físico-químico, controle das condições fisiológicas, pouca variabilidade celular e economia. Por outro lado ainda existem desvantagens a serem superadas: problemas de padronização, reprodutibilidade e disponibilidade de culturas de vários tipos de tecido (Freshney, 1994).

Alguns modelos matemáticos que objetivam correlacionar valores *in vitro* com aqueles obtidos *in vivo* vem sendo construídos. O principal objetivo está em poder-se extrapolar esses modelos na obtenção de valores preliminares de toxicidade *in vivo* a partir de dados obtidos *in vitro*. Esta abordagem tem como principal objetivo reduzir o número de animais e de ensaios necessários (Roguet *et alli*, 1993 e Gülден *et alli*, 1994).

Na avaliação da citotoxicidade de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina, composto (5), foram utilizadas células de linhagem estabelecida V-79, fibroblastos provenientes de pulmão de hamster chinês (Melo, 1996).

Para avaliação da citotoxicidade de (5) métodos com diferentes pontos finais foram utilizados.

O uso de métodos que avaliam diferentes alvos celulares, visa a aquisição de informações sobre efeitos tóxicos específicos sobre os diferentes compartimentos ou funções celulares (Renzi *et. alli*, 1993).

Dessa forma foi avaliada a capacidade citotóxica da mistura isomérica de (5) e de seus isômeros por três diferentes métodos:

- Método de Determinação do Conteúdo de DNA - avalia indiretamente o número de células após exposição a um agente tóxico;

- Método de Incorporação do Corante Vermelho Neutro - avalia o correto funcionamento dos lisossomos;

- Método da Redução do MTT - avalia o correto funcionamento da succinato desidrogenase mitocondrial.

MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA:

Após serem submetidas à exposição à droga por 24 horas, as células são fixadas e hidrolisadas com uma solução de NaOH 0,5M onde o DNA nuclear é liberado em solução.

O conteúdo de DNA é então determinado pela leitura de absorbância em 260 nm onde 50 µg/ml corresponde a uma absorbância de 1,0.

A relação percentual das absorbâncias das células tratadas em relação às não tratadas (controle - 100%) nos permite, por interpolação, determinar a IC₅₀, ou seja, concentração capaz de provocar 50 % de morte celular.

A **figura 13**, apresenta os gráficos de inibição para mistura de isômeros, isômero E e isômero Z.

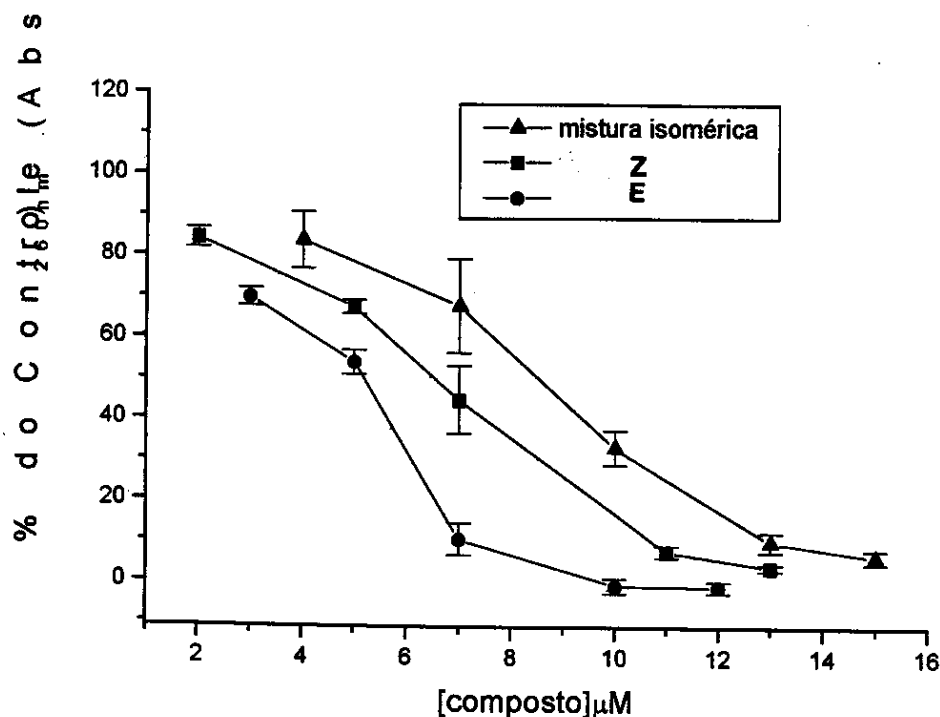


Figura 13: Curva dose-resposta para o ensaio de Proliferação Relativa realizado com a mistura isomérica, e isômeros *E* e *Z*. Cada ponto representa o valor médio obtido em 8 replicatas +/- desvio padrão

A **tabela 3** apresenta os diferentes valores de IC_{50} obtidos para (**5**) e seus isômeros.

Tabela 3: Valores de IC_{50} (μM) obtidos no experimento de determinação do conteúdo de DNA para E/Z-3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina e para os isômeros *Z* e *E*. Resultados significativamente diferentes. Métodos de análise estatística ANOVA seguida de Teste de Fisher.

COMPOSTO	IC_{50} (médio) μM
mistura isomérica	8,36 +/- 0,52*
Z	6,81 +/- 0,52*
E	5,20 +/- 0,13*

* = $P < 0,0001$

A **tabela 3** demonstra que neste ensaio o isômero *E* foi o composto mais tóxico seguido do isômero *Z* e da mistura.

Podemos afirmar que com relação sobrevivência celular, os isômeros isolados tendem a ser mais tóxicos do que a mistura deles. Em ordem crescente de toxicidade:



MÉTODO DE INCORPORAÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO:

Após exposição às substâncias teste, as células são incubadas, por três horas, com uma solução de VN diluída em meio DMEM numa concentração de 50 µg/ml. Findo este período as células são lavadas com solução tampão PBS Ca⁺² e Mg⁺² e o corante absorvido é retirado do interior das células quando da adição de 1 mL em cada poço de uma solução etanol/ácido acético/água 50:1:49. O corante incorporado pelas células é medido pela leitura de absorbância desta solução a 540 nm.

A relação percentual das absorbâncias das células tratadas em relação às não tratadas (controle - 100%), nos fornece o valor de IC₅₀ (µM) - concentração de droga que induz uma redução de 50% na incorporação do corante.

Compostos anfifílicos os quais possuem uma região hidrofóbica e um grupamento amino primário ou substituído podem induzir lipidose, provavelmente como consequência da interação com fosfolipídeos, desestabilizando estruturas de membrana e se acumulando nos lisossomos. Estes compostos são denominados lisossomatrópicos (De Conti, 1996).

Algumas drogas que induzem lipidose afetam o sistema nervoso central. O efeito colateral de alteração do tecido ocular podendo levar ao desenvolvimento de catarata, causado por cloroquina e amiodarone (duas drogas anfifílicas) está relacionado a alterações do tipo lipidose (Lüllmann *et alli.*, 1978). Desta forma é interessante avaliar alguma afinidade relativa do composto 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina e de seus isômeros por lisossomos.

A figura 14 apresenta as curvas dose-resposta de incorporação de VN para a mistura isomérica e para os isômeros Z e E.

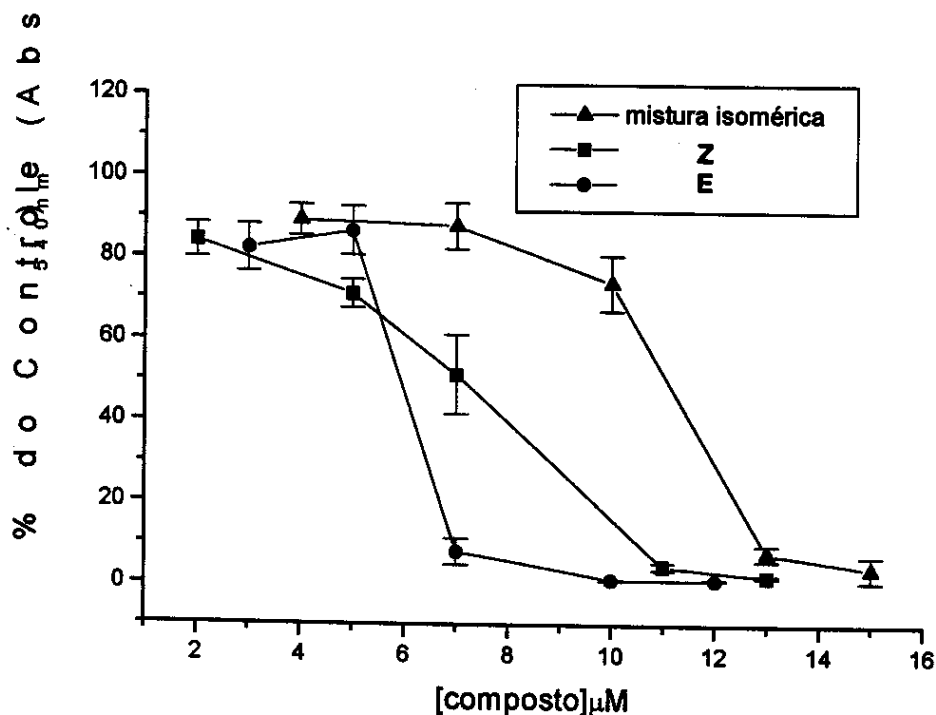


Figura 14: Curvas dose-resposta para o ensaio de Incorporação do Corante Vermelho Neutro realizado com mistura isomérica e isômeros Z e E de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno 1 amina (5). Cada ponto representa o valor médio obtido em 8 replicatas +/- desvio padrão.

A tabela 4 apresenta os diferentes valores de IC_{50} obtidos para o composto (5) e seus isômeros.

Tabela 4: Valores de IC_{50} (µM) obtidos no experimento de Incorporação do Corante Vermelho Neutro para E/Z-3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno 1 amina (5) e para os isômeros Z e E. Resultados significativamente diferentes. Métodos de análise estatística: ANOVA seguido de Teste de Fisher (vide item 4.6 - Experimental)

COMPOSTO	IC_{50} (médio) µM
mistura isomérica	11,07 +/- 0,18 *
Z	7,10 +/- 0,73 *
E	5,93 +/- 0,06 *

* = $P < 0,0001$

Neste experimento, o corante fracamente catiônico penetra através de membranas celulares por processos de difusão passivos não-iônicos e se concentra nos lisossomos, aonde se liga, por ligações eletrostáticas, à grupos fosfato e/ou aniônicos da matrix lisossomal (Repetto e Sanz, 1993).

Alterações da superfície celular ou sensibilização da membrana lisossomal parece levar a fragilidade lisossomal e outras mudanças que se tornam gradualmente irreversíveis. Tais mudanças, causadas por xenobióticos, resultam num decréscimo da incorporação do Vermelho Neutro sendo possível, através deste método, distinguir entre células viáveis, danificadas ou mortas (Borenfreund e Puerner, 1984). Devido a esta característica, este corante é utilizado para avaliação da integridade dos lisossomos após exposição à droga.

Os dados da **tabela 4** indicam uma maior atividade citotóxica do isômero *cis* com relação ao seu isômero e à mistura deles, e que, de uma forma geral, os isômeros tendem a ser mais tóxicos do que a mistura deles neste ensaio. A ordem crescente de citotoxicidade no ensaio de VN obtida foi:

mistura isomérica < Z < E

MÉTODO DA REDUÇÃO DO MTT:

Após tratamento com a solução de MTT (vide ítem 4.6 - Experimental), o complexo azul formado é dissolvido em etanol e a absorbância desta solução é lida em 570 nm. A relação percentual das absorbâncias das células tratadas em relação às não tratadas (controle 100%), fornece o valor da concentração que induz uma inibição de 50 % da redução do sal (IC_{50}).

O sal MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio é clivado pela succinato desidrogenase. Esta enzima pertence ao chamado ciclo de Krebs, via final comum a que convergem a maioria das moléculas

energéticas, para produção de energia. O propósito deste ciclo é desidrogenar o ácido acético formando CO_2 e átomos de hidrogênio, cujos elétrons passam ao átomo de oxigênio através do mecanismo de transporte de elétrons. Muita energia é liberada neste transporte a qual é acumulada na forma de ATP (Lehninger, 1980).

A reação de clivagem do MTT se dá apenas em células intactas, o que torna este método útil na determinação de sobrevivência celular (Denizot e Lang, 1986).

As curvas dose-resposta obtidas para a mistura isomérica e isômeros Z e E de (5) encontram-se na figura 15.

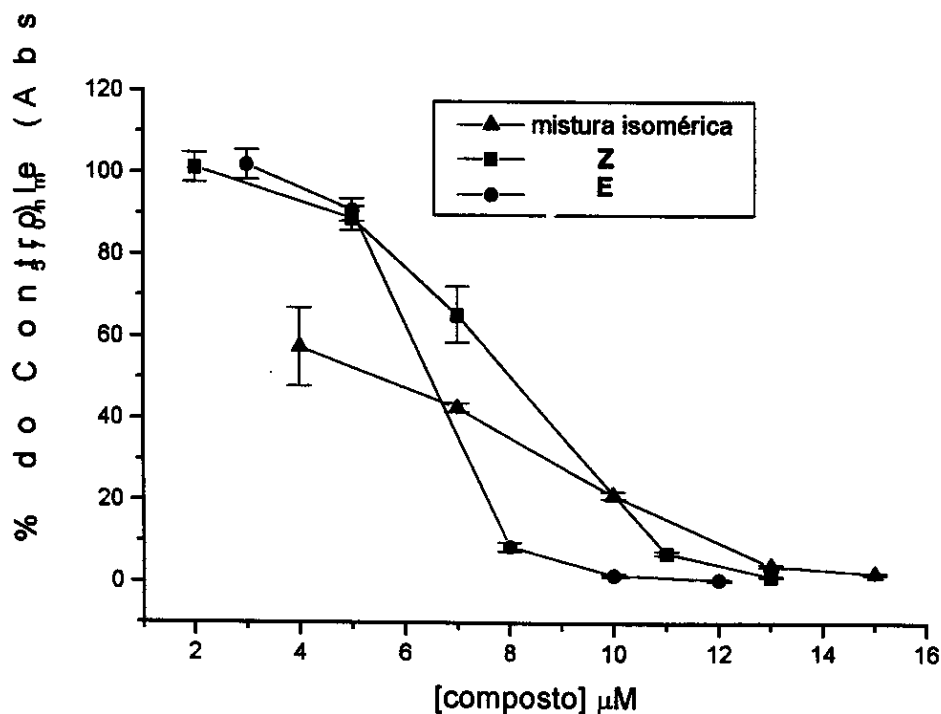


Figura 15: Curva dose-resposta para o ensaio de Redução do MTT realizado com *E/Z*-3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-*N,N*-dimetil-2-propeno-1-amina e isômeros *E* e *Z*. Cada ponto representa o valor médio obtido em 8 replicatas \pm desvio padrão.

Com estes dados obteve-se os valores de IC_{50} expressos na **tabela 5**.

Tabela 5: Valores de IC_{50} (μM) obtidos para *E/Z*-3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-*N,N*-dimetil-2-propeno 1 amina (**5**) e para os isômeros *Z* e *E*. Resultados significativamente diferentes. Métodos de análise estatística: ANOVA seguido de Teste de Fisher.

COMPOSTO	IC_{50} (médio) μM
mistura isomérica	5,64 +/- 0,38 *
<i>Z</i>	8,03 +/- 0,36 *
<i>E</i>	6,49 +/- 0,06 *

*= $P < 0,0001$

Ao contrário do observado nos experimentos anteriores, a mistura isomérica demonstrou ser mais tóxica ($IC_{50} = 5,64 \mu M$) do que os isômeros. Na sequência obteve-se o isômero *E* ($IC_{50} = 6,49 \mu M$) com uma citotoxicidade intermediária e por último o isômero *Z* como o isômero menos tóxico ($IC_{50} = 8,03 \mu M$).

Analisando os resultados por experimento verificamos que o isômero *E* demonstrou ser o mais citotóxico nos experimentos de Proliferação Relativa e Incorporação de VN. No ensaio de Redução de MTT, a mistura isomérica foi o composto testado mais tóxico. Ainda nos dois primeiros experimentos, podemos afirmar que os isômeros, quando isolados tendem a ser mais tóxicos do que quando em mistura (**figura 16**).

Analisando os resultados de cada substância testada e da mistura em cada teste, verificamos que a mistura isomérica demonstrou ser mais tóxica no ensaio de redução do MTT e menos tóxica para o ensaio de incorporação de VN.

Já para o isômero *Z* observou-se que não há diferença significativa entre os resultados obtidos com o experimento de determinação do conteúdo de DNA e incorporação de VN porém, este composto demonstrou ser mais tóxico, quando avaliados por esses experimentos, do que quando avaliado através do método de Redução de MTT.

Observando-se os dados obtidos para o isômero *E*, verificou-se que este é mais tóxico quando avaliado pelo método de determinação do conteúdo de DNA e menos tóxico quando medido pela redução de MTT.

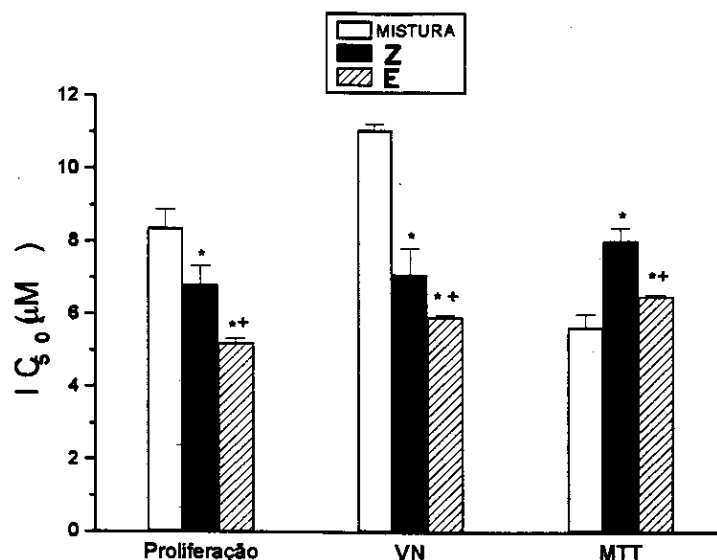


Figura 16 : Análise por grupos (Determinação do Conteúdo de DNA, VN e MTT) dos valores de IC_{50} (μM) obtidos para 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno 1 amina (**5**) e para os isômeros Z e E. Resultados significativamente diferentes da mistura * = $P < 0,0001$ e do isômero Z + = $P < 0,0001$. Métodos de análise estatística: ANOVA seguido de Teste de Fisher.

3.6) AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM BACTÉRIAS *Escherichia coli*

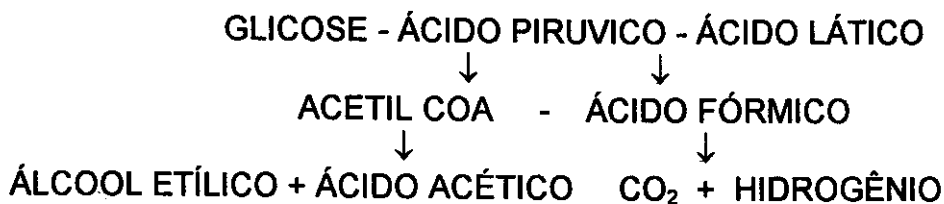
Neste ensaio, a inibição da respiração microbiana é o parâmetro utilizado para avaliar potencial tóxico do agente estressante.

Glicose é fermentada por muitas bactérias segundo vias diferentes. A fermentação da glicose pela *E. coli* resulta numa mistura de produtos ácidos, gases e num produto neutro (**esquema 2**) (Moraes, 1995).

Os compostos a serem testados foram adicionados à várias concentrações a um meio de cultura líquido contendo *E. coli*. O CO_2 , produto da respiração microbiana, é monitorado a cada 20 minutos em um sistema

FIA condutimétrico para avaliação da atividade metabólica do microorganismo.

Esquema 2: Respiração anaeróbica de bactéria *E. coli*.



Um pequeno volume de amostra contendo as espécies carbônicas (CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-}) é injetada manualmente em um fluxo carreador (água deionizada) a qual conflui com uma solução de ácido diluído (H_2SO_4 , 0,2M). O gás formado CO_2 se difunde através de uma membrana de PTFE [poly-(tetrafluoretileno)] para um outro fluxo de água. A mudança na condutividade no último fluxo é proporcional a concentração de espécies carbônicas contidas em solução (Jardim *et alli*, 1991).

A atividade microbiana relativa ao controle é calculada e por interpolação obtém-se o valor da concentração que induz inibição de 50% da atividade microbiana, o EC_{50} .

Os dados obtidos nos experimentos com *E. coli* frente ao composto (5) e seus isômeros encontram-se na **tabela 6**.

Tabela 6: Valores de ID_{50} obtidos para (5) e para seus isômeros *E* e *Z* em experimentos com *E. coli*.

COMPOSTO	EC_{50} (médio) μM
mistura isomérica	0,14
Z	2,19
E	0,71

Verificou-se que a mistura isomérica é mais tóxica ($\text{EC}_{50} = 0,14 \mu\text{M}$) para estas bactérias do que os os isômeros *Z* e *E* ($\text{EC}_{50} = 2,19$ e $0,71 \mu\text{M}$ respectivamente).

A **tabela 7** apresenta todos os resultados obtidos para que as comparações e conclusões sejam melhor compreendidas.

Tabela 7: Síntese dos resultados obtidos nos experimentos onde ID₅₀ - concentração que elimina 50% da população parasitária, IC₅₀ - concentração de inibição de 50% da atividade medida e EC₅₀ - concentração que elimina 50% da respiração microbiana.

EXPERIMENTO	E	Z	MISTURA ISOMÉRICA
Atividade Tripano/a ID ₅₀ (μM)	13,5 +/- 0,7	47,3 +/- 1,5	13,1 +/- 0,6
DNA IC ₅₀ (μM)	5,2 +/- 0,13	6,81 +/- 0,52	8,36 +/- 0,52
VN IC ₅₀ (μM)	5,93 +/- 0,06	7,10 +/- 0,73	11,1 +/- 0,18
MTT IC ₅₀ (μM)	6,49 +/- 0,06	8,03 +/- 0,36	5,64 +/- 0,38
<i>E. coli</i> IC ₅₀ (μM)	0,71	2,19	0,14

3.7) CONCLUSÕES

O uso da cromatografia de alta eficiência (CLAE/ HPLC) com coluna de sílica demonstrou ser uma boa técnica para separação dos isômeros *trans* e *cis* de (5). Melhores relações tempo dispendido/ massa de composto obtida poderão ser obtidos quando do uso da técnica preparativa.

Com relação à atividade biológica podemos dizer que o isômero *E* é o mais ativo entre os isômeros na maioria dos testes realizados pois:

- foi o mais efetivo na eliminação de tripanossomas de *T. cruzi*.
- foi o mais tóxico frente a bactérias *E. coli*.
- foi o mais tóxico frente à células V-79

4. EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

CROMATOGRAFIA:

As colunas cromatográficas foram feitas com Sílica Gel 60 Å (200-400 mesh) marca Aldrich e as placas preparativas com Sílica Gel TLC 2 - 25µm com indicador, marca Aldrich.

Os experimentos em HPLC foram feitos no cromatógrafo modelo Waters 600E Millipore com coluna Hi-Chrom preparative HPLC column, Spherisorb S5W 5µ 25cm x 10mm.

DADOS FÍSICOS:

Os espectros de IV foram obtidos nos aparelhos Bomem FTIR MB-Series e Perkim Elmer 1600 FTIR. As absorções relativas estão indicadas em cm^{-1} .

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, bem como todas as técnicas de ressonância aplicadas, foram obtidos nos aparelhos Bruker AC 300 P e Varian Gemini 2000. Os deslocamentos químicos estão descritos em partes por milhão (ppm), utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS). Os dados de RMN estão relatados na sequência: deslocamento químico (multiplicidade, número de hidrogênios - hidrogênio correspondente quando possível e constante de acoplamento (J) em Hz). As abreviaturas utilizadas para indicar a multiplicidade dos sinais de RMN são: s= singleto, d= dubleto, t= tripleto e m= multipeto.

Os espectros de massa foram obtidos no aparelho VG-AutoSpec da Fisons Instruments utilizando uma energia ionizante de 70 eV por impacto de elétrons. Os dados estão indicados na seguinte forma: m/e (u.m.a.), (fragmentos representativos).

Os espectros de absorção no UVMIS foram feitos no espectrofotometro Beckman DU-640B.

As leituras de absorbância UVMIS realizadas com as células foram feitas no espectrofotômetro Beckman DU-70.

As determinações de ponto de fusão foram feitas nos aparelhos Mettler FP5 acoplado a um microscópio Carl Zeiss SZ-BR e Aparelho de Ponto de Fusão MQAPF-301 da Microquímica.

SOLUÇÕES:

- Soluções utilizadas em experimentos com células V-79:

Meio de cultura: Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM comercial (Nutricell) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino.

Solução ATV: Feita ao se misturar 1 volume de solução tripsina 0,25% e 4 volumes de solução Versene. Esterilizar por filtração (filtro 0,22 μm). Solução Versene - NaCl 80g, KCl 2,0g, Na_2HPO_4 11,5g, KH_2PO_4 2,0g Versene (EDTA: sal dissódico do ácido diamino etanotetracético) 2,0g, Phenol red 1% 15 ml e água destilada para 10 litros. Solução de Tripsina - Solução 0,25% em sol. tampão PBS-A gelada. Solução PBS-A - NaCl 10g, KCl 0,25g, Na_2HPO_4 1,44g, KH_2PO_4 0,25g. Dissolver em 1 litro de água destilada e acertar o pH para 7,2.

Solução de Tampão PBS Ca^{+2} e Mg^{+2} : Na preparação de 500ml desta solução mistura-se 400ml de solução PBS-A com 50ml de solução PBS-B e 50 ml de solução PBS-C. Solução PBS-B - dissolver 1,0g de CaCl_2 em 1 litro de água destilada. Solução PBS-C - dissolver 1,0 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 1 litro de água destilada. Misturar as soluções na hora de utilizar o tampão.

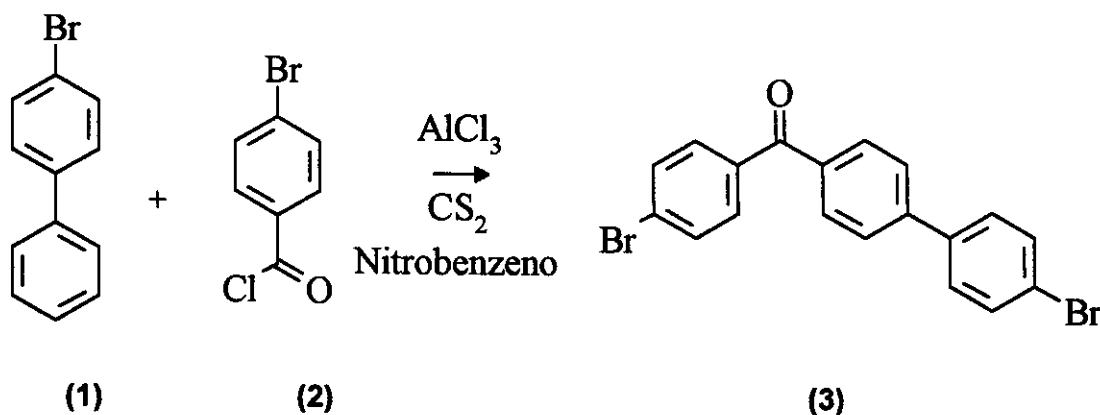
- Meio de cultura utilizado nos experimentos com *Escherichia coli*:

Dissolve-se em 800ml de água destilada os seguintes sais: KH_2PO_4 3,0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0g, ácido cítrico 0,5g, K_2HPO_4 7,0g e $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2g. Acertar o pH desta solução a 7,2 com hidróxido de sódio.

Prepara-se 200ml de uma solução de glicose 10% p/v.

As duas soluções são aquecidas a fervura e então misturadas.

4.2 SÍNTESE DE 4'-BROMO-(1,1'-BIFENIL)-4-IL,4-BROMO-FENIL-METANONA (3)



A uma solução de cloreto de ácido p-bromobenzóico **(2)** (0,439 g; 2,0 mmol) e cloreto de alumínio (0,400 g; 3,0 mmol) em dissulfeto de carbono (5 mL), foi adicionado 4-bromobifenila **(1)** (0,393g; 1,7 mmol) sob agitação e à temperatura ambiente. A solução heterogênea, inicialmente esverdeada, foi refluxada por 8 horas, adquirindo então uma tonalidade marrom. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de gelo. O solvente foi evaporado e, com o auxílio de um funil de separação, o produto reacional foi extraído com diclorometano (50 ml). Esta fase orgânica foi lavada com água (3 X 30 ml), solução aquosa de hidróxido de sódio à 10% (3 X 30 ml) novamente com água (3 X 40 ml) e seca sob sulfato de magnésio anidro. Após filtração e remoção do solvente à vácuo, obteve-se um produto sólido cristalino amarelado o qual foi purificado por cristalização em diclorometano/hexano. O sólido branco cristalino obtido (0,566g; 1,36 mmol; 80 % de rendimento) foi caracterizado como 4' - bromo (1,1' - bipenil) - 4 - il, 4 bromo-fenil-metanona **(3)**.

DADOS ESPECTRAIS:**RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS, ppm) (CE01)**

7,90 - 7,48 - (m, 12H- aromáticos)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS, ppm) (CE02)195 (C=O); 144 (C); 139 (C); 136 (C); 136 (C); 132 (CH); 132 (CH); 132 (CH);
131 (CH); 129 (CH); 128 (C); 127 (CH); 123 (C)**RMN ¹³C - Dept (300 MHz, CDCl₃/TMS, ppm) (CE03)**

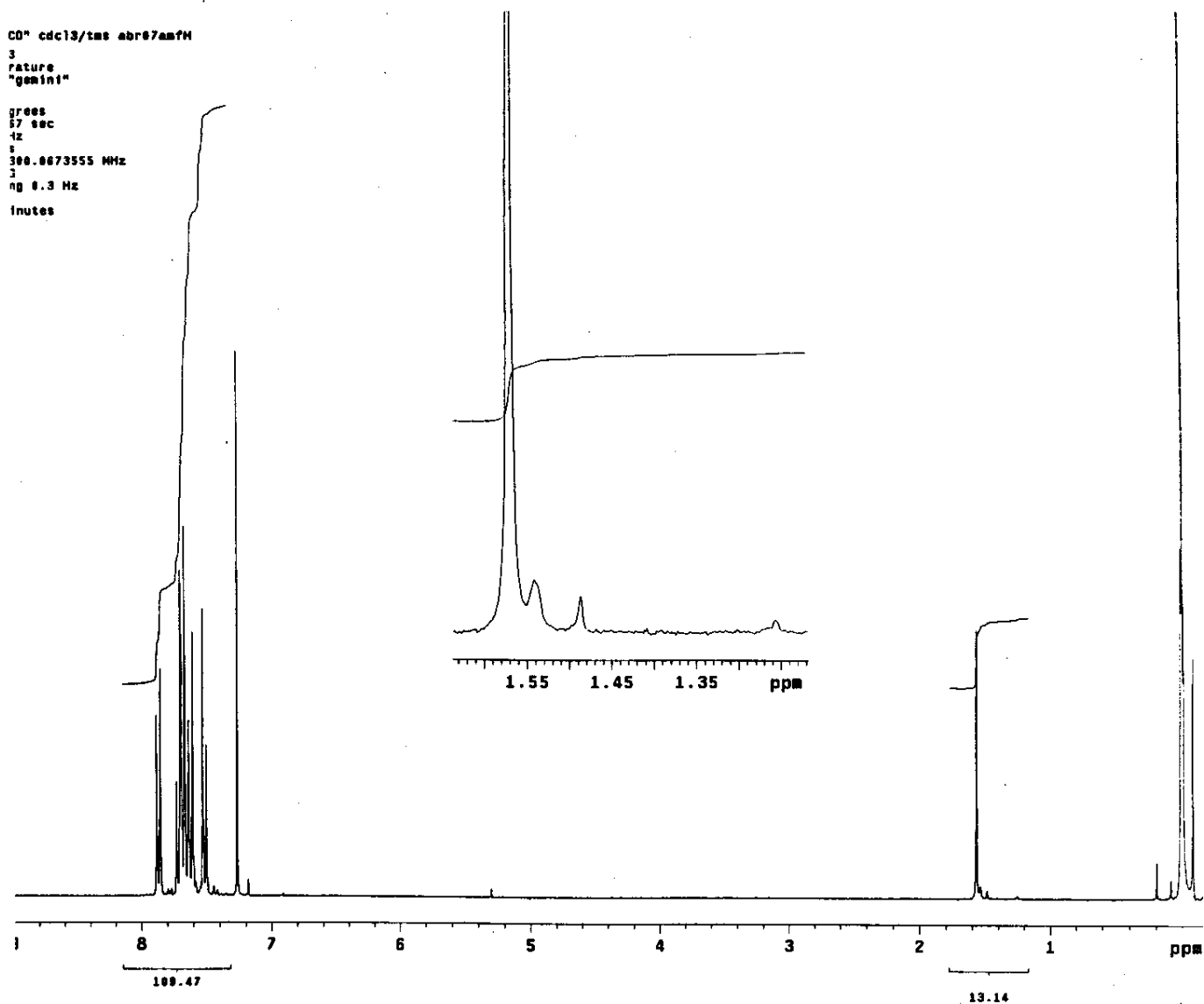
sinais positivos: 132; 132; 132; 131; 129; 127 - (CH)

IV (filme, diclorometano, cm⁻¹) (CE04)

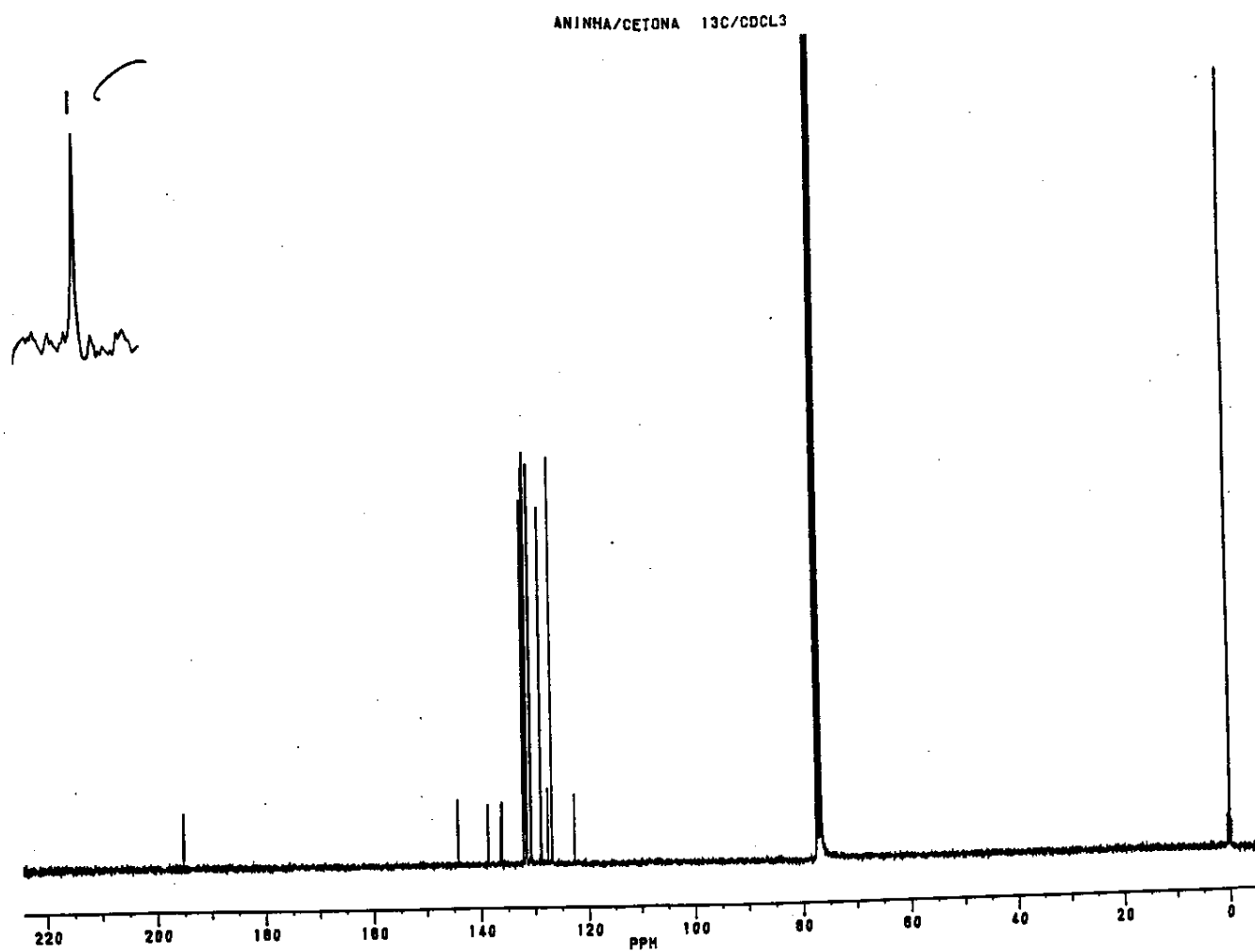
1644 (C=O); 817 e 758 (CH aromático)

EM (m/e) (CE05)419 (M⁺⁴-1); 418 (M⁺⁴-2); 417 (M⁺²-1); 416 (M⁺²-2); 415 (M⁺¹-1); 414(M⁺¹-2); 337 e
335 (M⁺¹ - Br); 259 (M⁺¹ - (C₆H₄)Br); 183 (M⁺¹ - (C₆H₄)₂Br); 152; 76**UV (nm, diclorometano) (CE06)** $\lambda_{\text{máx}} = 294$ (c= 1,29 x 10⁻² mg/ml)**PONTO DE FUSÃO:**

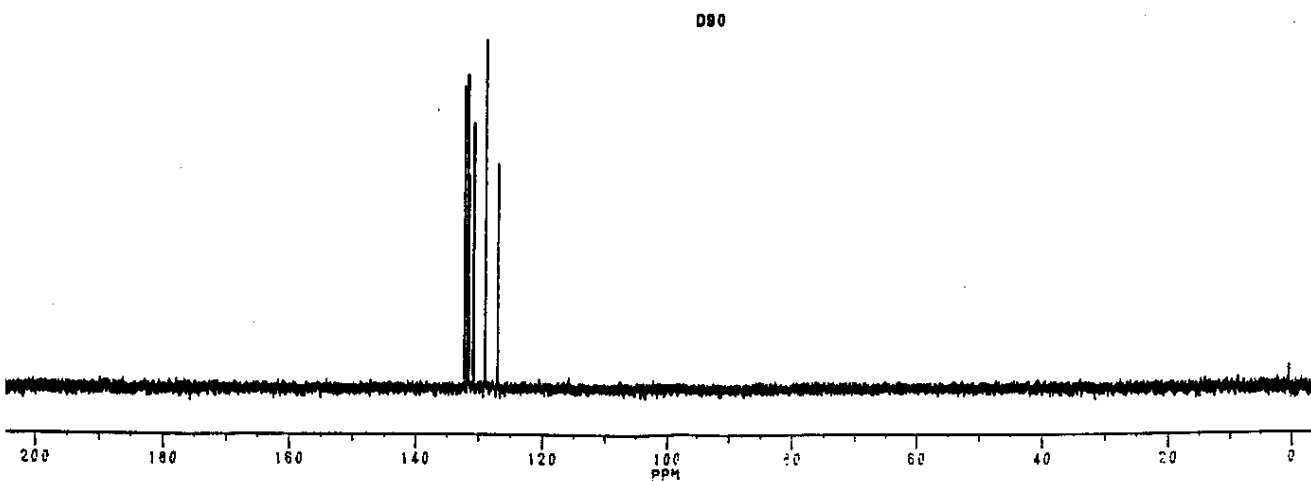
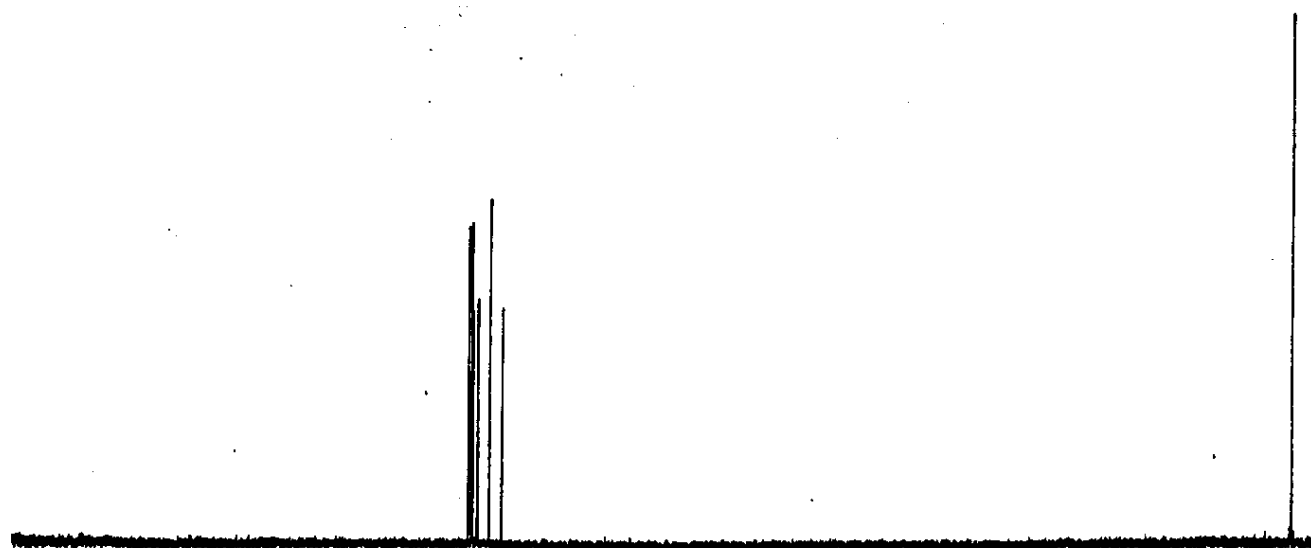
215 °C

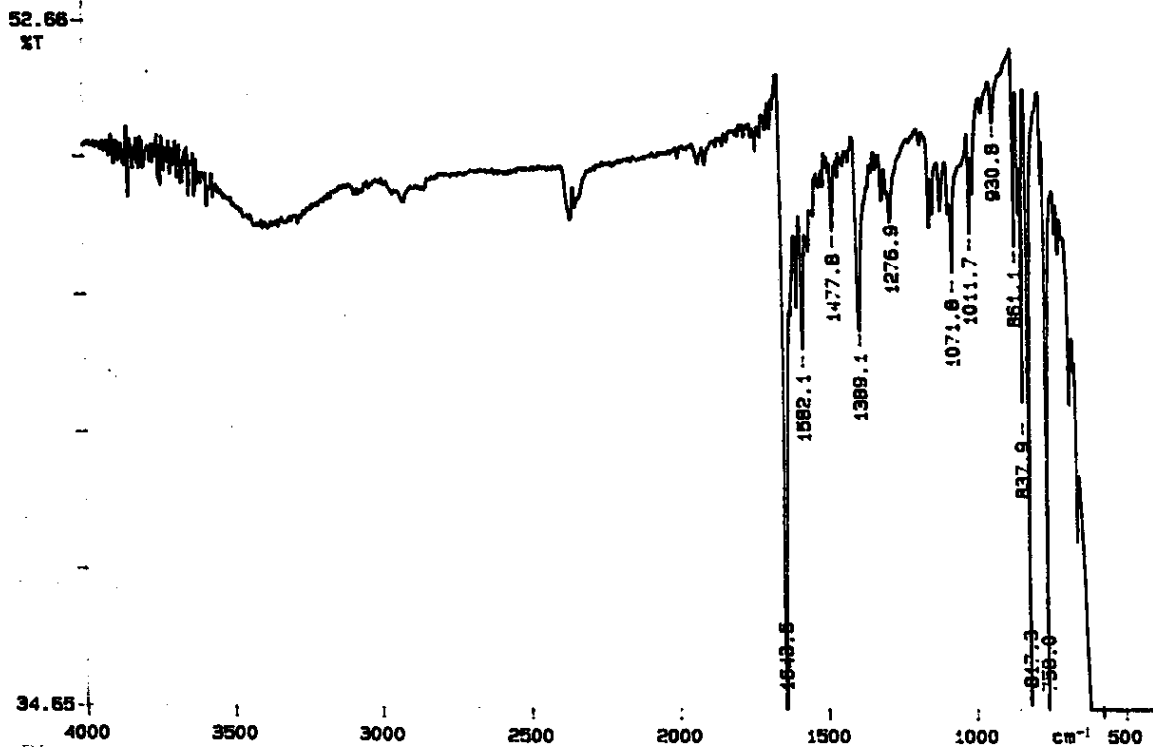
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS , ppm) - CE01

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS, ppm) - CE02

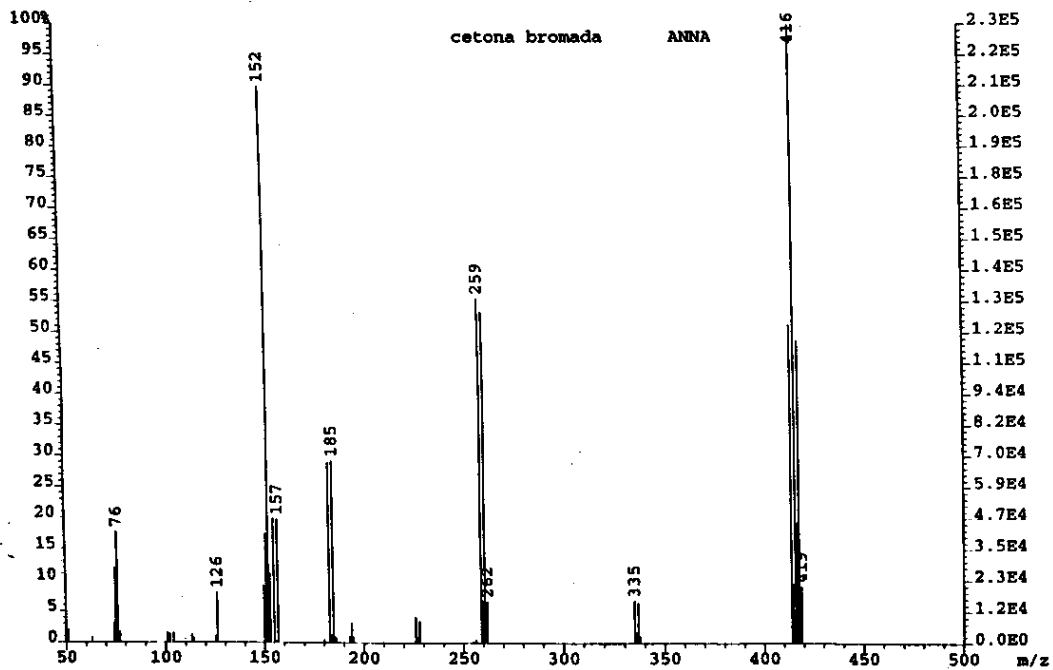


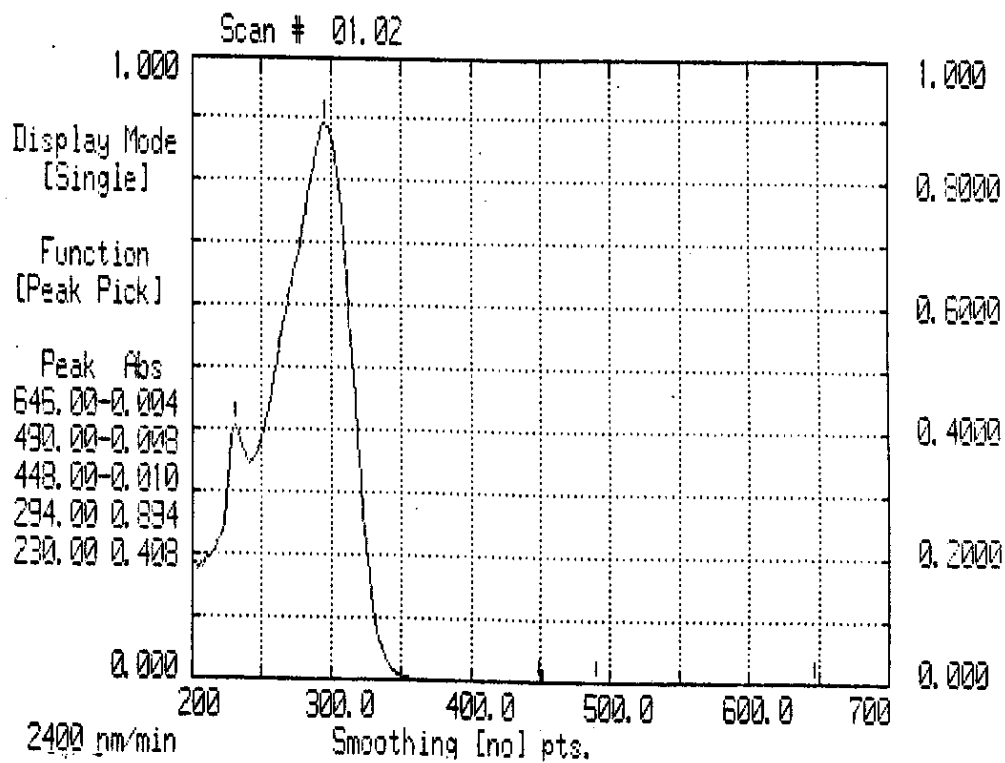
RMN ^{13}C - Dept (75 MHz, CDCl_3/TMS , ppm) - CE03



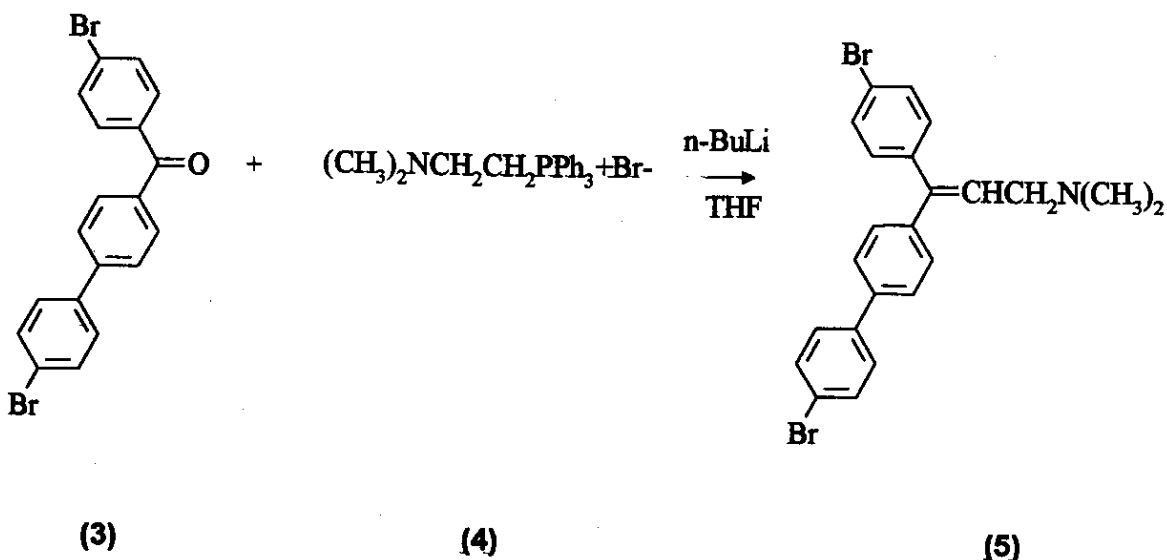
IV (filme, diclorometano, cm^{-1}) - CE04**EM (m/e) - CE05**

File:JUN17 Ident:194 Acq:17-JUN-1997 10:18:33 +34:14 Cal:JUN17
 AutoSpec EI+ Magnet BpI:234835 TIC:1577501 Flags:HALL



UV (nm, diclorometano) - CE06

4.3 SÍNTESE DE 3-(4'-BROMO-[1,1'-BIFENIL-4-IL])-3-(4-BROMO-FENIL)-N,N-DIMETIL-2-PROPENO-1-AMINA



A uma solução de brometo de (2-dimetilaminoetil) - trifenilfosfônio (0,97g; 2,33 mmol) (4) em tetraidrofurano (10 ml) adiciona-se lentamente, sob atmosfera de argônio, 1,5 ml (2,4 mmol) de uma solução 1,6 Molar de n-butil lítio em hexano, mantendo-se agitação e a temperatura a 0°C. A mistura reacional é mantida à 0°C e atmosfera inerte por um período adicional de 30 minutos quando então a solução adquire uma coloração castanha. Em seguida, adiciona-se 4'-bromo (1,1' - bifenil) -4- il, 4- bromo fenil metanona (0,43g; 1,04 mmol) (3). A solução é mantida sob agitação e a temperatura ambiente por mais 6 horas. A coloração desta mistura torna-se esverdeada. Após este período, o solvente é evaporado a vácuo e o produto bruto reacional é extraído com diclorometano (3X20ml). A fase orgânica é lavada com o mesmo volume de água. Após secagem com sulfato de magnésio anidro, a fase orgânica é filtrada e o solvente evaporado a vácuo. Purificação em coluna cromatográfica acetato de etila/metanol de polaridade crescente 0 - 15% seguido a c.c.p. com eluição de acetato de etila/metanol 15% fornece o produto 3- (4' - bromo - [1,1' - bifenil] -4- il) -3- (4- bromo - fenil) -N,N - dimetil -2- propeno -1- amina como uma mistura de óleo amarelo e cristais

brancos(0,170g; 0,36 mmol) (**5**) com rendimento de 35%. O produto é obtido na proporção 1:1 de seus isômeros geométricos *E* e *Z*.

DADOS ESPECTRAIS:

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃/TMS, ppm) (PE01)

7,6 - 7,04 [m, 12H-aromáticos]; 6,28 e 6,22 [2t, 1H-C=CH, J=7Hz]; 3,08 e 3,03 [2d, 2H-CH₂N, J=7Hz]; 2,27 e 2,26 [2s, 6H-N(CH₃)₂]

I.V. (filme, diclorometano, cm⁻¹) (PE02)

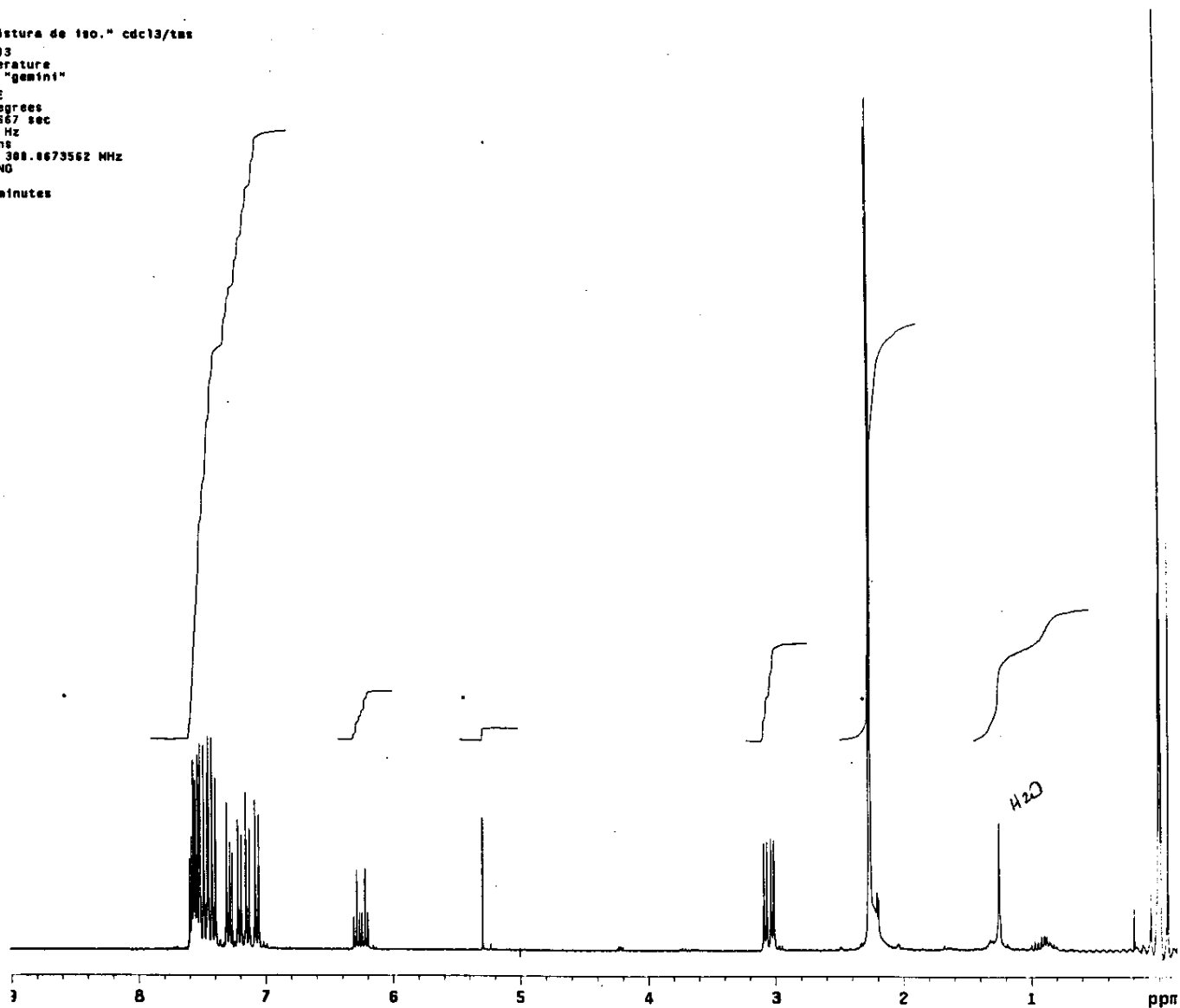
1654 (C=C); 812 e 737 (CH aromático)

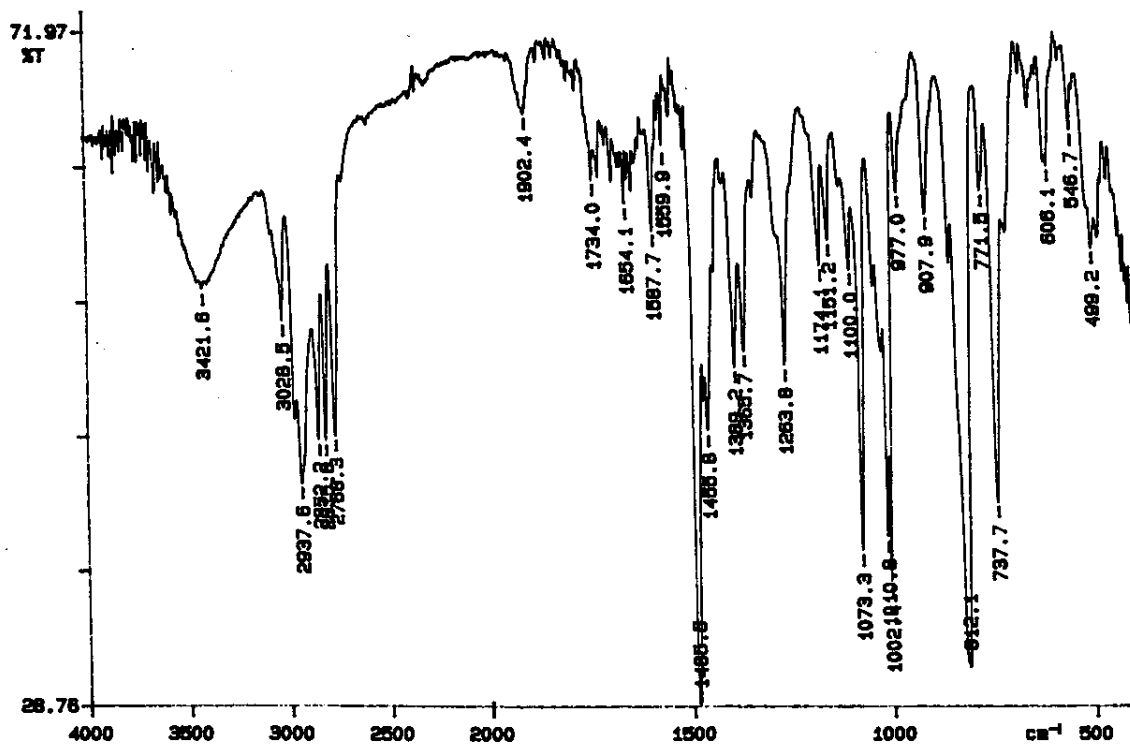
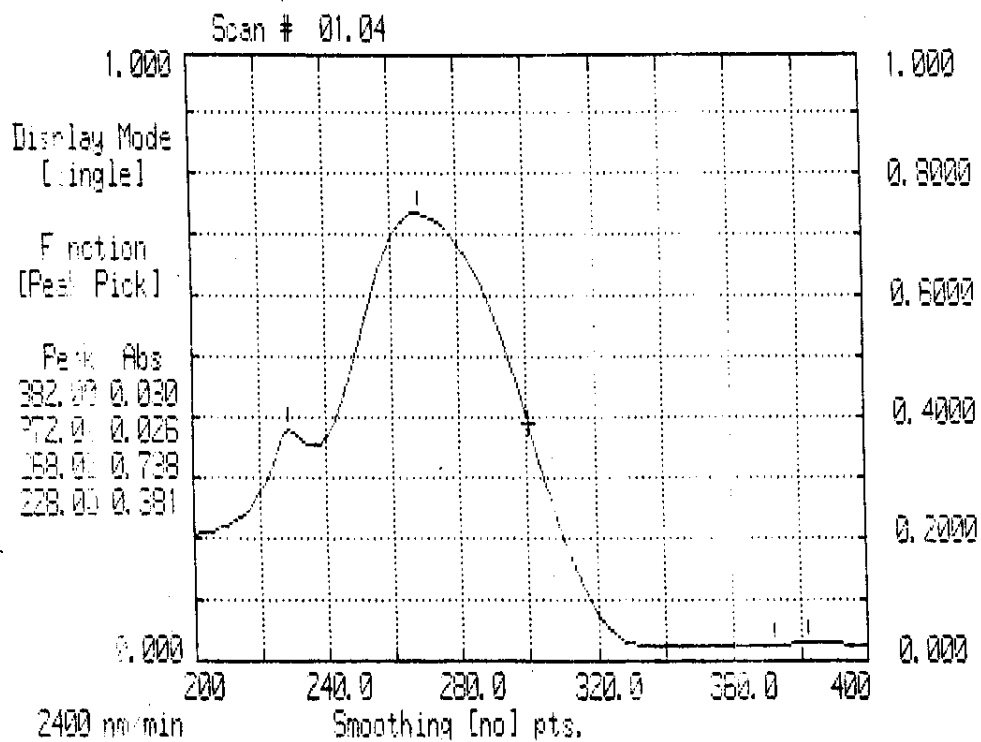
U.V. (nm, diclorometano) (PE03)

$\lambda_{\text{máx}} = 268$ (c = $2,5 \times 10^{-2}$ mg/ml)

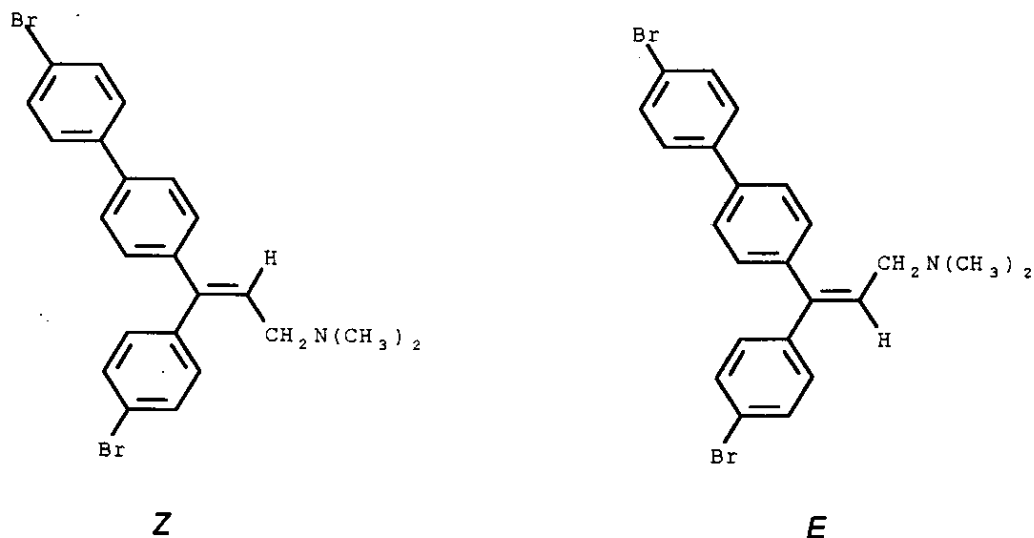
RMN ¹H (300MHz, CDCl₃/TMS, ppm) - PE01

istura de iso." cdcl3/tms
13
erature
"gemini"
E
egrees
667 sec
Hz
ns
300.6673562 MHz
NO
minutes



I.V. (filme, diclorometano, cm^{-1}) - PE02**U.V. (nm, diclorometano) - PE03**

4.4 SEPARAÇÃO DOS ISÔMEROS GEOMÉTRICOS



Inicialmente, os isômeros *E* e *Z* de **(5)** foram separados por c.c.d.p. eluindo-se a mistura sucessivas vezes com uma solução de clorofórmio/acetona/hexano 50:6:44 saturada com solução aquosa da hidróxido de amônio.

Posteriormente estes isômeros foram separados por h.p.l.c. com eluente hexano/acetato de etila/trietilamina 80:19:1, velocidade de fluxo 3ml/min. Os dois isômeros foram obtidos com 48% da área percentual nos tempos de retenção 65 min para *E* e 70 min para *Z*.

DADOS ESPECTRAIS:

RMN ¹H (300 Mhz, CDCl₃/TMS, ppm) (PE04 e PE05)

E 7,60 - 7,10 [m, 12H- aromáticos]; 6,21 [t, 1H- C=CH, J=7 Hz]; 3,04 [d, 2H- CH₂N, J=7 Hz]; 2,25 [s, 6H- N(CH₃)₂]

Z 7,60 - 7,14 [m, 12H- aromáticos]; 6,28 [t, 1H- C=CH, J=7 Hz]; 3,00 [d, 2H- CH₂N, J=7 Hz]; 2,24 [s, 6H- N(CH₃)₂]

RMN ¹³C (75 Mhz, CDCl₃/TMS, ppm) (PE06 e PE07)

E 143(C), 142(C), 140(C), 139(C), 139(C), 132(CH), 132(CH), 131(CH), 129(CH), 129(CH), 128(CH), 127(CH), 122(C), 122(C), 58(CH₂), 45(CH₃)

Z 142(C), 141(C), 140(C), 139(C), 139(C), 132(CH), 132(CH), 132(CH), 129(CH), 128(CH), 128(CH), 127(CH), 122(C), 122(C), 58(CH₂), 45(CH₃)

RMN ¹³C- dept (75 Mhz, CDCl₃/TMS, ppm) (PE08 e PE09)

E sinais positivos: 132(CH), 132(CH), 131(CH), 129(CH), 129(CH), 128(CH), 127(CH)

sinal negativo: 58(CH₂)

Z sinais positivos: 132(CH), 132(CH), 132(CH), 129(CH), 128(CH), 128(CH), 127(CH)

sinal negativo: 58(CH₂)

IV (filme, diclorometano, cm⁻¹) (PE10 e PE11)

E 1656 (C=C); 816 e 739 (CH aromático)

Z 1655 (C=C); 806 (CH aromático)

EM (m/e) (PE12 e 13)

E 471(M⁺), 456(M⁺ - CH₃), 427(M⁺ - N(CH₃)₂), 346 (427 - Br), 314 (M⁺ - (C₆H₄)Br), 265, 238, 189, 165, 82, 70, 58

Z 471(M⁺), 456(M⁺ - CH₃), 427(M⁺ - N(CH₃)₂), 346 (427 - Br), 314 (M⁺ - (C₆H₄)Br), 265, 238, 189, 165, 152, 133, 82, 70, 58

UV (nm, diclorometano) (PE 14 e PE15)

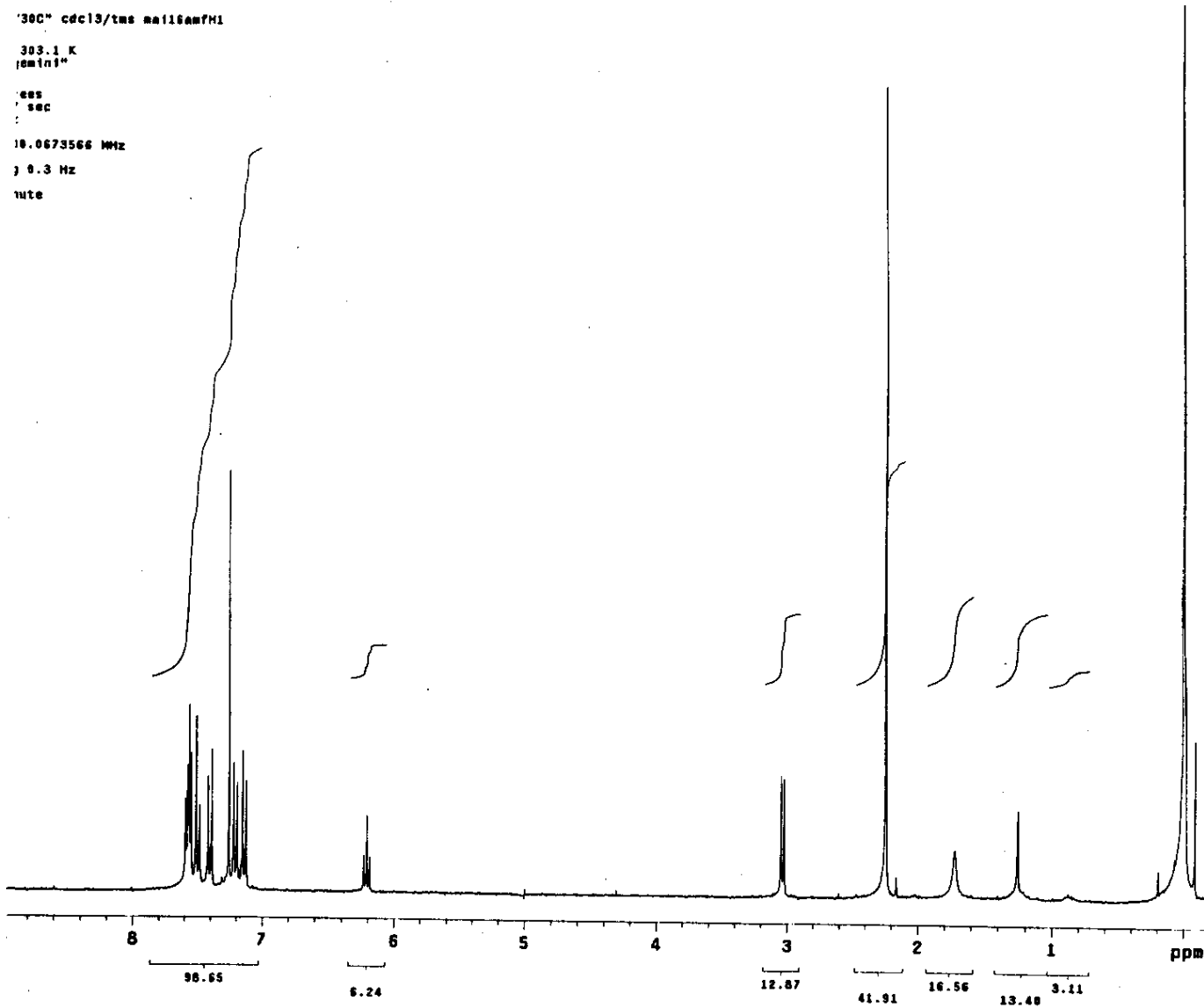
E λ_{máx} = 262 (c=3x10⁻² mg/ml)

Z λ_{máx} = 286 (c=3x10⁻² mg/ml)

PONTO DE FUSÃO:

Z

131 °C

RMN ¹H (300 Mhz, CDCl₃/TMS, ppm) - PE04 - E

RMN ^1H (300 Mhz, CDCl_3/TMS , ppm) - PE05 - Z

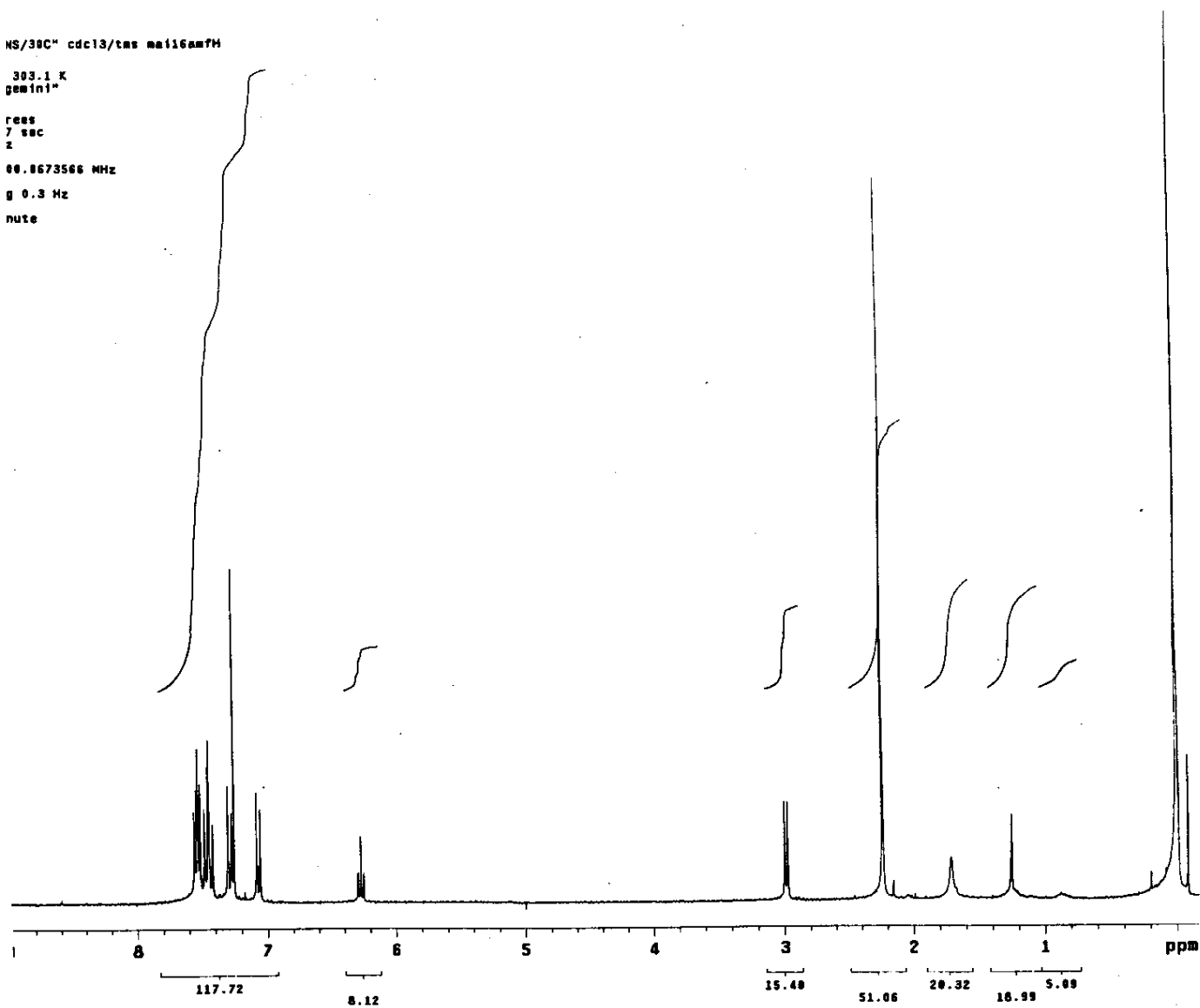
NS/300M cdc13/tms mal16am7H

303.1 K
gemin1"ress
7 sec
z

66.8673566 MHz

g 0.3 Hz

nute



RMN ^{13}C (75 Mhz, CDCl_3/TMS , ppm) - PE06 - E

"C13" cdc13/tms m110am7c

int: CDC13

int temperature

m110am7c

[-30000 "gemin1"

SEQUENCE

1 44.6 degrees

time 1.500 sec

1 20000.0 Hz

repetitions

1E C13, 75.4519011 MHz

1LE H1, 300.0604076 MHz

37 dB

inuously on

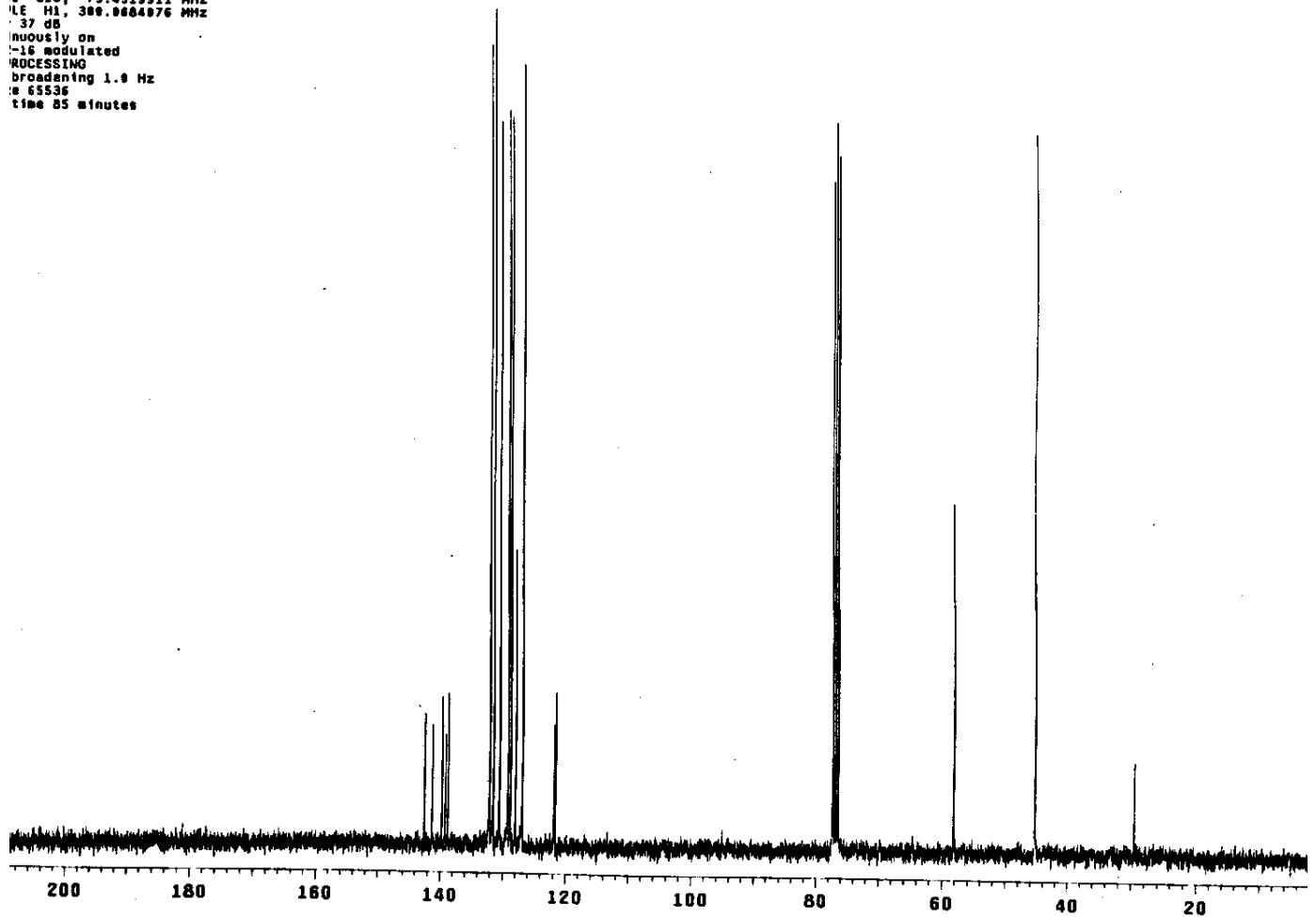
-16 modulated

PROCESSING

broadening 1.0 Hz

0 65536

time 85 minutes



RMN ^{13}C (75 Mhz, CDCl_3/TMS , ppm) - PE07 - Z

"TRANS" cdc13/tms ma109am7C

ent: CDC13

ent temperature

ma109am7C

I-300BB "gemin1"

SEQUENCE

f 44.6 degrees

time 1.600 sec

f 20000.0 Hz

repetitions

fE C13, 75.4519905 MHz

fL5 H1, 300.0084076 MHz

f 37 dB

inuously on

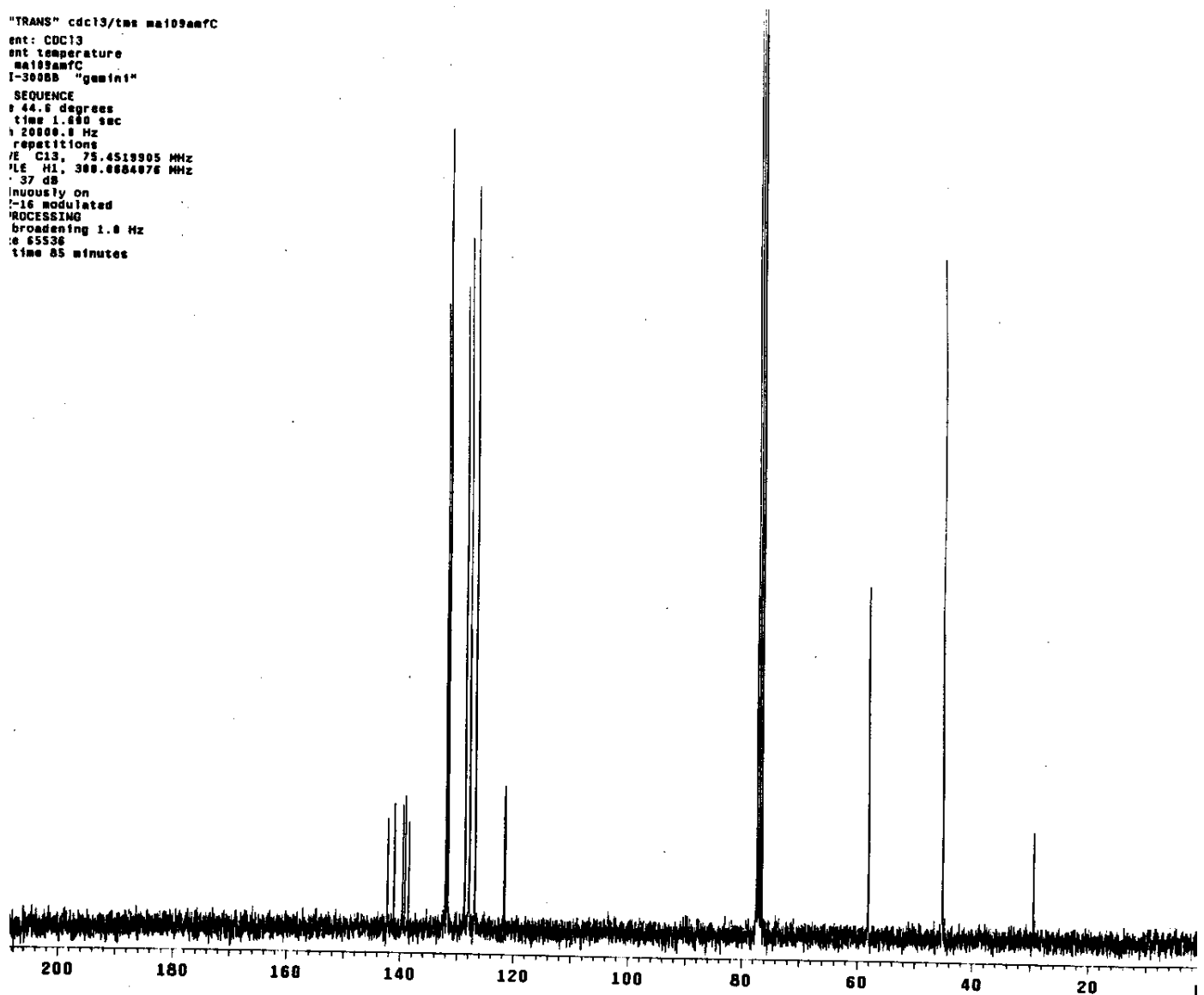
f-16 modulated

PROCESSING

broadening 1.0 Hz

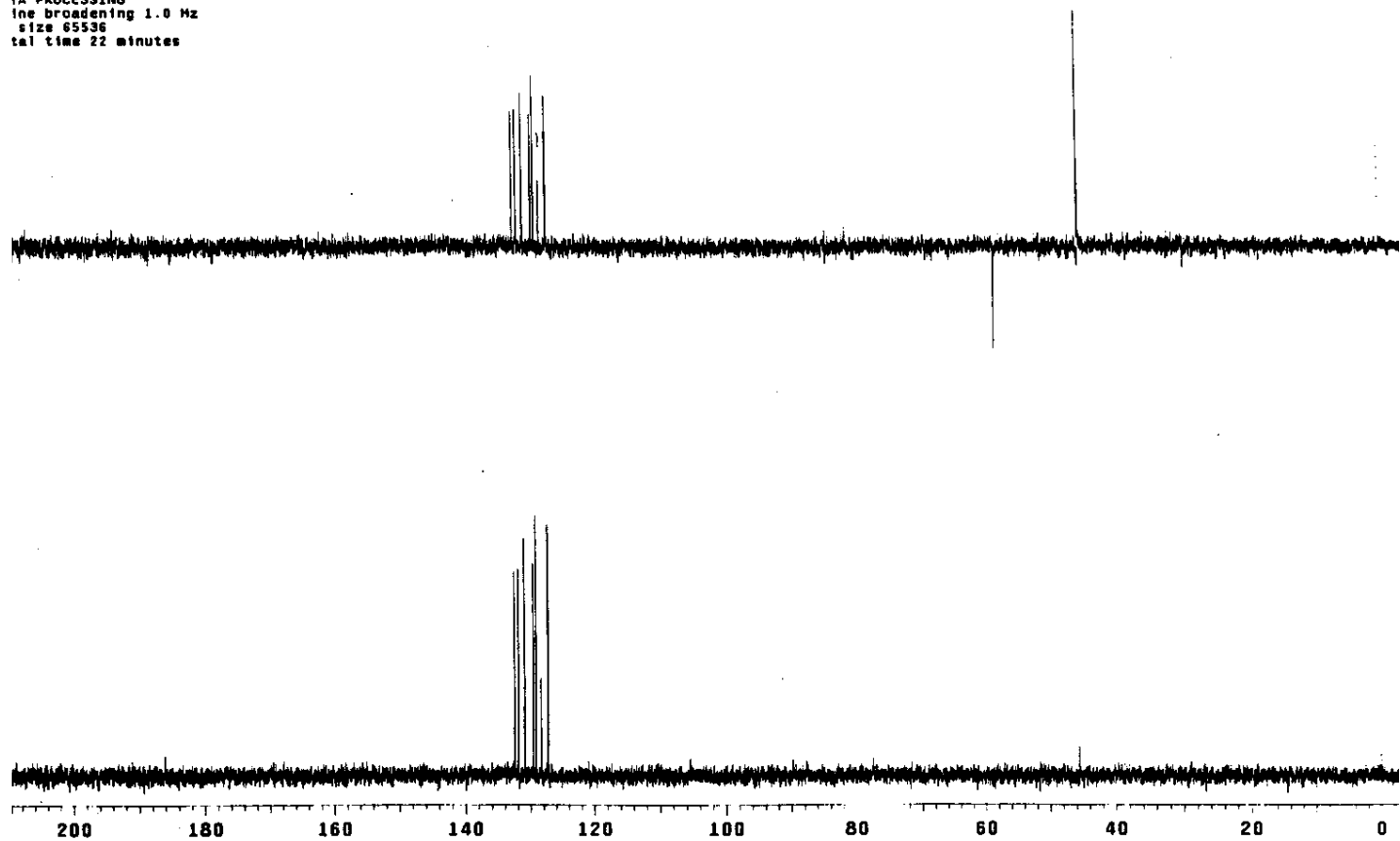
e 65536

time 85 minutes



RMN ^{13}C -dept (75 Mhz, CDCl_3/TMS , ppm) - PE08 - E

is "CIS" cdc13/tms ma110anf0
ilvent: cdc13
bient temperature
le: ma110anf0
INI-30085 "gemin1"
SE SEQUENCE: dept
ilax. delay 1.000 sec
ilse 99.0 degrees
cq. time 1.600 sec
ldth 20000.0 Hz
56 repetitions
SERVE C13, 75.4519712 MHz
COUPLE H1, 300.0684876 MHz
ower 37 dB
s during acquisition
ff during delay
ALTZ-16 modulated
TA PROCESSING
ine broadening 1.0 Hz
size 65536
tal time 22 minutes



RMN ^{13}C -dept (75 Mhz, CDCl_3/TMS , ppm) - PE09 - Z

"TRANS" cdc13/tms ma109am7D

vent: cdc13

lent temperature

: ma109am7D

NI-30088 "gemin1"

E SEQUENCE: dept

ax. delay 1.000 sec

se 90.0 degrees

. time 1.668 sec

th 20000.0 Hz

repetitions

RVE C13, 75.4519664 MHz

UPLE H1, 300.6684076 MHz

er 37 dB

during acquisition

during delay

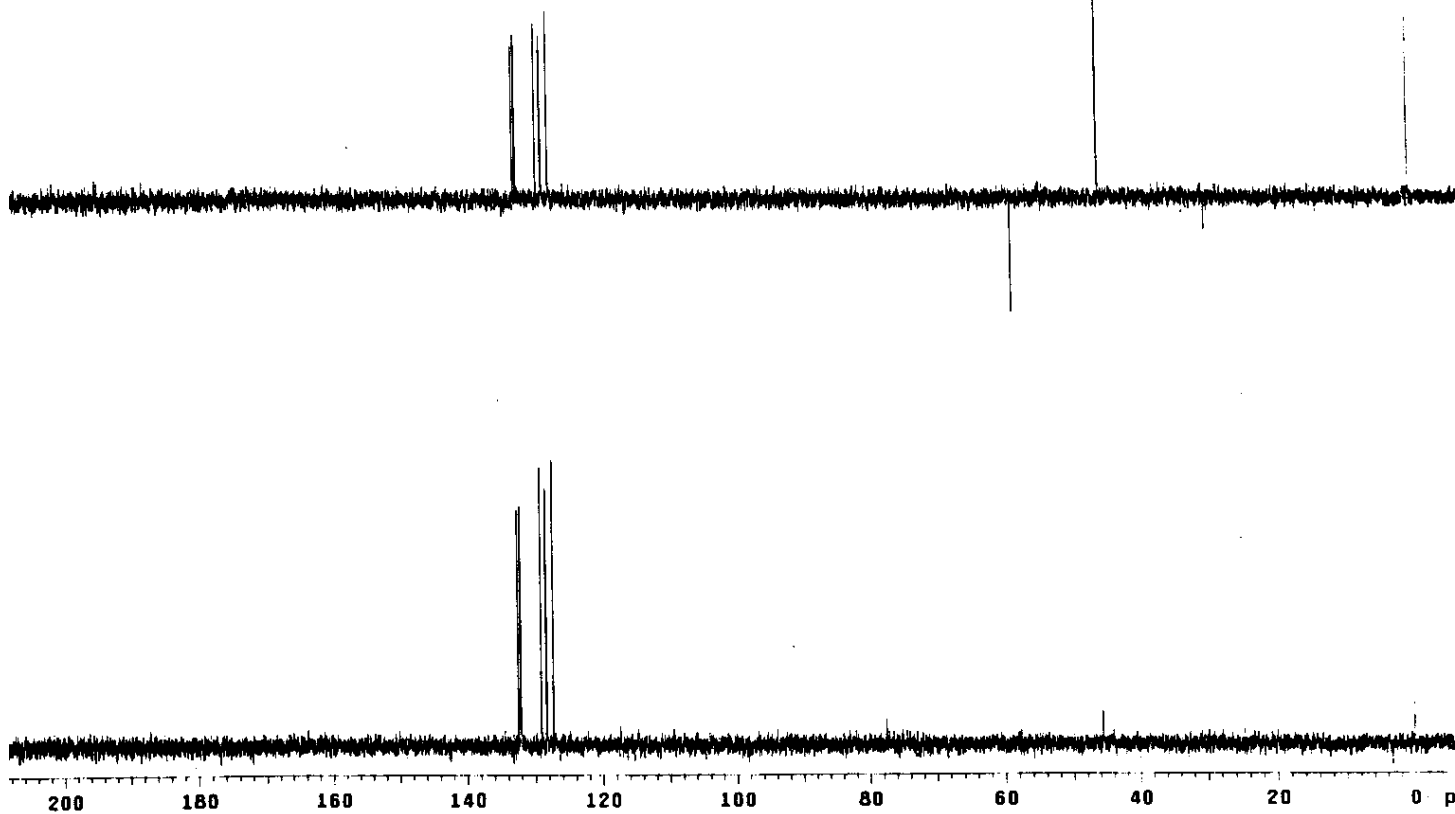
TZ-16 modulated

PROCESSING

e broadening 1.0 Hz

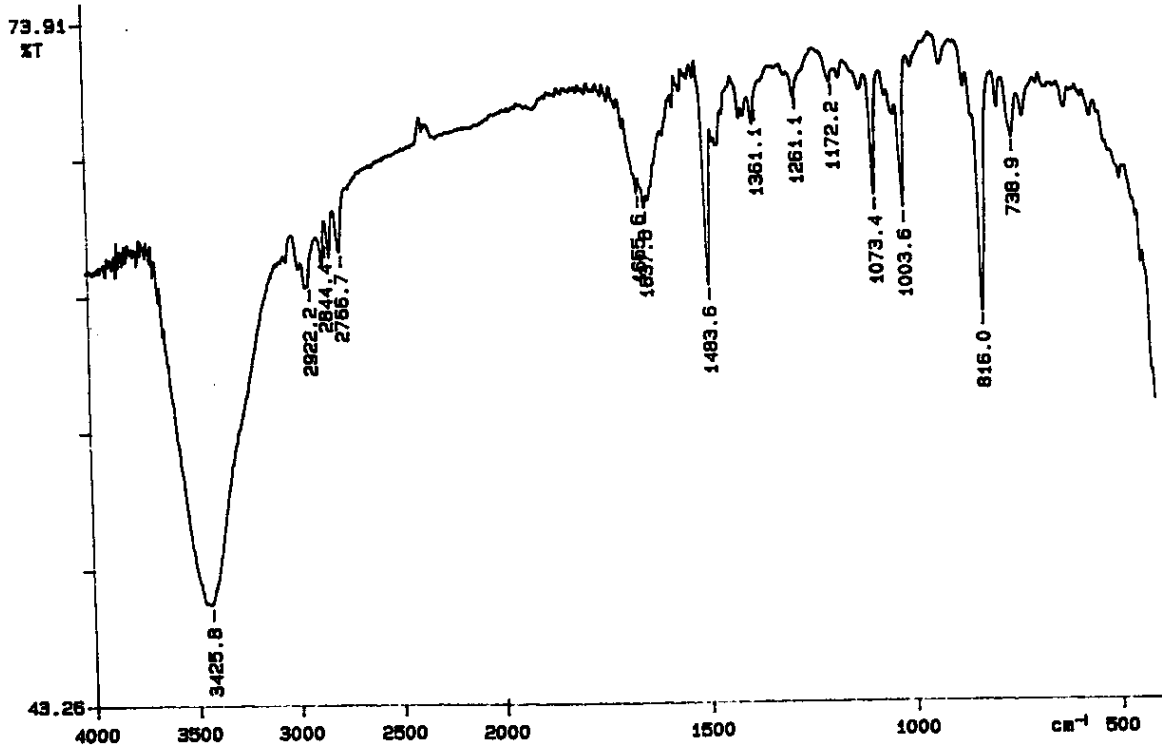
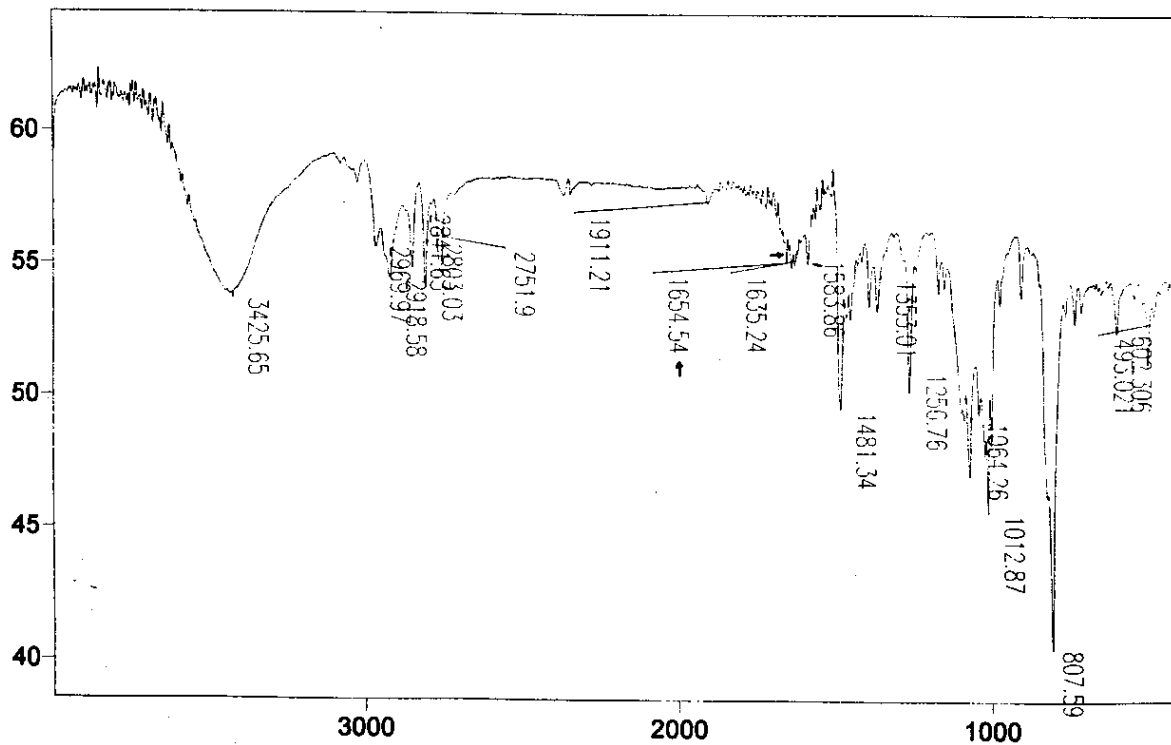
ize 65536

il time 44 minutes



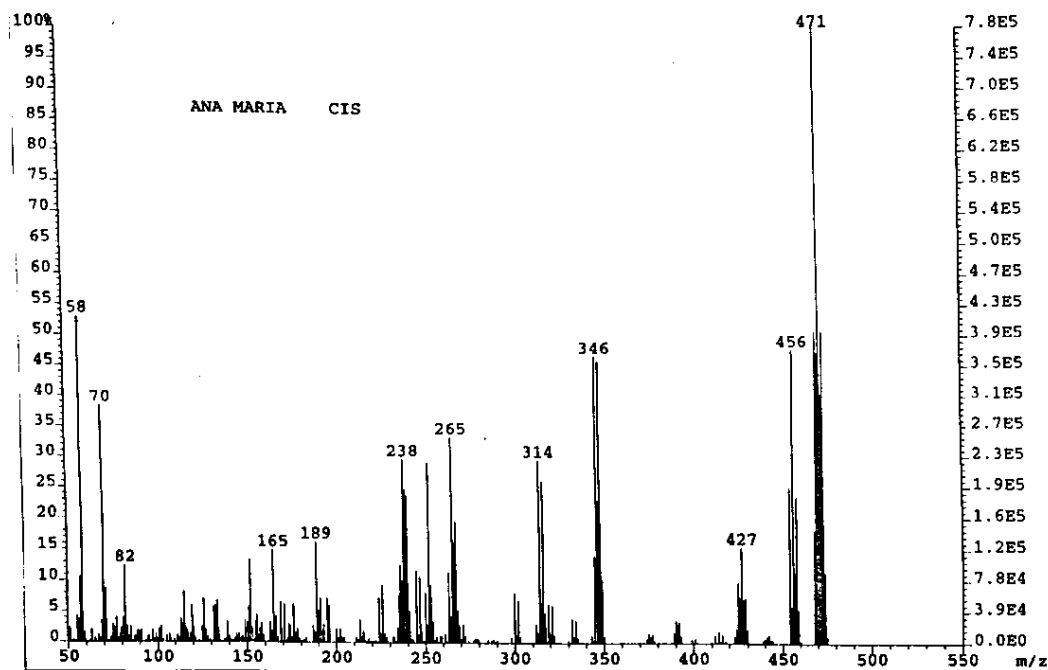
IV (filme, diclorometano, cm^{-1}) - PE10 - E

PERKIN ELMER

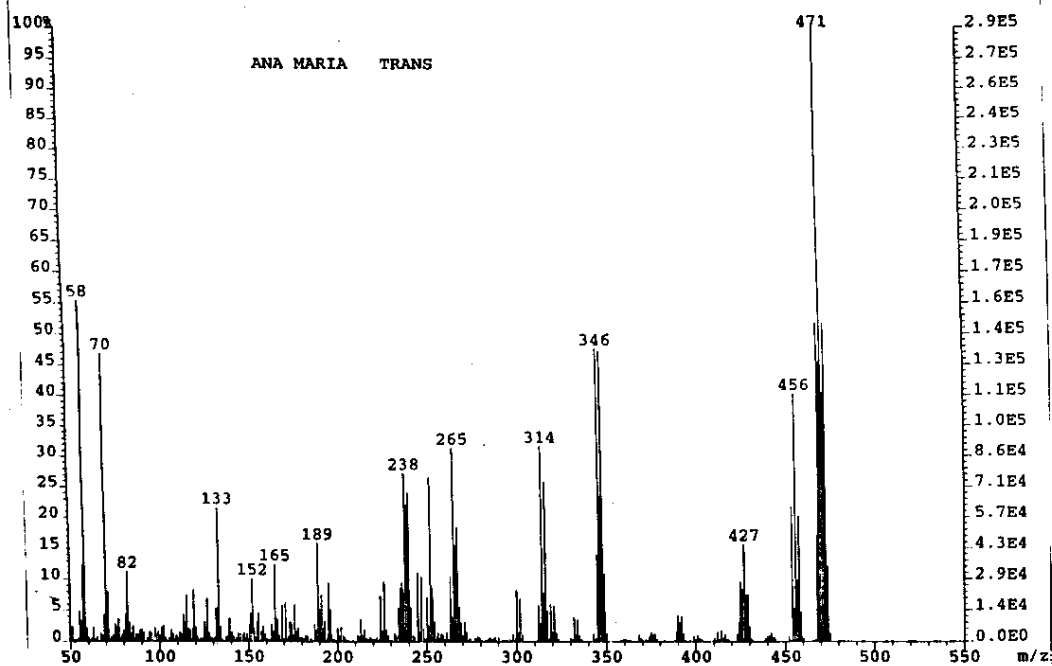
**IV (filme, diclorometano, cm^{-1}) - PE11 - Z**

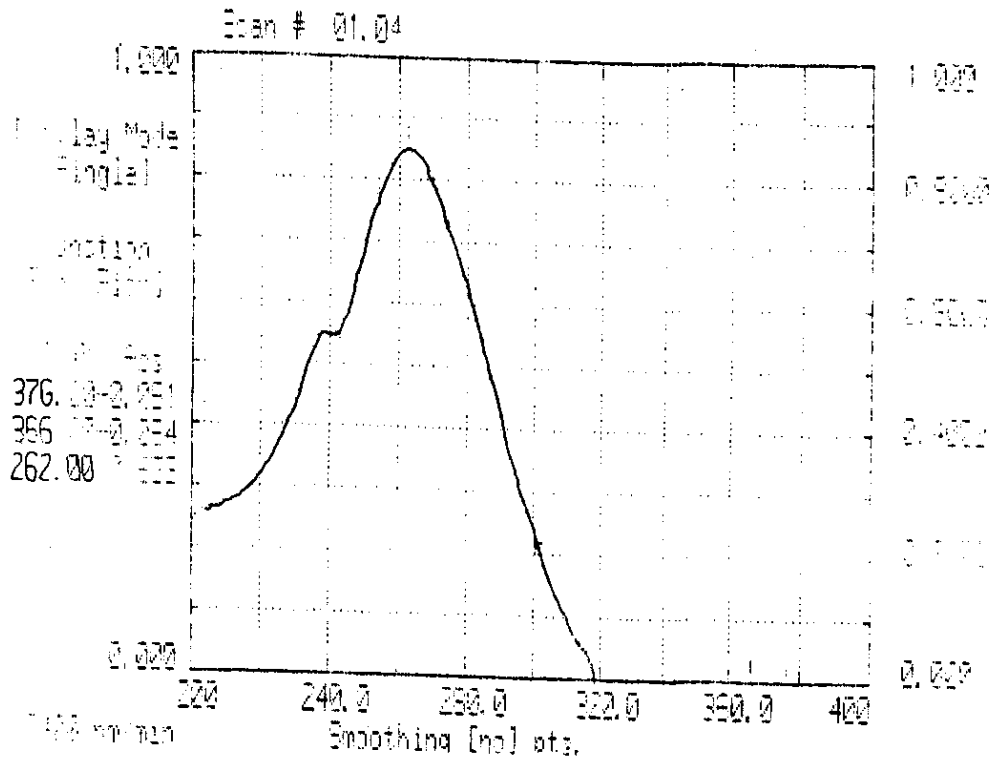
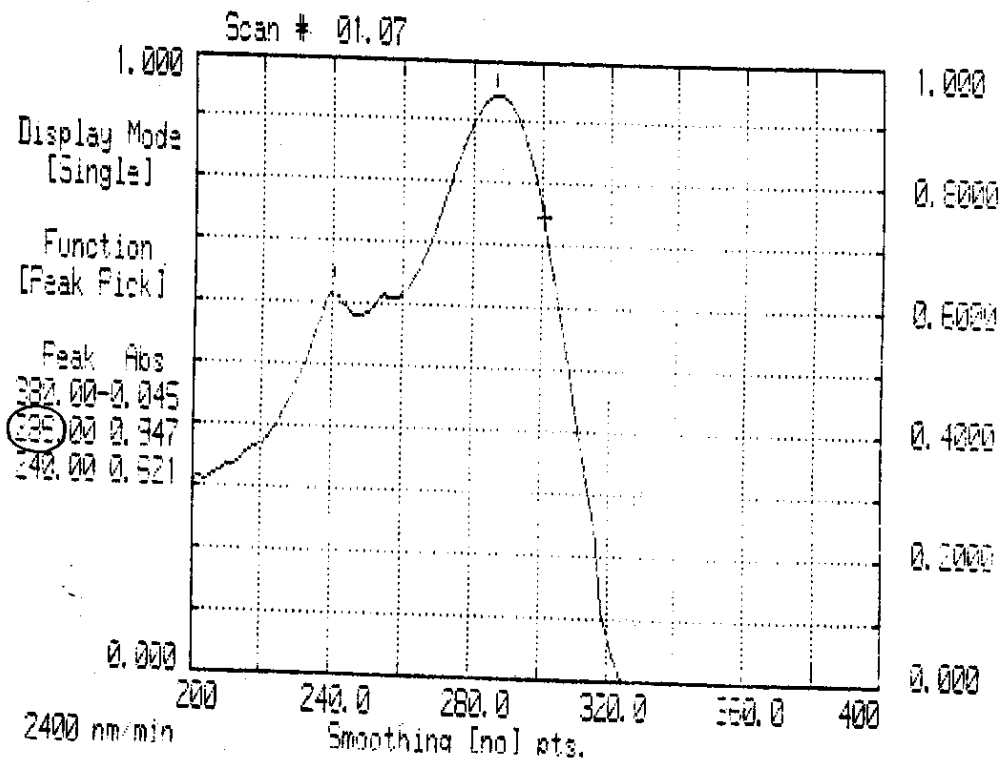
EM (m/e) - PE12 - E

File:MAI23A Ident:290_292+304_323 Win 10000PPM Acq:21-FEB-1997 21:51:01 +56:54 Cal:2E1
AutoSpec EI+ Magnet BpM:471 BpI:775140 TIC:12069677 Flags:HALL

**EM (m/e) - PE12 - Z**

File:MAI23A Ident:398_426-403_426-395_436-400_434-399_434 Win 10000PPM Acq:21-FEB-1997 21:51:01
AutoSpec EI+ Magnet BpM:471 BpI:285981 TIC:4627948 Flags:HALL



UV (nm, diclorometano) - PE 14 - E**UV (nm, diclorometano) - PE15 - Z**

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA *In vitro*

Estes ensaios foram feitos em colaboração com a professora Dra. Solange de Castro no Departamento de Ultraestrutura e Biologia Molecular da FIOcruz no Rio de Janeiro.

Foi avaliada a susceptibilidade da forma tripomastigota de *Trypanossoma cruzi*, cepa Y, aos isômeros *cis* e *trans* e a mistura isomérica. Os parasitas foram obtidos de camundongos infectados (De Castro *et alli*, 1987).

As soluções estoque das drogas foram preparadas em dimetilsulfóxido e diluídas nas soluções contendo os parasitas de forma que a concentração final de DMSO não excedesse 0,1%. Experimentos mostraram que em concentrações de até 5% o dimetilsulfóxido não apresenta efeitos deletérios aos parasitas.

O sangue fresco, infectado com o parasita foi diluído, quando necessário, em meio Dulbecco's Modificado (DMEM) até que a concentração final do parasita atingisse a faixa de $2-5 \times 10^6$ parasitas/ml. Esta suspensão foi adicionada a droga, também diluída em DME numa razão de 1:1 e esta mistura foi então incubada a 4°C. As drogas foram utilizadas em concentrações de 1 a 500 μ M.

Após 24 horas de incubação com a droga, os parasitas foram contados com o auxílio de uma Câmara de Neubauer.

4.6 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

Estes testes foram feitos no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Bioquímica - Instituto de Biologia - UNICAMP, sob orientação da professora Dra. Marcela Haun.

As células utilizadas nos experimentos foram células V-79, fibroblastos de linhagem estabelecida oriundos de pulmão de hamster chinês.

MANUTENÇÃO DA CULTURA

As células foram mantidas em cultura a 37°C em estufa de atmosfera úmida contendo cerca de 5% de CO₂ e em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino.

Os fibroblastos foram mantidos em cultura continuamente, através de repiques periódicos quando atingem a densidade de confluência. As células foram descoladas usando solução ATV (Melo, 1996).

PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS PARA O ENSAIO

Os ensaios foram feitos em placas multipoços contendo 24 poços. Para cada ensaio foram feitos dois experimentos em quadruplicata.

Para o plaqueamento utilizou-se o seguinte procedimento:

As células são descoladas com 1ml da solução ATV e a ação da enzima é interrompida com 4ml de meio de cultura. Retira-se 500µL desta suspensão celular e mistura-se a 500µL de solução de corante de viabilidade Azul Trypan à 0,1%. Transfere-se esta solução para uma Câmara de Neubauer aonde conta-se o número de células viáveis (não coradas) por ml.

Utilizou-se 27.000 células por poço para os experimentos.

SOLUÇÕES ESTOQUE DAS DROGAS

Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido e então em meio de cultura até atingirem a concentração desejada. A concentração de DMSO não excedeu 0,1% evitando danos ao crescimento celular e todos os poços, no mesmo experimento, apresentaram a mesma concentração de DMSO.

ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA

Após o plaqueamento, as células foram incubadas a 37°C por 48 horas até atingirem a semiconfluência. As células são então incubadas com

a solução de droga/DMSO/meio de cultura nas várias concentrações durante adicionais 24 horas. Nos poços controle só é adicionada solução meio de cultura/DMSO. Após o período de incubação, a solução é retirada, as células são lavadas com uma solução de tampão PBS contendo Ca^{+2} e Mg^{+2} (1ml/poço), fixadas com uma solução de ácido tricloroacético a 5%, lavadas com etanol, secas ao ar livre e lisadas por uma hora com uma solução de NaOH 0,5M (1ml/poço). O crescimento celular é medido pela absorvância em 260nm e os resultados expressos com relação ao controle. O número de células obtidas ao final do experimento é determinado indiretamente pela absorvância em 260 nm, comprimento de luz de máxima absorção de macromoléculas em especial ácidos nucleicos (Cingi *et alli.*, 1991). Diversos experimentos demonstram correlação entre número de células e absorvância à 260 nm (Melo, 1996). O potencial do agente tóxico é medido pela comparação entre as absorvâncias obtidas na ausência e na exposição à diversas concentrações deste.

CAPTAÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO

Após o plaqueamento, as células foram incubadas a 37°C por 48 horas até atingirem a semiconfluência. As células são então incubadas com a solução de droga/DMSO/meio de cultura nas várias concentrações durante adicionais 24 horas. Nos poços controle só é adicionada solução meio de cultura/DMSO. Após este período o meio foi trocado por outro contendo o corante vermelho neutro (VN) - cloreto de 2-amino-3-metil-7-dimetilamino-fenanzina - na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pré incubado durante uma noite à 37°C e filtrado antes do uso em uma membrana filtrante de 0,22 μm . As células foram incubadas durante 3 horas com este corante e então o meio contendo VN foi removido. Após lavagem das células com solução PBS Ca^{+2} e Mg^{+2} (1ml/poço) adicionou-se a cada poço 1 ml de uma solução contendo 50 % de etanol, 49% de água destilada e 1% de ácido acético glacial. Após agitação por 20 minutos as absorvâncias dos poços foram lidas a 570 nm e os resultados expressos em relação ao controle (Riddell *et alli.*, 1986).

REDUÇÃO DO MTT

Após o plaqueamento, as células foram incubadas a 37°C por 48 horas até atingirem a semiconfluência. As células são então incubadas com a solução de droga/DMSO/meio de cultura nas várias concentrações durante adicionais 24 horas. Nos poços controle só é adicionada solução meio de cultura/DMSO. Após este período o meio foi trocado por outro contendo o corante MTT na concentração 0,3 mg/mL e incubadas por 5 horas. O meio foi cuidadosamente retirado e adicionou-se 1mL de etanol para a dissolução do formazam. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância de cada poço lida no espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados foram expressos em relação ao controle (Denizot e Lang, 1986).

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM BACTÉRIAS *Escherichia coli*

CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Preparam-se soluções 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mMolar de bicarbonato de sódio seco.

Alíquotas destas soluções são injetadas no sistema FIA condutimétrico interfaceado.

ENSAIO

Inoculou-se bactérias *E.coli* no meio de cultura em um banho termostaticado a 37°C. O crescimento bacteriano foi monitorado indiretamente pela medida da produção de CO₂ no sistema FIA. Quando esta solução atingiu 0,5 mMolar, alíquotas de 50 ml foram preparadas em erlenmeyers de 125ml já contendo volumes corretos da solução de droga a ser testada. Dois erlenmeyers, aos quais nenhuma droga foi adicionada, foram mantidos como soluções controle.

O crescimento bacteriano foi então monitorado através da medida da concentração de CO₂ nos erlenmeyers a cada 20 minutos. Os valores desta

concentração foram obtidos por interpolação na curva de calibração. O experimento foi concluído em cerca de duas horas (Jardim *et alii*, 1990; 1991).

MONITORAMENTO DE CO₂ NO SISTEMA FIA CONDUTIMÉTRICO

Neste sistema 300 µL da amostra contendo as espécies carbônicas CO₂, HCO₃⁻ e CO₃⁻² é injetada num fluxo carreador de água deionizada o qual conflui com outro contendo ácido sulfúrico 0,5%. O meio ácido favorece o equilíbrio no sentido da formação do gás carbônico:



Ao ser formado no meio ácido, o gás passa pela célula de difusão e permeia por uma membrana de teflon atingindo um fluxo de água deionizada. O equilíbrio é deslocado no sentido de formação dos íons HCO₃⁻ e H⁺. A condutividade deste fluído, a qual vinha sendo monitorada, altera-se devido ao CO₂ presente na amostra. A mudança na condutância é proporcional à concentração de CO₂ presente na amostra.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Monem M.M. e Henkel J.G. (1978), Essentials of Drug Product Quality: Concepts and Methodology, Editora Mosby Company, EUA.
- Barret P.A. (1976), U.S. Patent, 1.434.714.
- Barret P.A., Beveridge E., Bull D., Caldwell I.C., Islip P.J. Neal R.A. e Woods N.C. (1982), *Experientia*, **38**, 338.
- Borenfreund E. e Puerner J.A. (1984), *Journal of Culture Methods*, (9)1, 7.
- Brown D.W., Floyd A.J. e Sainsbury M. (1988), Organic Spectroscopy, John Wiley e Sons, Nova Iorque.
- Carey F.A. e Sundberg R.J. (1990), Advanced Organic Chemistry - Part - B, 3^{ed.}, Plenum Press, Nova Iorque, 95.
- Chance M.L. e Goad L.J. (1997), *Trypanosomiasis Leishmaniasis*, 163.
- Cingi M.R., De Angelis I., Fortunati E., Reggiani D., Bianchi V., Tiozzo e Zucco F. (1991), *Toxic. In Vitro*, (5)2, 119.
- Coombs G.H. e Mottram, J.C. (1997), *Trypanosomiasis Leishmaniasis*, 177.
- De Castro S.L., Meirelles M.N.L. e Oliveira M.M. (1987), *Exp. Parasitol.*, **64**, 368.
- De Castro S.L. (1993), *Acta Tropica*, **53**, 83.
- De Conti R.M. (1996), "Tese de Doutorado", I.Q., UNICAMP.
- De Conti R.M., Gimenez S.M. Haun M., Pilli R.A., De Castro S.L. e Durán N. (1996a), *Eur. J. Med. Chem.*, **31**, 915.
- De Conti R. M., Santa-Rita R.M., De Souza E. M., Melo P.S., Haun M., De Castro S.L. e Durán N. (1996b), *Microbios*, **85**, 83.
- Denizot F. e Lang R. (1986), *J. Immunol. Methods*, **89**, 271.
- Dias J.C.P. (1992), <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter4.html>.
- Faerman C. e Gillilan R. (1997), [http // www.tc.cornell.edu /visualization/ Staff/richard /NIH/ Faerman/ chagas.htm](http://www.tc.cornell.edu/visualization/Staff/richard/NIH/Faerman/chagas.htm)
- Fairlamb A.H. e Quesne S.A.L. (1997), *Trypanosomiasis Leishmaniasis*, 149.
- Filardi L.S. e Brener Z. (1987), *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, **81**, 755.

- Freshney R.I. (1994), Cultura de Células Animais, Willey and Sons, Inglaterra, 2ª ed.
- Goldenberg S. (1993), *Ciência e Cultura*, (45)3/4, 206.
- Gülden M., Seibert H. e Voss J. (1994), *ATLA*, 22, 185.
- Jardim W.F., Pasquini C., Guimarães J.R. e De Faria L.C. (1990), *Wat. Res.*, (24)3, 351.
- Jardim W.F., Guimarães J.R. e Allen H.E. (1991), *Ciência e Cultura*, (43)6, 454.
- Katzung B.G. (1994), Farmacologia Básica e Clínica, 5ª ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Kirchhoff L.V. (1993), *Infectious Disease Clinics of North America*, 7, 487.
- Kierszenbaum F. (1996), *Nature Medicine*, (2)10, 1071.
- Korolkovas A. (1977), Fundamentos de Farmacologia Molecular, 2ª ed., Editora Edart, Rio de Janeiro, 140.
- Lehninger A.L. (1980), Fundamentos de Bioquímica, 2ª ed., Editora Sarvier, São Paulo, Brasil.
- Lüllmann H., Lüllmann-Rauch R. e Wassermann O. (1978), *Biochemical Pharmacology*, 27, 1103.
- Melo P.S. (1996), "Dissertação de Mestrado", I.B., UNICAMP.
- Moraes, S.G. (1995), "Dissertação de Mestrado", I.Q., UNICAMP.
- Mosmann T. (1983), *J. Immunol. Methods*, 65, 55.
- News D.P. (1988), Parasitologia Humana, 7ª ed., Editora Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 59.
- OMS (1995), <http://tron.is.s.u-tokyo.ac.jp/WHO/programmes/ctd/act/chagact.htm>.
- Pereira D.G., de Souza E.M., Durán, N. e De Castro S.L. (1996), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91, 313.
- Ratner M. (1990), *Biotechnology*, 8, 1248.
- Renzi D., Valtolina M. e Forster R. (1993), *ATLA*, 21, 89.
- Repetto G. e Sanz P. (1993), *ATLA*, 21, 501.
- Riddell R.J., Clothier R.H. e Balls M. (1986), *Fd. Chem. Toxic.*, (24)6/7, 469.
- Rocha J.C. (1995), http://www.oneworld.org/panos/dec_beetler.html.

- Rodriguez J.B. e Gros E.G. (1995), *Current Medicinal Chemistry*, **2**, 723.
- Róguet R., Cotovio J., Gaetani Q., Dossou K.G. e Rougier A. (1993), *ATLA*, **21**, 224.
- Stark D.M., Shopsis C., Borenfreund E. e Babibich H. (1986), *Fd. Chem. Toxic.*, **(24)6**, 449.
- Salles N.A., Sabino E.C., Cliquet M.G., Eluf-Neto J., Mayer A., Almeida-Neto C., Mendonça M.C., Dorliach-Llacer P., Chamone D.F. e Saéz-Alquézar A. (1996), *Transfusion*, **36**, 969.
- Seibert H., Gülden M. e Voss J. (1994), *ATLA*, **22**, 168.
- Seibert H. (coordenador) (1996), *ATLA*, **24**, 499.
- Silverstein R.M., Bassler G.C. e Morrill T.C. (1991), Spectrometric Identification of Organic Compounds, 5ª ed., John Wiley e Sons, Nova Iorque.
- Siqueira-Batista R., Storino R.A., Chiga A.L.V., Quintas L.E.M. e Filho N.M. (1993), *ARS CVRANDI - A Revista da Clínica Médica*, **26**, 15.
- Siqueira-Batista R., Corrêa A.D. e Huggins D.W. (1996), Moléstia de Chagas, Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro.
- Stoppani A.O.M., Paulino M. e Dubin M. (1996), *Ciência e Cultura*, **(48)1/2**, 75.
- Sztajzel J., Cox J., Pache J.C., Badaqui E., Lerch R. e Rutishauser W. (1996), *European Heart Journal*, **17**, 1289.
- Tanowitz H.B., Kirchhoff L.V., Simon D., Morris S.A., Weiss L.M. e Wittner M. (1992), *Clinical Microbiology Reviews*, **(5)4**, 400.
- Teixeira A. (1987), Doença de Chagas e outras por Tripanossomos, Editora Universidade de Brasília, 13.
- Teixeira A.R.L. (1994), *Ciência e Cultura*, **(46)5/6**, 424.
- Triglia D., Braa S.S., Yonan C. e Naughton G.K. (1991), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **27A**, 239.
- Urbina J.A., Payares G., Molina J., Sanoja C., Liendo A., Lazardi K., Piras M.M., Piras R., Perez N., Wincker P. e Ryley J. (1996), *Science*, **273**, 969.