

*DENISE APARECIDA DE OLIVEIRA*

**3-(4'-BROMO-[1,1'-BIFENIL]-4-IL)-3-(FENIL)-N,N-  
DIMETIL-2-PROPENO-1-AMINA: TOXICIDADE,  
ATIVIDADE TRIPANOSSOMICIDA E POSSÍVEL  
MECANISMO DE AÇÃO**

**Campinas  
2º semestre de 1998**



**UNICAMP  
Faculdade de Ciências Médicas**

**OL4t**

**38328/BC**

**DENISE APARECIDA DE OLIVEIRA**

**3-(4'-BROMO-[1,1'-BIFENIL]-4-IL)-3-(FENIL)-N,N-DIMETIL-2-PROPENO-1-AMINA: TOXICIDADE, ATIVIDADE TRIPANOSSOMICIDA E POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO**

Dissertação de Mestrado defendida no curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

***Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito***  
**Departamento de Fisiologia e Biofísica**  
**Instituto de Biologia – UNICAMP**

**Campinas, UNICAMP, 1998**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

O14t

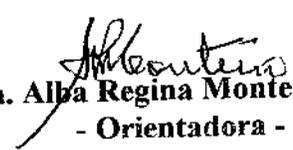
Oliveira, Denise Aparecida de  
3-(4'- Bromo-[1,1' - Bifenil] -4-IL)-3-(Fenil)-N,N-Dimetil-2-  
propeno-1-amina:toxicidade, atividade tripanossomicida e possível  
mecanismo de ação / Denise Aparecida de Oliveira . Campinas, SP :  
[s.n.], 1998.

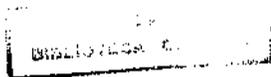
Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito  
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Chagas - doença de. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Toxicidade -  
testes. I. Alba Regina Monteiro Souza Brito. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências na Área de Farmacologia da Química Denise Aparecida de Oliveira.**

**Campinas, 17 de novembro de 1998**

  
**Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito**  
**- Orientadora -**





UNICAMP

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

**Orientador:**

**Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito**

**Membros:**

**1. Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito**

**2. Profa. Dra. Adelaide Faljoni Alario**

**3. Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero**

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 17/11/98**

*Aos meus pais*  
*Manuel e Alzira,*  
*irmãos*  
*Manuel "Juninho", Carlos Augusto e Ederaldo,*  
*cunhadas*  
*Edilma e Jamie,*  
*sobrinhas*  
*Monica, Cheyenne e Kimberly*  
*e meu namorado*  
*Euler*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Alba R.M.Souza Brito pela orientação e apoio.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán pela oportunidade de trabalhar nesta linha de pesquisa desde a iniciação científica e pela orientação em algumas etapas do desenvolvimento deste trabalho.

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

À Profa. Dra. Solange L. de Castro pela ajuda nos ensaios de atividade tripanossomicida.

À Profa. Dra. Adelaide Faljoni Alario pelo apoio nos estudos do mecanismo de ação.

À Dra. Elisa Esposito pela ajuda nos ensaios com o fungo *Trichophyton rubrum*.

À Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves pelo fornecimento da cultura de formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*.

À Marinei pela ajuda nos ensaios com epimastigotas do *T. cruzi*.

Aos professores e funcionários dos Institutos de Química e Biologia da UNICAMP, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, do Instituto de Química da USP e da FIOCrux que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratórios Adriana, Airton (Skin), Ana Beatriz, Ana Neusa, Ana Olívia, Anna Maria, Chico, Clélia, Daniel, Dárcio, Giselle, Helga, Jaime, Janaína, Joel, Josy, Juliano, Luciana Jardim, Luciana Sato, Mariângela Burgos, Mariângela Santiago, Natália, Neto, Patrícia, Patricio (Pato), Pedro, Raquel, Renato, Ricardo, Rinaldo, Ronaldo, Rosana, Rose, Sandrinha, Silvana, Sylvania, Sílvia, Teresa, casal Valéria e Pilli e outros que porventura esqueci pela agradável convivência, amizade e companheirismo.

Às meninas da M-10: Alessandra (Pê), Andréia Graf, Andréia, Ângela,

Elaine, Mara, Raquel, Roberta e Ruth pela amizade e convivência.

Ao Euler pela infinita paciência e apoio constante em todos os momentos.

A todos os amigos que me apoiaram durante a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro e à Assessoria pelos comentários pertinentes.

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>X</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 - DOENÇA DE CHAGAS	1
1.2 - FORMAS DE TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA DO PARASITA	2
1.3 - FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS	4
1.4 - QUIMIOTERAPIA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	6
1.5 - ENSAIOS TOXICOLÓGICOS DE NOVAS DROGAS	11
1.5.1 - TOXICIDADE AGUDA <i>IN VIVO</i>	12
1.5.2 - NEUROTOXICIDADE	13
1.5.3 - CITOTOXICIDADE	13
1.5.4 - TOXICIDADE AGUDA <i>IN VITRO</i>	15
<b>2 - OBJETIVOS GERAIS</b>	<b>16</b>
<b>3 - METODOLOGIA</b>	<b>17</b>
3.1 - PREPARAÇÃO DO DERIVADO NÃO-SUBSTITUÍDO (X=H)	17
3.1.1 - REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE FRIEDEL-CRAFTS	17
3.1.2 - REAÇÃO DE WITTIG	17
3.1.3 - SEPARAÇÃO DOS ISÔMEROS GEOMÉTRICOS <i>Z</i> E <i>E</i>	18
3.2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i>	19
3.3 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	20
3.3.1 - MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR	20
3.3.2 - QUANTIFICAÇÃO DE DNA (DNA)	21
3.3.3 - INCORPORAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO (VN)	22
3.3.4 - REDUÇÃO DO SAL DE TETRAZÓLIO, MTT (MTT)	23
3.4 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA <i>IN VITRO</i>	23
3.5 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	25
3.5.1 - TESTE DE TOXICIDADE AGUDA ( <i>DOSE SIMPLES</i> )	25
3.5.2 - TESTE DO CAMPO ABERTO (" <i>OPEN FIELD</i> ")	26
3.6 - INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO TRIPANOSSOMICIDA	28
3.6.1 - ENSAIOS PRELIMINARES	28
3.6.1.1 - ANÁLISE DO EXTRATO LIPÍDICO DE <i>T. RUBRUM</i>	29
3.6.2 - ANÁLISE DO EXTRATO LIPÍDICO DE <i>T. CRUZI</i>	30
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
4.1 - SÍNTESE DO COMPOSTO (X=H)	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\lambda$ : Comprimento de Onda;
- ANOVA**: Análise de Variância;
- ATP**: Tri Fosfato de Adenosina;
- CEMIB**: Centro de Bioterismo da Unicamp;
- CCT**: Coleção de Culturas Tropical;
- CG-MS**: Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectro de Massa;
- Composto (X=H)**: 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-(fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina;
- DI**: Diâmetro Interno;
- DL<sub>50</sub>**: Dose Letal Mediana;
- DMEM**: Meio Eagle Modificado por Dulbecco;
- DMSO**: Dimetilsulfóxido;
- DNA**: Ácido Desoxiribonucleico
- E. coli*: *Escherichia coli*
- FIA**: Análise por Injeção em Fluxo;
- FIOcruz**: Fundação Instituto Oswaldo Cruz;
- HPLC**: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- IBE**: Inibidor da Biossíntese do Ergosterol;
- IC<sub>50</sub>**: Concentração responsável por 50% de inibição do efeito observado;
- IV**: Infra Vermelho;
- m/e**: relação carga/massa;
- MTT**: Sal de Tetrazólio;
- PBS**: Solução Tampão de Fosfato;
- ppm**: partes por milhão
- RMN<sup>1</sup>H**: Ressonância Magnética Nuclear de Próton;
- SFB**: Soro Fetal Bovino;
- T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*;
- T. rubrum*: *Trichophyton rubrum*;

**TLC:** Cromatografia em Camada Delgada;

**Tris:** Tris(hidroximetil) amino metano;

**UV:** Ultravioleta;

**UV/Vis:** Ultravioleta/Visível e

**VN:** Vermelho Neutro.

## RESUMO

Estudos recentes mostraram a eficácia dos derivados de E/Z-3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina sobre as três formas do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. O derivado não-substituído (X=H) foi um dos mais ativos e menos tóxicos desta série. Neste trabalho, o composto (X=H) foi preparado e seus isômeros *Z* e *E* foram isolados por cromatografia de camada delgada preparativa para a realização dos ensaios biológicos. O isômero *Z* foi mais ativo que o *E* sobre formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Nos ensaios de quantificação de DNA (DNA) e de redução do sal de tetrazólio (MTT), usando células fibroblásticas V79, o isômero *Z* foi o mais tóxico. No método de incorporação do corante vermelho neutro, a mistura isomérica e os isômeros isolados apresentaram toxicidades equivalentes. Os compostos foram mais tóxicos neste método em comparação com MTT e DNA. O isômero *E* foi o mais tóxico na avaliação da toxicidade aguda sobre a bactéria *Escherichia coli* e sobre camundongos. Não houve alteração comportamental em camundongos tratados com a mistura isomérica, em relação ao controle, no ensaio do Campo Aberto. Os estudos da atividade do composto (X=H) sobre o fungo *Trichophyton rubrum* e sobre epimastigotas do *T. cruzi*, sugerem a inibição da biossíntese do ergosterol como um possível mecanismo de ação tripanossomicida.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é definida como uma protozoose tecidual hemática, de natureza endêmica, cujo agente causador é o hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à família Trypanosomatidae. Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* se adapta a formas celulares flageladas (tripomastigota e epimastigota) e aflageladas (amastigota) (Siqueira-Batista e col., 1993).

Dentre as várias formas de transmissão consideradas para a doença de Chagas, a transfusão sangüínea e a vetorial são as de maior relevância. Esta última ocorre através da picada de um inseto da família Reduviidae e subfamília Triatominae. No Brasil, o nome popular mais conhecido para este triatomíneo é “barbeiro” (Siqueira-Batista e col., 1993).

Esta enfermidade encontra-se amplamente distribuída pelo continente americano porém, somente nos países da América do Sul, ela representa um grave problema de saúde pública, afetando aproximadamente 18 milhões de pessoas e causando cerca de 45.000 mortes por ano. As estimativas indicam que no Brasil existem 6,3 milhões de infectados e que 32% desta população apresentarão as formas clínicas da doença. A extensão da doença pelo território brasileiro é quase total, exceto a Região Amazônica e a Mata Atlântica.

Os estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Paraná e Rio Grande do Sul são os de maior endemicidade (Siqueira-Batista e col., 1993; Bryan e col., 1994; Hunter e col., 1994; Corrêa e col., 1996).

A condição sócio-econômica das áreas endêmicas contribui enormemente para a distribuição geográfica da doença, pois a precariedade das habitações propicia a domiciliação do inseto vetor e a contaminação de humanos. Isto explica a baixa frequência de casos de doença de Chagas no sul dos EUA, onde o vetor e o parasita coexistem (Siqueira-Batista e col., 1993).

No Brasil e nos demais países latino-americanos a moléstia de Chagas é o reflexo dos problemas gerados pela desorganização econômica, política e social, características do subdesenvolvimento. Nos países onde esta enfermidade incide, observa-se a coexistência de habitação inadequada, analfabetismo, baixa ingestão proteico-calórica, outras parasitoses, elevada taxa de mortalidade infantil, migração como único meio de sobrevivência, desvalorização da mão-de-obra existente e muitas outras formas de marginalização imputadas à população de tais localidades (Corrêa e col., 1996).

### **1.2 - Formas de transmissão e ciclo de vida do parasita**

Apesar de ser tipicamente rural a doença de Chagas passa, atualmente, por um fenômeno de urbanização, resultante das migrações internas cada vez mais frequentes e do aumento progressivo

---

da transmissão do *T. cruzi* por transfusão de sangue. Atualmente, a transfusão de sangue é a principal via de transmissão na zona urbana (a soropositividade é de 20% em áreas altamente endêmicas do Brasil e da Argentina), podendo ser evitada através do controle nos bancos de sangue com a adição de violeta genciana - eficaz tripanossomicida - ao sangue coletado (Siqueira-Batista e col., 1993).

Diante da possibilidade de transmissão por via transfusional e também por transplante de órgãos, a ocorrência da enfermidade em regiões não-endêmicas, tais como a Europa e os Estados Unidos, constitui um risco cada vez maior, pois há um aumento do número de imigrantes e turistas, vindos de áreas endêmicas, que se apresentam infectados com o *T. cruzi* (Kirchhoff, 1993; Sztajzel e col., 1996; Crovato e Reborá, 1997).

Já a transmissão vetorial foi, por várias décadas, a mais importante, devido às péssimas condições das habitações rurais. Devido aos programas de desinsetização das habitações, houve uma redução significativa do número de casos de transmissão vetorial no Brasil e outros países do Cone Sul (Corrêa e col., 1996; Schofield, 1997; Marsden, 1997). Esta via ocorre da seguinte forma:

A forma epimastigota do *T. cruzi* se prolifera no aparelho digestivo do triatomíneo e se transforma na tripomastigota metacíclica a qual se aloja no intestino posterior do inseto. Esta última constitui a forma infectante do parasita, sendo transmitida através das fezes do

inseto vetor que, ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado, defeca próximo à região da picada. Ao coçar a região irritada pela lesão, o indivíduo favorece a penetração das formas tripomastigotas metacíclicas na mucosa do hospedeiro. O parasita atinge a circulação sanguínea e ao invadir células do sistema mononuclear fagocitário, se transforma na forma amastigota que se divide sucessivamente no interior dessas células. Antes do rompimento da célula hospedeira, as formas amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneas, que atingem a corrente sanguínea, podendo infectar outras células do hospedeiro ou serem transmitidas para o inseto vetor durante uma picada posterior (Siqueira-Batista e col., 1996).

### **1.3 - Formas clínicas da doença de Chagas**

A complexidade da evolução desta doença decorre, principalmente, da versatilidade do *T. cruzi* que é capaz de invadir e parasitar quase todas as células do organismo humano, fazendo com que a enfermidade tenha um amplo espectro de manifestações clínicas, devido aos diferentes órgãos atingidos. Durante a evolução da infecção com o *T. cruzi* três fases, com características clínicas distintas e individuais, são reconhecidas: aguda, indeterminada e crônica (Siqueira-Batista e col., 1993).

A fase inicial de infecção aguda acomete, preferencialmente, crianças de 0 a 10 anos (cerca de 90% dos casos), podendo manifestar-

---

se através de uma simples febre ou até de um grave quadro de miocardite. Os principais sintomas são: sinais de porta de entrada - que constituem o sinal de Romana e o chagoma de inoculação - febre, edema indolor, adenomegalia, hepatomegalia e, menos comumente, sinais e sintomas de acometimento cardíaco (Siqueira-Batista e col., 1993).

Na fase indeterminada, os indivíduos afetados são assintomáticos, mas apresentam evidências parasitológicas e/ou sorológicas de infecção persistente. Os pacientes costumam gozar de boa saúde, ignorando sua doença devido à escassez de sintomas inerente a esta fase (Andrade e col., 1997, Siqueira-Batista e col., 1993).

A fase crônica apresenta grave acometimento cardíaco e/ou digestivo, bem como do sistema nervoso autônomo. Na forma cardíaca, comumente chamada de cardiopatia chagásica crônica, ocorrem sinais como insuficiência cardíaca congestiva, arritmias e transtornos da condução, fenômenos tromboembólicos e isquêmicos. A forma digestiva é caracterizada pelas megaformações que atingem principalmente o esôfago (esofagopatia chagásica) e o cólon (colopatia chagásica). A forma cardiodigestiva caracteriza-se pela ocorrência simultânea dos sintomas das formas digestivas e cardíacas da fase crônica da doença (Siqueira-Batista e col., 1993).

#### 1.4 - Quimioterapia e desenvolvimento de novos fármacos

A quimioterapia da doença de Chagas ainda é limitada. Existe apenas uma droga à disposição no mercado, o benznidazol, cujo mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido; sabe-se, entretanto, que esse composto apresenta sérios efeitos colaterais e pouca eficácia na fase crônica da doença.

Outro composto nitroheterocíclico já utilizado na terapia da doença, o nifurtimox, mostrou-se pouco eficaz e provocou danos semelhantes aos causados pelo benznidazol. O nifurtimox não se encontra comercialmente disponível no Brasil (Quintas e col., 1996).

A estratégia utilizada na procura de fármacos mais seletivos e menos tóxicos que o benznidazol e o nifurtimox apresenta duas abordagens: pesquisar moléculas alvo específicas para desenvolver novos fármacos e testar novas drogas ou as comercialmente disponíveis para outros fins terapêuticos (De Conti, 1996).

Entre as drogas comercialmente disponíveis que têm sido testadas contra a doença de Chagas, destacam-se o alopurinol e compostos azólicos, tais como o cetoconazol e o itraconazol.

O alopurinol é um inibidor da síntese de purinas utilizado no tratamento da gota em humanos e apresenta poucos efeitos colaterais. Apesar de sua atividade variar dependendo da cepa em estudo, o alopurinol foi efetivo *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi*. Porém, estudos

---

com pacientes infectados mostraram que esse composto tem eficácia semelhante à do nifurtimox (De Conti, 1996).

O itraconazol, um azol largamente utilizado como antifúngico, mostrou resultados promissores *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi* (McCabe e col., 1986). A combinação de itraconazol e alopurinol proporcionou a redução da infecção em pacientes infectados com o parasita (Sánchez e col., 1995).

Há, ainda, uma grande variedade de compostos que tem sido testada empiricamente contra a doença de Chagas, tais como antibióticos, compostos antidepressivos tricíclicos, nitroimidazóis, complexos metálicos, produtos naturais, antitumorais, análogos de hormônios de insetos jovens e inibidores de proteases (De Castro, 1993).

Com relação ao planejamento racional de novos tripanossomicidas, há um crescente interesse por enzimas alvo específicas, envolvidas no processo de infecção do hospedeiro pelo parasita e/ou processos metabólicos vulneráveis do protozoário (Do Campo e col., 1981; Stoppani, 1983; Schrével e col., 1996). Neste sentido, muitos compostos têm sido testados visando atingir alvos como a tripanotiona redutase (Schirmer e col., 1995; O'Sullivan e col., 1996; Girault e col., 1997; Chan e col., 1998), cisteína proteinase (Cazzulo e col., 1997), enzimas que atuam no metabolismo de esteróis (Urbina, J.A., 1997; Contreras e col., 1997), entre outros (De Castro,

1993). A biossíntese do ergosterol, particularmente, é um alvo largamente estudado no planejamento de agentes antifúngicos e tem despertado interesse cada vez maior na procura de compostos tripanossomicidas.

O protozoário *Trypanosoma cruzi* e várias espécies do gênero *Leishmania* necessitam de esteróis específicos, como o ergosterol, para o crescimento e a manutenção da viabilidade celular.

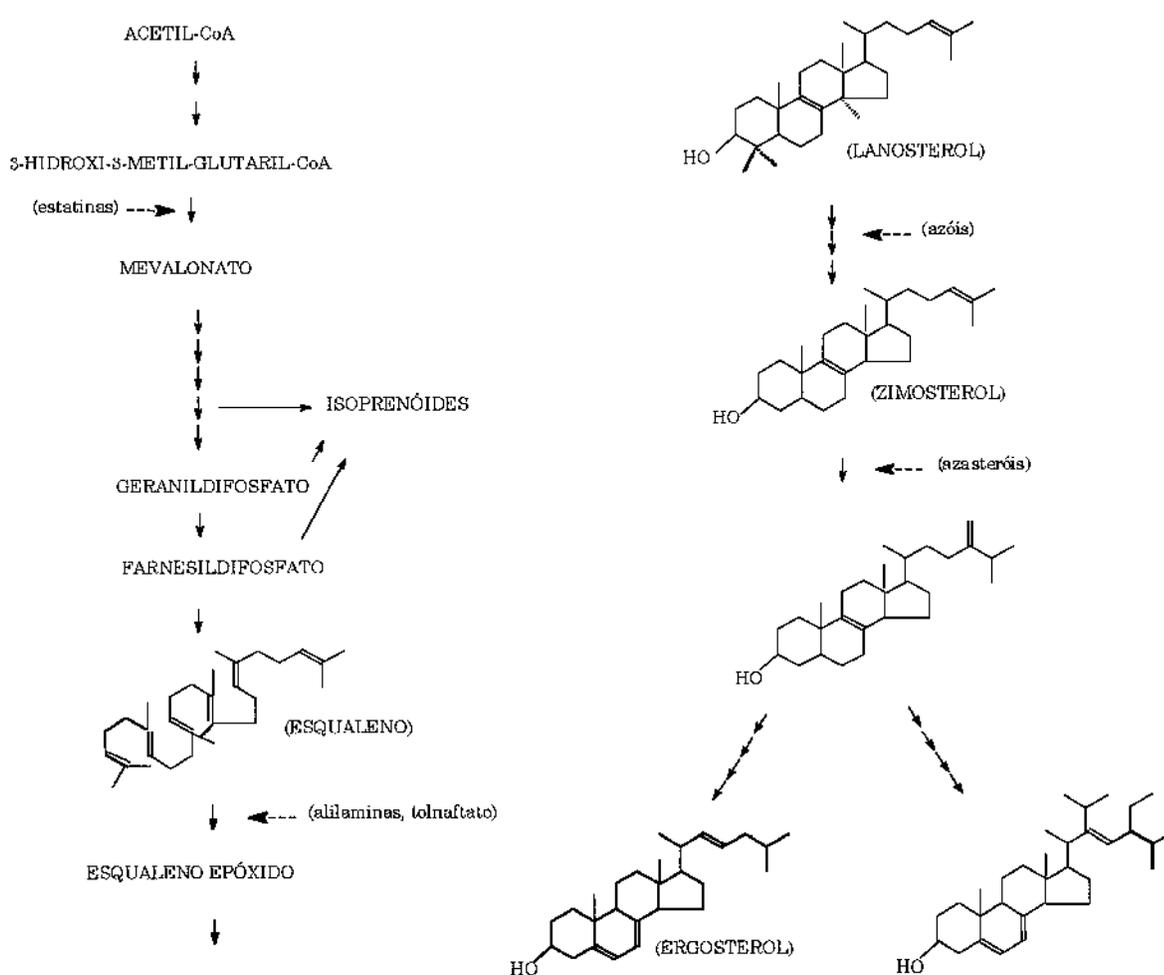
A biossíntese de esteróis é uma das vias metabólicas mais complexas presentes em células eucarióticas e envolve pelo menos vinte passos metabólicos que são catalisados por enzimas específicas (figura 1). Além da função passiva nas propriedades físicas das membranas celulares, tais compostos exercem papéis críticos no metabolismo celular.

As necessidades particulares de cada grupo filogenético por esteróis específicos fazem desse conceito a chave para o sucesso dos inibidores da biossíntese de ergosterol (IBE) como agentes quimioterapêuticos contra fungos e leveduras patogênicos (Urbina, 1996; 1997).

Compostos azólicos, análogos de esteróis e alilaminas (estruturas vide anexo 1), são antifúngicos potentes pois bloqueiam a biossíntese do ergosterol, induzindo a inibição do crescimento e a perda da viabilidade celular, através da depleção de esteróis do parasita e/ou do acúmulo de intermediários tóxicos. Esse mecanismo

de ação produz alterações na composição das membranas, desregulando a permeabilidade das mesmas (Urbina, 1996).

Estes compostos antifúngicos produziram efeitos sobre *T. cruzi* e mostraram-se altamente específicos não afetando, portanto, a produção de colesterol do hospedeiro em doses terapêuticas (Urbina e col., 1993, Urbina e col., 1996, Liendo e col., 1998).



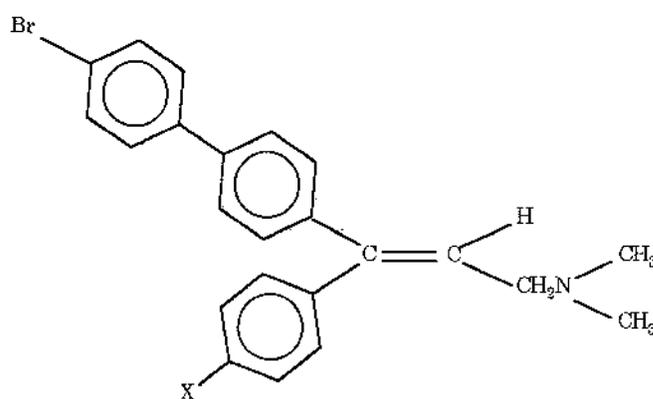
**Figura 1:** Diagrama esquemático da biossíntese do ergosterol em protozoários parasitas e fungos. Cada seta corresponde a um passo metabólico distinto. Os sítios de ação de inibidores da biossíntese (IBE's grifados) atualmente usados como agentes quimioterapêuticos ou ainda em desenvolvimento, estão indicados pelas setas pontilhadas (Urbina, 1997).

No intuito de melhorar a atividade dessas drogas foi testada a combinação de IBE's que atuam em etapas sequenciais da biossíntese na qual produziu efeitos sinérgicos *in vitro* e *in vivo* (Lazardi, e col., 1990; Urbina, 1996; Urbina e col., 1988; 1993; 1995; 1996a).

Outra estratégia é a procura de novos inibidores mais potentes (Urbina, 1996; 1997). Nesta linha, destaca-se o antifúngico bis-triazólico de largo espectro, ICI-195,739, que possui atividade específica contra o *T. cruzi* num modelo murino da doença de Chagas (Ryley e col., 1988). Recentemente, descobriu-se que a atividade antifúngica específica desse composto deve-se ao seu enantiômero R (+) e que este pode induzir a cura parasitológica de modelos murinos da doença de Chagas nas formas aguda e crônica (Urbina e col., 1996).

Dentro do universo de novas drogas que têm sido testadas contra *T. cruzi* (Durán e col., 1989; Doyle e Weinbach, 1989; Durán e Haun, 1991; Chabala e col., 1991; De Castro, 1993; De Castro e col., 1994; Kinnamon e col., 1997; Schvartzapel e col., 1997; Cinque e col., 1998), destaca-se uma série de oito novos derivados de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-(X-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina, onde X= H, Cl, Br, I, NO<sub>2</sub>, Me, MeSO<sub>2</sub>, OMe, apresentada na figura 2. Esta série de compostos foi sintetizada e testada recentemente por De Conti (1996). Esses compostos possuem atividade *in vitro* sobre as três formas do parasita e atuam por mecanismo diferente de drogas como o nifurtimox e o benznidazol, os quais produzem radicais livres

intracelulares (De Conti, 1996; De Conti e col., 1996a,b). O derivado não-substituído ( $X=H$ ), por ser um dos mais ativos da série, foi escolhido para dar continuidade aos estudos toxicológicos e de mecanismo de ação que fazem parte deste trabalho.



onde  $X = H, Br, I, Cl, OCH_3, NO_2, CH_3, SO_2CH_3$

**Figura 2:** Estrutura dos derivados de N,N-dimetil-2-propeno-1-amina.

A terbinafina e a naftifina, alilaminas que são estruturalmente similares aos derivados de N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (figuras no anexo 1), apresentam uma atividade primária em relação a outros antimicóticos, pois atuam por inibição da esqualeno epoxidase (Favre e Ryder, 1996). É possível que, devido a tal similaridade, os derivados de N,N-dimetil-2-propeno-1-amina possam também estar atuando como IBE's contra o parasita *T. cruzi*.

### 1.5 - Ensaios toxicológicos de novas drogas

Os futuros fármacos que sobrevivem aos processos iniciais de pesquisa e caracterização precisam ser cuidadosamente avaliados quanto aos

riscos potenciais, antes do início dos testes clínicos.

Embora nenhum composto químico possa ser considerado totalmente seguro (isento de riscos), pois qualquer agente químico é tóxico em algum nível de dosagem, é possível estimar o risco associado à exposição a esse agente, sob condições específicas, efetuando testes adequados (Berkovitz e Katzung, 1994).

A extrapolação dos dados de toxicidade em animais para seres humanos não é completamente confiável. Para vários compostos, os dados acerca da toxicidade total baseados nas outras espécies apresentam um valor previsível muito aproximado para a sua toxicidade em seres humanos. Entretanto, existem limitações em relação ao número de informações que seriam convenientes obter. Por isso, a realização de ensaios de tolerância em humanos saudáveis é indispensável (Berkovitz e Katzung, 1994).

### **1.5.1 - Toxicidade aguda *in vivo***

O teste de toxicidade aguda é uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância-teste, fornecendo informações acerca dos riscos para a saúde resultantes de uma exposição de curta duração pela via escolhida. A toxicidade aguda serve de base ainda para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas sobre a toxicidade aguda subcrônica, crônica e com

doses repetidas, além de fornecer informações iniciais sobre o modo de ação tóxico da substância-teste (Souza-Brito, 1994).

### **1.5.2 - Neurotoxicidade**

Ensaaios neurológicos e comportamentais têm o papel de monitorar as funções cognitivas em animais adultos, assim como em fetos em desenvolvimento (Goldberg e Frazier, 1989).

O ensaio de Campo Aberto, “open field”, é usado como modelo animal para avaliação dos efeitos de um agente químico sobre o sistema nervoso central. Neste método os parâmetros de avaliação utilizados estão relacionados à condição de depressão.

### **1.5.3 - Citotoxicidade**

É crescente o interesse por alternativas para o uso de animais em pesquisa biomédica. Os testes *in vitro* utilizados para a avaliação da toxicidade celular geralmente são rápidos, sensíveis, de fácil automação e econômicos em relação ao uso de animais (Renzi e col., 1993).

Não se sabe ainda se os ensaios *in vitro* são capazes de substituir completamente os testes de toxicidade com animais. Entretanto, eles podem, quando adequadamente padronizados, servir para um pré-“screening” de agentes com potencial tóxico desconhecido, reduzindo

---

significativamente o número de animais necessários (Borenfreund e Puerner, 1984).

Particular atenção tem sido dada à estratégia de avaliação da citotoxicidade aplicada a diferentes organelas celulares (“multi-endpoint”). Neste sentido, pode-se investigar possíveis mecanismos de toxicidade celular de novos compostos (Renzi e col., 1993).

Neste trabalho foram utilizados três métodos distintos para a avaliação da citotoxicidade: quantificação de DNA (DNA), incorporação do corante vermelho neutro (VN) e redução do sal de tetrazólio, MTT (MTT).

A determinação do conteúdo de DNA é uma indicação do número total de células e diz respeito à capacidade proliferativa das células expostas a um agente tóxico (Renzi e col., 1993; Cingi e col., 1991).

Através do método do VN avalia-se a integridade lisossomal, uma vez que as células normais são capazes de incorporar o corante através de seus lisossomas (Renzi e col., 1993). Pode-se, portanto, ter uma medida direta do correto funcionamento de tais organelas, através da quantidade de corante captado (Riddell e col., 1986).

A redução do MTT ao formazan, um cristal azul, é promovida enzimaticamente pelas succinato-desidrogenases mitocondriais de células viáveis. Este método tem, portanto, o papel de avaliar o correto funcionamento das mitocôndrias através da medida da quantidade de formazan produzida (Renzi e col., 1993; Denizot e Lang, 1986).

#### 1.5.4 - Toxicidade aguda *in vitro*

Testes de toxicidade aguda usando microrganismos são largamente utilizados para propósitos diversos desde que possam fornecer informações úteis num curto período de tempo. Embora a toxicidade possa ser seguida através do monitoramento da variação de “pools” internos de ATP ou de DNA, a inibição de algumas funções microbianas vitais é facilmente medida. Em testes de toxicidade aguda, a respiração celular é um exemplo de parâmetro confiável para ser monitorado.

A taxa de CO<sub>2</sub> produzida por bactérias reflete uma série completa de reações bioquímicas as quais constituem o processo de respiração do organismo. A inibição desse processo irá alterar a quantidade de CO<sub>2</sub> produzida e adsorvida no meio de cultura aquoso (Jardim e col., 1990).

Neste trabalho a respiração da bactéria *Escherichia coli* foi monitorada através de análise por injeção em fluxo (FIA).

## 2 - OBJETIVOS GERAIS

- Síntese do derivado não-substituído (X=H) de N,N-dimetil-2-propeno-1-amina e separação dos isômeros *E* e *Z*;
- Estudo da atividade biológica desses compostos - atividade tripanossomicida, citotoxicidade e toxicidade aguda *in vitro* e *in vivo* e
- Investigação do mecanismo de ação tripanossomicida do composto sintetizado como possível inibidor da biossíntese de ergosterol.

### 3 - METODOLOGIA

#### 3.1 - Preparação do derivado não-substituído (X=H)

As etapas de preparação e purificação do composto (X=H), bem como a de separação dos isômeros *E* e *Z* foram realizadas com a colaboração do grupo do Prof. Dr. Nelson Durán (Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química - UNICAMP).

##### 3.1.1 - Reação de acilação de Friedel-Crafts

A uma solução contendo cloreto de ácido benzóico (2,0 mmol) e cloreto de alumínio (3,0 mmol) em dissulfeto de carbono (8 mL), adicionou-se 4-bromobifenila (1,72 mmol). A solução foi submetida a refluxada por 8 horas e, em seguida, resfriada a 0°C pela adição de gelo. O solvente foi evaporado e a mistura extraída com clorofórmio (30 mL) e água (2x 10 mL). A fase orgânica foi separada, lavada com solução de hidróxido de sódio 10% (10 mL) e água (2x 10 mL), e seca sob sulfato de magnésio. Após filtração, o solvente foi destilado sob pressão reduzida. Obteve-se a cetona por recristalização em uma mistura de diclorometano e hexano (De Conti, 1996).

##### 3.1.2 - Reação de Wittig

A uma solução contendo brometo de  $\beta$ -dimetilamino etil trifenilfosfônio (2,15 mmol) em tetrahidrofurano (12 mL) adicionou-se,

lentamente, sob atmosfera de argônio, uma solução 2,5 mol. L<sup>-1</sup> de n-butil lítio em hexano (2.21 mmol), mantendo-se a agitação, à temperatura de 0°C e sob atmosfera inerte, por um período adicional de 30 minutos. Em seguida, adicionou-se, lentamente à mistura reacional, a cetona produzida na etapa anterior (1,07 mmol). A solução foi agitada à temperatura ambiente por uma noite e a mistura foi extraída com diclorometano (20 mL) e água (2x 10 mL). A fase orgânica foi separada e seca sob sulfato de magnésio. Após filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo. O produto bruto foi percolado em uma coluna contendo sílica-gel, utilizando-se como eluente acetato de etila / metanol (gradiente 1-10%), obtendo-se 3 frações principais. A primeira fração foi identificada como cetona, a segunda como o óxido de trifenilfosfina e a terceira, o composto (X=H) com 60% de rendimento. Seguiu-se a purificação do produto através de cromatografia de camada delgada preparativa em sílica-gel (2-25 μ), utilizando acetato de etila / metanol na proporção 90:10 (vv<sup>-1</sup>) como fase móvel (De Conti, 1996).

### **3.1.3 - Separação dos isômeros geométricos *Z* e *E***

Foi utilizada a técnica de cromatografia de camada delgada preparativa em sílica-gel (2-25 μ) para a separação dos isômeros. Cada placa foi eluída pelo menos 8 vezes utilizando-se como fase móvel, o

---

sistema éter / hexano / hidróxido de amônio, na proporção 70:30:0,5 (vv<sup>-1</sup>).

Os compostos obtidos em todas as etapas de preparação foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de UV (ultravioleta), IV (infra vermelho), RMN<sup>1</sup>H (ressonância magnética nuclear de próton), e MS (espectrometria de massa) previamente descritas (De Conti, 1996).

### **3.2 - Avaliação da atividade tripanossomicida *in vitro***

A avaliação da atividade tripanossomicida *in vitro* foi feita com a colaboração do grupo da Prof<sup>ª</sup> Solange Lisboa de Castro (Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Molecular, FIOcruz - RJ).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas de camundongos com pico de parasitemia entre 7 e 22 dias após inoculação. Os parasitas foram isolados, por centrifugação diferencial, do sangue dos animais.

Os parasitas foram mantidos na presença ou ausência de cada droga (mistura isomérica 1:1 e isômeros isolados), em meio de cultura DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium), desde 2 até 72 horas após a incubação a 37°C. A avaliação de mobilidade ou sobrevivência de tais formas do parasita foi realizada examinando-as ao microscópio ou contando-as em câmaras de Neubauer (De Castro e col., 1987).

### **3.3 - Avaliação da citotoxicidade**

A avaliação da citotoxicidade do composto (X=H) foi feita com a colaboração do grupo da Prof<sup>a</sup> Marcela Haun (Laboratório de Cultura de Células, Instituto de Biologia – Unicamp).

#### **3.3.1 - Manutenção da cultura celular**

As células utilizadas foram fibroblastos de pulmão de hamster chinês, linhagem estabelecida em cultura V79.

Para dar início aos ensaios de citotoxicidade procedeu-se ao descongelamento das células V79 cujos estoques são armazenados sob nitrogênio líquido.

Um tubo com células foi retirado do nitrogênio e, imediatamente, colocado em uma estufa a 37°C. Após cerca de 15 minutos, foi removido o sobrenadante, composto de meio de cultura DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido. O aglomerado de células que permaneceu no fundo do tubo foi homogenizado com 1 mL de meio de condicionamento (meio de cultura metabolizado por células em fase de crescimento) e colocado em uma placa de Petri contendo mais 4 mL do mesmo meio. Quando foi observada a fixação das células na placa (cerca de 6 horas depois) o meio de cultura foi trocado novamente. Os primeiros repiques foram realizados à medida em que as células atingiam a densidade de confluência. A fase de adaptação das células ao novo ambiente durou aproximadamente uma

semana. Dessa etapa em diante, a cultura foi mantida continuamente através de repiques periódicos.

O cultivo foi realizado em meio DMEM, contendo  $100 \text{ U.mL}^{-1}$  de penicilina e  $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  de sulfato de estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A incubação foi feita em estufa a  $37^\circ\text{C}$  sob atmosfera úmida e contendo 5% de  $\text{CO}_2$  (Melo, 1996).

Os compostos, antes de serem utilizados nos tratamentos, foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em meio DMEM. A porcentagem de DMSO não ultrapassou 0,1 % em todos os tratamentos.

Nos três diferentes ensaios de citotoxicidade, descritos a seguir, o plaqueamento foi realizado inoculando-se  $3 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup> em cada poço da placa (96 poços). As células foram incubadas por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Após este período, as células foram expostas durante 24 horas a diferentes concentrações dos compostos (de 2 a  $15 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  para os ensaios de DNA e VN e de 5 a  $19 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  para o ensaio de MTT). Os ensaios foram realizados em triplicatas (Melo, 1996).

### **3.3.2 - Quantificação de DNA (DNA)**

Após a incubação e remoção do meio com droga, as células foram lavadas com PBS- $\text{Ca}^{2+}$ , fixadas com ácido tricloroacético 5 %, lavadas 2 vezes com etanol (todas as soluções geladas), secas sob temperatura ambiente e lisadas com hidróxido de sódio  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  (1 mL/poço, 1

hora a 37°C). A absorbância do lisado foi medida a 260 nm em espectrofotômetro UV/Vis. O crescimento relativo das células tratadas com os isômeros foi expresso em porcentagem em relação ao controle (células sem tratamento) nas mesmas condições experimentais. Foram construídos os gráficos de proliferação das células em relação ao controle versus concentração, obtendo-se, por interpolação, o valor de IC<sub>50</sub> para cada composto (Cingi e col., 1991).

### **3.3.3 - Incorporação de vermelho neutro (VN)**

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e substituído por outro sem soro contendo o corante vermelho neutro na concentração 50 µmol.L<sup>-1</sup>, pré-incubado durante 12 horas a 37°C e filtrado antes do uso, em membrana Millipore (0,22 µm). Após três horas de incubação, as células foram lavadas com PBS-Ca<sup>2+</sup> a 37°C para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomas. A cada pocinho foi adicionado 1 mL de uma solução aquosa contendo ácido acético glacial (1%) e etanol (50%) para fixar as células e extrair o corante incorporado nos lisossomas. As placas foram agitadas por 20 minutos em um agitador de placas e a absorbância das soluções foi lida a 540 nm em espectrofotômetro UV/Vis. Foram construídos os gráficos de captação do corante em células tratadas em relação ao controle versus concentração, obtendo-se, por interpolação, o valor de IC<sub>50</sub> para cada composto (Riddell e col., 1986).

### 3.3.4 - Redução do sal de tetrazólio, MTT (MTT)

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e substituído por outro sem soro contendo o MTT ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). As células foram incubadas por 5 horas, tempo necessário para ocorrer a redução do sal de tetrazólio ao formazan. O meio foi retirado cuidadosamente e adicionou-se 1 mL de etanol para a solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância referente a cada poço foi lida a 570 nm em espectrofotômetro UV/Vis (Denizot e Lang, 1986). Foram construídos os gráficos de redução do MTT em células tratadas em relação ao controle versus concentração, obtendo-se, por interpolação, o valor de  $IC_{50}$  para cada composto.

### 3.4 - Avaliação da toxicidade aguda *in vitro*

Os ensaios de avaliação da toxicidade aguda com a bactéria *Escherichia coli* foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Nelson Durán.

Inicialmente preparou-se o meio de cultura: em 800 ml de água foram dissolvidos 7 g de fosfato bibásico de potássio ( $K_2HPO_4$ ), 3 g de fosfato monobásico de potássio ( $KH_2PO_4$ ), 0,5 g de ácido cítrico, 1 g de sulfato de amônio ( $(NH_4)_2SO_4$ ) e 0,2 g de sulfato de magnésio  $MgSO_4$ . O pH dessa solução foi ajustado para 7 com a adição de hidróxido de sódio. O meio de cultura foi então aquecido até a ebulição, sendo depois

---

resfriado a 90°C. Ao atingir essa temperatura, adicionou-se 200 mL de uma solução aquosa de glicose 10% p.v<sup>1</sup>.

A bactéria *E. coli* (em agar) foi inoculada no meio de cultura e este foi mantido à temperatura ambiente até que a suspensão começasse a se turvar. Nesse momento, a suspensão bacteriana foi transferida para um banho-maria a 37°C e o CO<sub>2</sub> liberado foi determinado por FIA várias vezes, até que a concentração do mesmo chegasse a 0,5 mmolL<sup>-1</sup>.

Alíquotas de 50 mL da suspensão obtida foram transferidas para Erlenmeyers, adicionando-se um dos compostos (mistura e isômeros isolados) a cada uma delas a várias concentrações. Manteve-se a temperatura em 37°C.

O frasco que não recebeu nenhuma droga serviu como controle. O monitoramento de CO<sub>2</sub> foi feito a cada 20 minutos e a concentração do gás, nos diversos frascos, foi determinada por interpolação com o controle (=100%). O tempo total do experimento foi igual a 100 minutos (Moraes, 1995).

### 3.5 - Avaliação da toxicidade *in vivo*

#### 3.5.1 - Teste de Toxicidade Aguda (*dose simples*)

Neste ensaio foram utilizados 50 camundongos Swiss machos, peso médio de 30 g, provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da Unicamp).

Os animais foram mantidos em regime de “quarentena” por um período de mínimo de duas semanas em nosso biotério, sob regime de claro-escuro de 12 horas, temperatura ( $25 \pm 1$  °C) e umidade (55%) controladas, recebendo ração balanceada Nuvilab CR-a (Nuvital) e livre acesso a água. Após jejum de 12 horas os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em cinco grupos (10 para o grupo controle e 40 para os grupos tratados). Os grupos receberam, por via intra peritoneal (volume de dose de  $10 \text{ mL.kg}^{-1}$ ), os seguintes tratamentos:

- grupo controle: solução aquosa de Tween 80 a 12% (veículo);
- grupos tratados: isômeros *Z* e *E* suspensos no veículo acima, doses de 100 e  $140 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Meia hora após a administração das substâncias cada camundongo foi observado de acordo com parâmetros de análise comportamental geral, relacionados a sintomas produzidos pela administração dos compostos, tais como: alteração de pêlos, pele e mucosas; sistemas respiratório, circulatório, nervoso central e periférico; atividade somatomotriz e comportamental. Os animais

foram observados durante as primeiras 4 horas a cada uma hora e após 24 e 48 horas dos tratamentos.

A avaliação foi feita por atribuição arbitrária de escores, sempre considerados em relação aos animais controle. Nesse sentido, os parâmetros que inicialmente receberam escore 4, poderiam diminuir até 0, no caso de desaparecimento do sintoma analisado, ou aumentar até 8 no caso de aumento da resposta. No caso de respostas com nota zero, só seria possível o aumento do efeito analisado, até um valor máximo de quatro (Souza-Brito, 1994).

### **3.5.2 - Teste do Campo Aberto (“Open Field”)**

Neste ensaio foram utilizados 14 camundongos Swiss machos, peso médio de 30 g, provenientes do CEMIB - Unicamp.

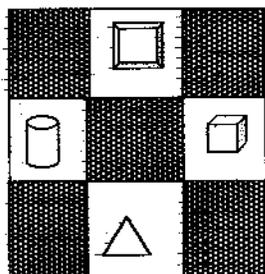
Após o período de “quarentena”, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e, após este período, foram pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos (7 para o grupo controle e 7 para o grupo tratado). Os grupos receberam, por via intra peritoneal (volume de dose de 10 mL.kg<sup>-1</sup>), os seguintes tratamentos:

grupo controle: solução aquosa de Tween 80 a 12% (veículo);

grupo tratado: derivado (X=H) como mistura isomérica 1:1 suspenso no veículo acima, na dose de 100 mg.kg<sup>-1</sup>.

Uma hora após administração da substância, cada camundongo foi colocado por 5 minutos no campo aberto. No campo, cuja área de

2025 cm<sup>2</sup> é subdividida em 9 quadrantes de 15 x 15 cm cada, foram dispostos estrategicamente quatro objetos de formas geométricas diferentes, como aparece no esquema da figura 3.



**Figura 3:** Esquema que mostra a disposição de objetos no campo aberto.

No período de observação citado, foram observados, para cada animal, os parâmetros de análise comportamental, que se seguem:

- locomoção: relaciona-se com o número de quadrantes que o animal invadiu com as quatro patas;
- interação com objetos: número de vezes em que o animal interagiu com os diferentes objetos do campo;
- “levantamentos”: número de vezes em que o animal se apoiou nas patas traseiras, assumindo posição bípede;
- asseios: número de vezes que o animal lambeu as patas dianteiras e realizou asseios da pelagem.
- fezes e urina: número de vezes em que o animal defecou e/ou urinou (Walsh e Cummins, 1976).

### 3.6 - Investigação do mecanismo de ação tripanossomicida

Os ensaios de investigação do mecanismo de ação do composto (X=H) como possível IBE foram realizados utilizando-se o fungo *Trichophyton rubrum* e formas epimastigotas do *T. cruzi*.

#### 3.6.1 - Ensaio preliminares

Os ensaios preliminares de investigação do mecanismo de ação do composto (X=H) foram realizados com a colaboração da Dra. Elisa Esposito da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" (Campinas - SP) e do grupo do Prof. Dr. Nelson Durán.

Examinou-se a atividade antifúngica do composto (mistura Z/E) utilizando-se o fungo *Trichophyton rubrum* cepa 5507 CCT (origem: micoteca da UFPE, Recife, PE).

Ensaio em meio sólido: O fungo foi inoculado em meio agar / extrato de malte 4% contendo, em duplicata, as concentrações de 10, 50, 120, 240 e 360  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  da mistura isomérica 1:1, dissolvida em DMSO. No controle adicionou-se o solvente a 4% (concentração máxima utilizada). A cultura foi incubada a 28°C por 5 dias.

Ensaio em meio líquido: O fungo foi inoculado em meio de extrato de malte 4% contendo, em duplicata, as concentrações de 10, 50, 120, 240 e 360  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  da mistura isomérica 1:1, dissolvida em DMSO. O solvente foi adicionado a 4% no controle. A cultura foi

incubada a 30°C sob agitação rotatória de 110 rpm, por 5 dias (Favre e Ryder, 1996).

### **3.6.1.1 - Análise do Extrato Lipídico de *T. rubrum***

Hidrólise de lipídeos saponificáveis: foram adicionadas as soluções KOH 10% em etanol/água 90:10 e pirogalol 2% em etanol a cada frasco. Aqueceu-se a mistura a 80°C por 10 minutos e resfriou-se a mesma à temperatura ambiente.

Extração de lipídeos não-saponificáveis (esteróis): extraiu-se a fase orgânica 2 vezes por adição de éter de petróleo e água e centrifugação a 500 x g. Evaporou-se o solvente dos extratos obtidos e os mesmos foram redissolvidos em n-hexano (Favre e Ryder, 1996).

As análises cromatográficas do extrato lipídico do fungo foram realizadas por TLC (*Cromatografia em Camada Delgada*) e HPLC (*Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*).

Análise por TLC: para tanto, foram utilizadas placas de sílica Merck 0,2 mm e diclorometano como fase móvel (Favre e Ryder, 1996). A revelação da placa foi feita utilizando-se iodo sublimado.

Análise por HPLC: foi feita nas seguintes condições: coluna de sílica 250 mm x 4,6 mm DI, detector UV a 245 nm e fase móvel composta de diclorometano/metanol 0,025% num fluxo de 1mL.min<sup>-1</sup> (Peacock e Goosey, 1989). O aparelho utilizado é da marca Shimadzu, modelo LC-10AD.

### 3.6.2 - Análise do Extrato Lipídico de *T. cruzi*

Os ensaios de investigação do mecanismo de ação do derivado sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram realizados com a colaboração da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adelaide Faljoni-Alario (Depto. de Bioquímica, Instituto de Química-USP-SP) e do Prof. Dr. Nelson Durán.

Os parasitas, fornecidos pelo Laboratório da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Júlia Manso Alves (Depto. de Bioquímica, Instituto de Química-USP-SP), foram incubados a uma densidade de  $10^7$  epimastigotas.mL<sup>-1</sup> a 28° C, com agitação de 120 rpm. Ao mesmo tempo, adicionou-se o composto (X=H), dissolvido em DMSO, cuja concentração máxima do solvente foi de 0,1%, em duas concentrações diferentes (12 e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em duplicata. Ao controle adicionou-se apenas o DMSO. A contagem dos parasitas foi feita em câmara de Neubauer, utilizando-se um microscópio óptico (Larralde e col., 1988).

Após 24 horas, as formas epimastigotas (amostras controle e tratada) foram coletadas por centrifugação a 1000 x g durante 10 minutos e lavadas 3 vezes com tampão Normal (NaCl 140 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 11 mmol.L<sup>-1</sup>, Tris 75 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4 - ajuste com HCl 0,3 mol.L<sup>-1</sup>). As células lavadas foram extraídas durante uma noite com 30 volumes de clorofórmio:metanol 2:1 (vv<sup>-1</sup>), filtradas e secas num rotavapor. Os extratos foram ressuspensos em clorofórmio: metanol 9:1 (vv<sup>-1</sup>), secos novamente, dissolvidos em clorofórmio a uma concentração

de 10-20 mg de lipídeos totais.mL<sup>-1</sup> e armazenados sob nitrogênio gasoso a -20°C até sua utilização. Este ensaio foi realizado 2 vezes nas mesmas condições. Num terceiro ensaio, os parasitas foram expostos à droga durante períodos de 24 e 48 horas.

Lipídeos neutros e polares foram separados, por percolação, dos extratos em uma coluna de ácido silícico. Para extrair os lipídeos neutros utilizou-se, como fase móvel, o sistema clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) (cerca de 300 mL) e, para extrair os polares, o sistema clorofórmio:metanol 1:1 (vv<sup>-1</sup>) (cerca 200 mL). As frações de lipídeos neutros foram analisadas por cromatografia de camada delgada, usando placas de sílica-gel (Merck 5538-7) e foi utilizado o sistema heptano:éter di-isopropílico:ácido acético glacial 60:40:4 como eluente. A revelação dos cromatogramas foi feita vaporizando as placas com ácido sulfúrico 50% e aquecendo-as a 100°C (Larralde e col., 1988).

Na etapa seguinte, procedeu-se à saponificação das frações com lipídeos neutros, usando refluxo por 90 minutos em solução de NaOH 0,3 mol.L<sup>-1</sup>:metanol 9:1 (vv<sup>-1</sup>). Os lipídeos não-saponificáveis (esteróis) foram extraídos com éter de petróleo e secos em sulfato de magnésio. O solvente foi evaporado em rotavapor e os extratos foram armazenados sob atmosfera inerte a -20°C (Urbina e col., 1991).

Iniciou-se a análise dos extratos por HPLC e CG-MS (*Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectro de Massa*).

As condições de análise em HPLC foram: coluna C-18 de 25 cm (Shim Pack CLC-ODS (M)), detector UV a 208 nm, metanol como fase móvel e fluxo de  $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (Manzi e col.,1996). O aparelho utilizado é da marca Shimadzu, modelo LC-10AD.

Foram testados alguns solventes (hexano, diclorometano, metanol e a mistura diclorometano/metanol em várias proporções) para promover uma dissolução adequada dos extratos e também evitar problemas posteriores à injeção das amostras no sistema HPLC como, por exemplo, uma incompatibilidade do solvente com a coluna utilizada. A mistura diclorometano/metanol 9:1 ( $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$ ) foi escolhida para a continuação das análises.

Para a quantificação de ergosterol e esqualeno nas amostras, contruiu-se curvas de calibração de ergosterol e esqualeno (concentrações de 25, 50, 100, 200 e  $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), usando colesterol como padrão interno ( $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

As condições de análise em CG-MS foram: coluna capilar de alta resolução (Ultra-2 -  $25\ \text{m} \times 0,20\ \text{mm DI}$ , 5% polifenilmetilsiloxano, filme de  $0,33\ \mu\text{m}$ ) em cromatógrafo gasoso marca Hewlett-Packard 5890 - série II acoplado a um detector de massa HP5971A. Após a injeção a coluna foi mantida a  $50^\circ\text{C}$  por 1 minuto; em seguida, a temperatura foi aumentada para  $270^\circ\text{C}$  a uma taxa de  $25^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e, finalmente, a  $300^\circ\text{C}$  numa taxa de  $1^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . O fluxo de gás carregador (hélio) foi mantido constante a cerca de  $1,0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A temperatura

do injetor foi mantida a 250°C e a do detector a 280°C (Liendo e col., 1998).

Foram testados três solventes para essa análise (diclorometano, acetato de etila e hexano). O hexano foi o solvente utilizado nas injeções seguintes.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Síntese do composto (X=H)

A síntese do composto (X=H) se deu de acordo com uma rota (figura 4) que consistiu de duas etapas: a primeira é uma típica acilação de Friedel-Crafts, na qual reagiu-se 4-bromobifenila com cloreto de ácido benzóico, obtendo-se uma cetona com 80% de rendimento. A segunda etapa corresponde à reação de Wittig, onde reagiu-se a fosforana, obtida a partir de brometo de  $\beta$ -dimetilamino etiltrifenilfosfônio, com a cetona obtida na primeira etapa. Obteve-se, então, o composto (X=H) com 60% de rendimento, após purificação por cromatografia de coluna (De Conti, 1996).

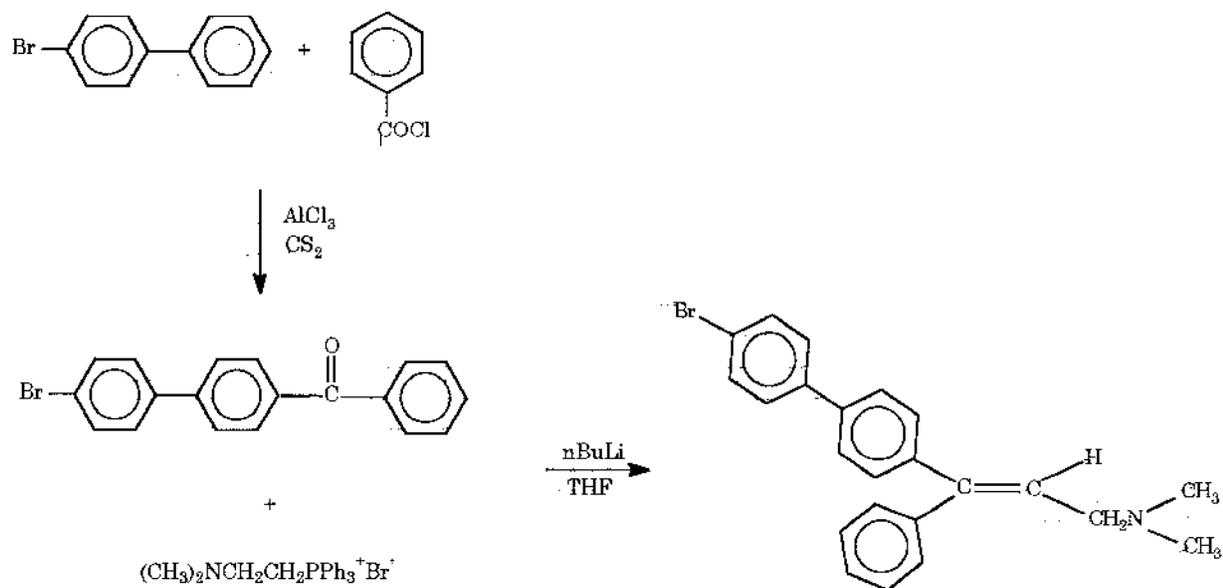


Figura 4: Esquema da rota sintética do composto (X=H).

As sínteses da cetona e do produto final foram confirmadas pelas técnicas de espectroscopia UV, IV, RMN<sup>1</sup>H e MS. A Tabela 1 mostra os dados fornecidos pelos espectros contidos no anexo 2.

**Tabela 1:** Resumo dos dados fornecidos por espectros de UV, IV, RMN<sup>1</sup>H e MS da cetona e do derivado (X=H).

Técnica	Cetona	Composto (X=H)
UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) solvente: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	292	276
IV (cm <sup>-1</sup> ) pastilha KBr	3055,6 (ν C-H arom.) 1643,9 (ν C=O) 823,9 (δ C-H arom. p-dissubst.) 692,4 (δ C-H arom. p-monossubst.)	3029,3 (ν C-H arom.) 1662,3 (ν C=C trissubst.) 1480,2 (ν C-C arom. p-dissubst.) 702,0 (ν C-H arom. p-monossubst.)
RMN <sup>1</sup> H (ppm) 300 MHz solvente: CDCl <sub>3</sub>	7,80-7,90 (2d, 4H arom.) 7,60-7,70 (m, 5H arom.) 7,45-7,55 (m, 4H arom.)	7,1-7,6 (m, 13H arom.) 6,2-6,3 (2t, 1H, C-H) 3,0-3,1 (2d, 2H, C-H <sub>2</sub> ) 2,3 (s, 6H, N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )
MS (m/e)	nd	393/391(M <sup>+</sup> ), 378/376 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> ), 349/347 (M <sup>+</sup> - N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 316/614 (M <sup>+</sup> - C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), 268, 252, 160, 115, 70

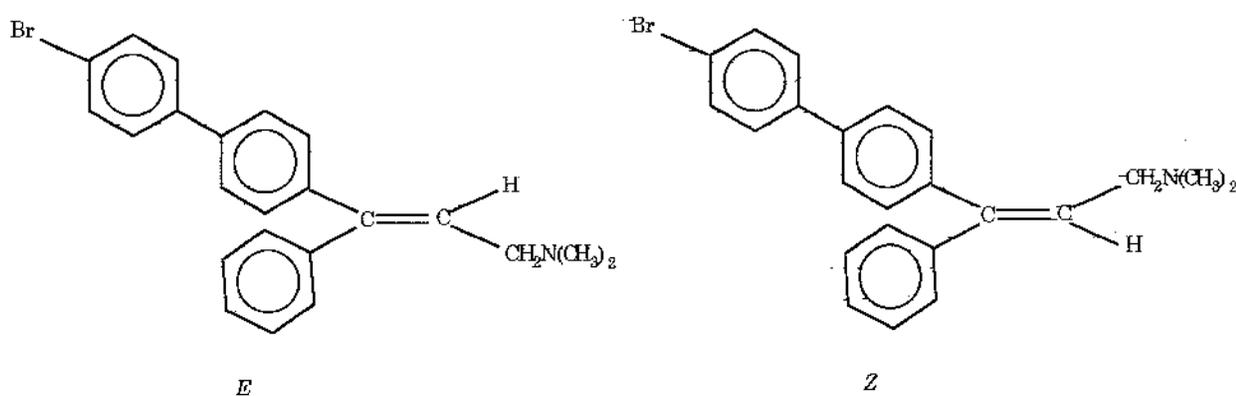
nd: não determinado; ν: estiramento; δ: flexão; H: próton; m: multiplete; t: triplete; d: duplete; s: singlete; arom.: aromático; p-dissubst.: p-dissubstituído; p-monossubst.: p-monossubstituído; trissubst.: trissubstituído; M<sup>+</sup>: radical íon molecular; λ: comprimento de onda.

#### 4.1.2 - Separação dos isômeros *Z* e *E*

A separação de isômeros geométricos é de considerável relevância, tendo em vista as diferenças que tais compostos podem apresentar em termos de atividade biológica. Essas diferenças ocorrem porque, em geral, os isômeros geométricos apresentam propriedades físicas e químicas diferentes. Nos pares de isômeros deste tipo, os

grupos estão separados por distâncias diferentes, o que facilita ou dificulta, conforme o caso, a interação com o receptor e explica porque não é igual a intensidade da ação biológica (Korolkovas e Burckhalter, 1988).

Para a separação dos isômeros *Z* e *E* (figura 5), utilizou-se a técnica de cromatografia de camada delgada preparativa como já descrito.



**Figura 5:** Estruturas dos isômeros *Z* e *E* do composto (X=H).

Os isômeros foram isolados e as respectivas estruturas foram confirmadas usando espectroscopia de UV, IV e RMN<sup>1</sup>H. Os resultados obtidos dos espectros (vide anexo 2) estão resumidos na tabela 2.

O isômero *Z* apresentou absorção máxima num comprimento de onda de 260 nm e o isômero *E* em 286 nm.

Para o derivado (X=H), a denominação *Z* refere-se ao isômero que apresenta os grupos bifenil e dimetil amino do mesmo lado e a denominação *E* refere-se à configuração oposta.

Os espectros de IV dos dois isômeros são ligeiramente diferentes. A banda que caracteriza o estiramento C=C em alceno trissubstituído está em  $1636,3 \text{ cm}^{-1}$  e  $1655,6 \text{ cm}^{-1}$ , para os isômeros *Z* e *E*, respectivamente.

A análise dos espectros de RMN<sup>1</sup>H permitiu afirmar que para o isômero *E*, o próton com  $\delta$  6,3 ppm (triplete, C-H) está em campo mais baixo do que o próton com  $\delta$  6,25 ppm (triplete, C-H) do isômero *Z*. Já os prótons do grupo CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> estão mais protegidos no isômero *E*  $\delta$  3,0 ppm (duplete, CH<sub>2</sub>) e desprotegidos no isômero *Z*  $\delta$  3,1 ppm (duplete, CH<sub>2</sub>). O espectro de RMN<sup>1</sup>H da mistura *Z/E* indicou o mesmo comportamento para prótons aromáticos, vinílicos e de grupo CH<sub>2</sub>. Isto permitiu diferenciar os isômeros no espectro da mistura isomérica.

**Tabela 2:** Dados fornecidos por espectros de UV, IV e RMN<sup>1</sup>H dos isômeros isolados.

Técnica	Isômero <i>Z</i>	Isômero <i>E</i>
UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	260	286
solvente: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		
IV (cm <sup>-1</sup> )	3029,3	3029,3
filme	1636,3	1655,6
solvente:	1480,2	1480,2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	702,0	702,0
RMN <sup>1</sup> H (ppm)	7,1-7,6 (m)	7,1-7,6 (m)
300 MHz	6,25 (t)	6,3 (t)
solvente: CDCl <sub>3</sub>	3,1 (d)	3,0 (d)
	2,3 (s)	2,3 (s)

m: mutiplete, t: triplete, d: duplete, s: singlete.

## 4.2 - Avaliação da atividade tripanossomicida *in vitro*

A tabela 3 mostra valores de IC<sub>50</sub> (concentração de composto capaz de eliminar 50% dos parasitas) da mistura isomérica e dos isômeros isolados do derivado (X=H) sobre formas tripomastigotas.

Esses dados sugerem que o isômero *Z* isolado é mais ativo que o isômero *E*. Este resultado, provavelmente, se deve a um maior grau de afinidade do isômero *Z* por receptores da forma tripomastigota do parasita *T. cruzi*.

Ao se comparar a atividade tripanossomicida da mistura isomérica ( $11,0 \pm 1,4 \mu \text{mol.L}^{-1}$ ) e do isômero *Z* ( $15,8 \pm 4,3 \mu \text{mol.L}^{-1}$ ), observou-se que não houve diferença significativa entre elas. O isômero *E* foi menos ativo que a mistura e o isômero *Z*.

**Tabela 3:** Atividade tripanossomicida da mistura e dos isômeros isolados.

Isômero	<i>E</i>	<i>Z</i>	mistura <i>Z/E</i>
IC <sub>50</sub> ( $\mu \text{mol.L}^{-1}$ )	$25,2 \pm 2,3$	$15,8 \pm 4,3$	$11,0 \pm 1,4$

Assim, uma ordem crescente de susceptibilidade pode ser estabelecida para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, quando expostas à mistura isomérica e aos isômeros isolados:

$$E < Z = \text{mistura isomérica } 1:1$$

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos para a mistura isomérica do derivado bromo de N,N-dimetil-2-propeno-1-

amina e seus respectivos isômeros geométricos (*E/Z*) quando os mesmos foram também avaliados sobre formas tripomastigotas do *T. cruzi* (Fernandes, 1997; Pereira e col., 1998).

### 4.3 - Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade dos compostos foi realizada utilizando-se células fibroblásticas V79, provenientes de pulmão de hamster chinês.

Visando obter informações sobre efeitos tóxicos específicos em diferentes organelas ou funções celulares, foram utilizadas três metodologias (DNA, VN e MTT) que avaliam diferentes alvos celulares.

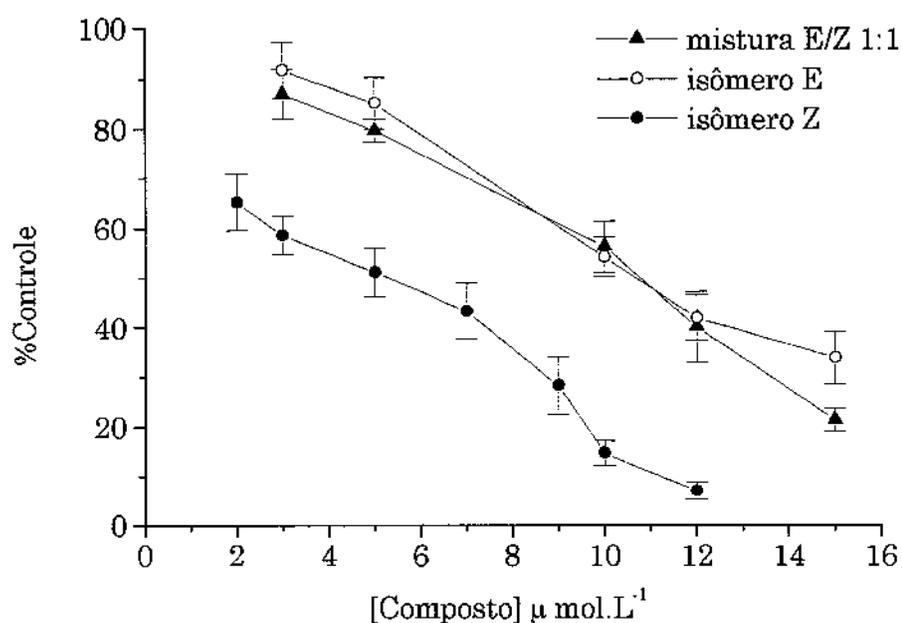
Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 4 para cada ensaio foi feito em triplicata. As respectivas curvas dos gráficos (figuras 6, 7 e 8) representam a média dos valores obtidos em 12 replicatas para cada concentração de droga avaliada. O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do cálculo da ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguido do teste de Fisher.

**Tabela 4:** Citotoxicidade da mistura e dos isômeros isolados.

	IC <sub>50</sub> / $\mu$ mol.L <sup>-1</sup>		
	DNA	VN	MTT
<b>Mistura Z/E</b>	10,8 ± 0,7	5,4 ± 0,9	14,9 ± 0,3*
<b>Isômero Z</b>	5,3 ± 0,6*	6,5 ± 0,7	9,1 ± 0,4*
<b>Isômero E</b>	10,7 ± 0,8	6,6 ± 0,6	16,1 ± 0,4*

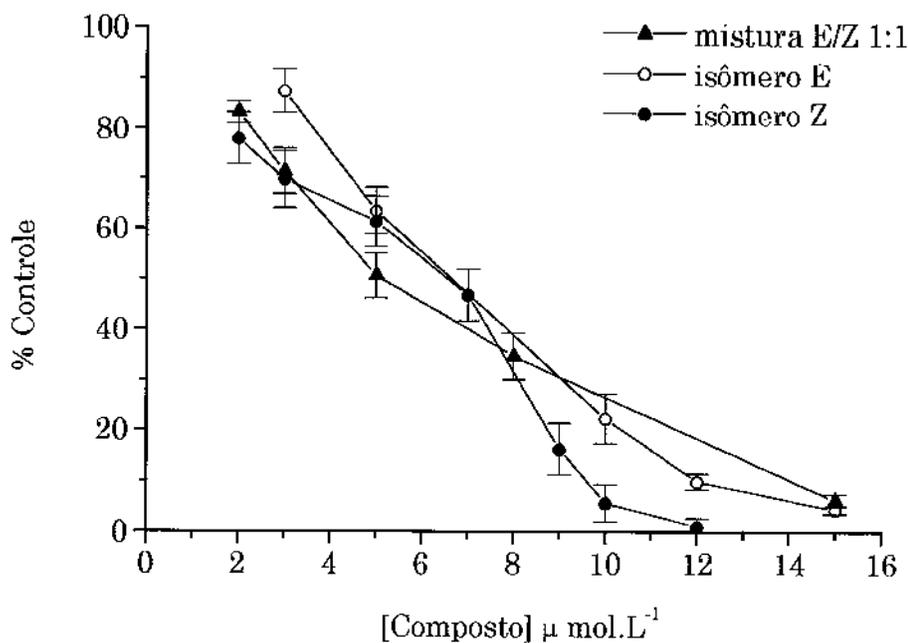
\* valores estatisticamente diferentes entre si, Fisher p < 0,001

A determinação do conteúdo total de DNA (DNA), cujo objetivo é avaliar a capacidade proliferativa das células (Knox e col., 1986), mostrou diferenças na toxicidade dos compostos. O isômero *Z* apresentou o dobro da toxicidade (expressa nos valores de  $IC_{50}$ ) obtida para o isômero *E* e para a mistura dos mesmos. O gráfico da figura 6 revela padrões de decaimento semelhantes entre os compostos testados no que se refere ao conteúdo de DNA medido.



**Figura 6:** Determinação do conteúdo total de DNA (DNA - leitura a 260 nm) de células V79 expostas à mistura e aos isômeros isolados.

Nos ensaios de avaliação da integridade dos lisossomas, onde foi medida a capacidade das células vivas de incorporar o corante VN, os compostos demonstraram toxicidades semelhantes entre si, o que pode ser observado tanto através do perfil das curvas (figura 7) quanto pelos valores de  $IC_{50}$  obtidos (não há diferença estatística entre eles).



**Figura 7:** Avaliação da integridade lisossomal (VN - leitura a 540 nm) de células V79 expostas à mistura e aos isômeros isolados.

A toxicidade do composto (X=H) foi maior no ensaio de VN em relação aos resultados obtidos nos outros ensaios de citotoxicidade. Esse efeito foi observado para este e outros derivados de N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (De Conti, 1996; De Conti e col., 1998).

Compostos que apresentam caráter anfifílico (um grupamento amino primário e uma região hidrofóbica) que se acumulam no lisossomas induzindo a lipidose são denominados lisossomatrópicos. O fenômeno da lipidose ocorre, provavelmente, pela interação dessas substâncias com fosfolipídeos, provocando a desestabilização das estruturas componentes da membrana lisossomal e, conseqüentemente, o acúmulo das mesmas no interior da organela (De Conti, 1996).

As alterações produzidas por agentes lisossomatrópicos provocam a redução na incorporação de VN e isto faz com que seja possível distinguir células viáveis de células danificadas ou mortas (Borenfreund e Puerner, 1984).

Drogas que induzem a lipidose causam lesões no sistema nervoso central, provocando alterações no tecido ocular (Hein e col. 1990). A zimelidina é um antidepressivo que foi retirado do mercado por apresentar efeitos colaterais severos, induzindo a lipidose e apresentando neurotoxicidade. No entanto, drogas como a clorpromazina e a amitríptilina mostraram pronunciado efeito lisossomatrópico em cultura de células mas não induzem a lipidose em humanos (Lüllmann e col., 1978).

Existe a possibilidade de que os derivados de N,N-dimetil-2-propeno-1-amina, por terem demonstrado toxicidade específica sobre os lisossomas e apresentarem um grupo amino e uma região hidrofóbica, possam também induzir a lipidose.

É interessante ressaltar a existência de alguns compostos tricíclicos usados como antidepressivos (imipramina e derivados) que são lisossomatrópicos e apresentam atividade contra o *T. cruzi* (Doyle e Weinbach, 1989). É provável que esse caráter anfifílico possa estar relacionado com a atividade antiparasitária desses compostos (Duve e col., 1974).

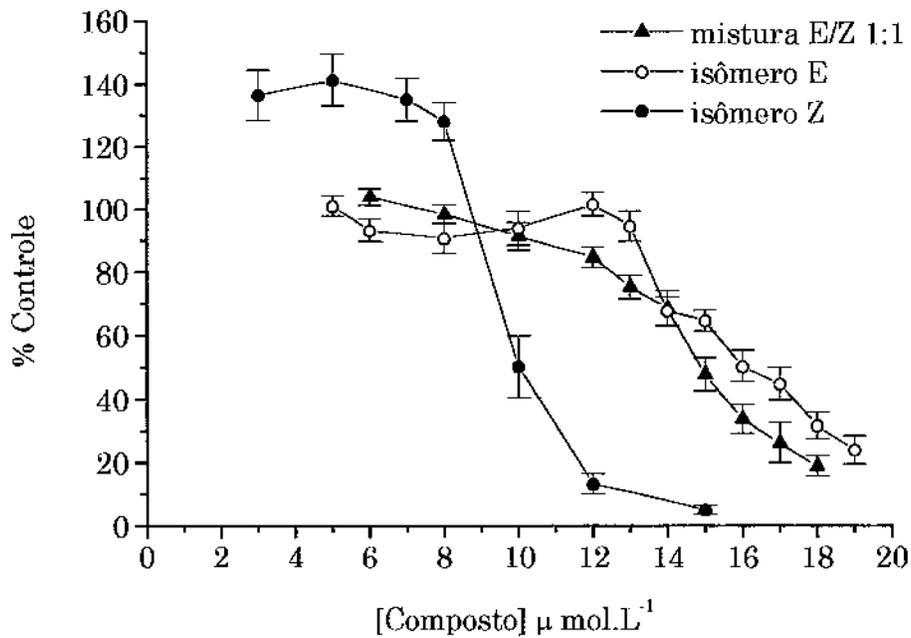
A redução do sal de tetrazólio MTT a formazan, um cristal azul solúvel em etanol, foi utilizada para avaliar o funcionamento correto das mitocôndrias, através da redução enzimática do MTT pela succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis (Denizot e Lang, 1986). A quantidade de formazan produzida é proporcional à quantidade de células, pois tal redução ocorre somente em células vivas ou não danificadas.

Alguns estudos detalhados utilizando mitocôndrias extraídas de homogenatos de fígado e hepatócitos intactos indicaram, no entanto, que a redução de MTT ocorre, predominantemente, através do sistema redox NAD(P)/NADP(H) citosólico. A avaliação da redução do MTT em células V79, tratadas com conhecidos inibidores ou indutores do balanço redox citosólico, confirmou o envolvimento do sistema NAD(P)/NADP(H) na produção de formazan (Fry e col.1995).

A citotoxicidade dos compostos foi menor no ensaio de avaliação da redução de MTT, em comparação com os métodos DNA e VN. O isômero Z apresentou maior toxicidade nos três métodos de avaliação da citotoxicidade. Este isômero, como mostrado na seção 4.1, foi também o mais ativo *in vitro* sobre formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Este resultado está em concordância com estudos realizados anteriormente com outros compostos da série (Oliveira e col., 1998).

No ensaio de MTT foi observado um estímulo à redução do sal em células tratadas com baixas concentrações de composto-teste

(figura 8). Este comportamento foi observado, anteriormente, ao serem testados vários derivados de N,N-dimetil-2-propeno-1-amina na forma de mistura isomérica (De Conti e col., 1998).



**Figura 8:** Avaliação da integridade mitocondrial (MTT - leitura a 570 nm) de células V79 expostas à mistura e aos isômeros isolados.

Estes resultados podem ser explicados pela hiperativação de um ou dos dois sítios (balanço redox NAD(P)/NADP(H) citosólico e da enzima succinato desidrogenase mitocondrial) onde tem sido verificada a redução do sal. Esta hiperativação sugere que talvez exista um mecanismo de defesa celular, que se manifeste quando um agente tóxico se encontra baixas concentrações. Não se sabe, ainda, se os compostos testados atuaram somente sobre a mitocôndria ou se tal comportamento reflete um mecanismo dual de atividade citotóxica.

Sabendo-se que o consumo de oxigênio está relacionado com o correto funcionamento do ciclo de Krebs, no qual participa a succinato desidrogenase que reduz o sal MTT, propõe-se que este mecanismo de citotoxicidade do composto seja elucidado através da medida do consumo de oxigênio pela cadeia respiratória, utilizando mitocôndrias isoladas.

#### 4.4 - Avaliação da toxicidade aguda *in vitro*

Os testes de toxicidade aguda da mistura isomérica e dos isômeros em bactéria (*E. coli*) foram realizados em duplicata tendo-se, como parâmetro de avaliação, a inibição da respiração microbiana. Este parâmetro foi medido através do monitoramento de CO<sub>2</sub> que é liberado pela bactéria durante o processo de fermentação da glicose.

A tabela 5 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os três compostos em relação ao controle. A análise estatística dos dados foi feita através do cálculo da ANOVA seguido do teste t de Duncan. A toxicidade dos isômeros isolados foi estatisticamente diferente, sendo que o isômero *E* mostrou-se mais tóxico que o *Z* neste ensaio. Já a mistura isomérica apresentou-se levemente menos tóxica que os isômeros isolados.

**Tabela 5:** Toxicidade aguda *in vitro* (*E. coli*) da mistura e dos isômeros isolados.

Isômero	<i>E</i>	<i>Z</i>	mistura <i>Z/E</i>
IC <sub>50</sub> (μmol/L)	3,8 ± 0,1*	5,0 ± 0,3*	6,5 ± 0,8*

\*valores estatisticamente diferentes entre si, t de Duncan  $p < 0,05$

A diferença observada na ordem de toxicidade dos compostos entre os ensaios de citotoxicidade e os de toxicidade aguda *in vitro* sugere que os mecanismos de ação tóxica dos compostos sobre fibroblastos e sobre *E. coli* são, provavelmente, diferentes.

#### **4.5 - Avaliação da toxicidade *in vivo***

##### **4.5.1 - Teste de Toxicidade Aguda (*dose simples*)**

Neste ensaio, as doses dos isômeros isolados utilizadas foram estipuladas de acordo com resultados obtidos por Pereira (não publicados) durante ensaios para a obtenção da  $DL_{50}$  do composto (X=H) na forma de mistura isomérica 1:1. Por não haver quantidades suficientes dos isômeros isolados para a utilização de outros níveis de dose, decidiu-se utilizar um valor acima ( $140 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e outro abaixo ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) do valor da  $DL_{50}$  da mistura isomérica, que é  $123 \text{ mg.kg}^{-1}$  (dados não publicados).

A análise estatística dos escores obtidos para cada grupo nos parâmetros avaliados foi feita através de ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida do teste de comparações múltiplas.

O cálculo da ANOVA mostrou que os parâmetros atividade geral, resposta ao toque, contorção, posição do trem posterior, tônus do corpo e ataxia foram os que apresentaram alguma diferença estatística entre os grupos avaliados.

A atividade geral está relacionada ao estado consciente e à disposição dos animais. Os outros parâmetros citados acima são usados para a avaliação da atividade somatomotriz e do tônus muscular.

Em todos os parâmetros analisados apenas o composto *E*, nos dois níveis de dose utilizados, produziu alterações significativas em relação ao grupo controle. Na comparação entre os dois isômeros, o composto *E* mostrou-se mais tóxico que o *Z*.

No decorrer do experimento, os animais tratados que sofreram alterações no comportamento geral, apresentaram recuperação dos sintomas, não havendo nenhuma mortalidade após 24 e 48 horas de experimento. Estes resultados indicam a reversibilidade da toxicidade apresentada pela administração da substância-teste.

#### **4.5.2 - Teste do Campo Aberto**

O teste do campo aberto é usado como modelo animal para o estudo de substâncias que estimulam ou deprimem o sistema nervoso central. Os efeitos mensurados são o aumento ou a diminuição da movimentação do animal, sua atividade exploratória e sua emotividade (Walsh e Cummins, 1976). É relativamente fácil, barato, não exige grandes quantidades de droga e, ao mesmo tempo, pode oferecer informações importantes relativas à neurotoxicidade da droga em estudo.

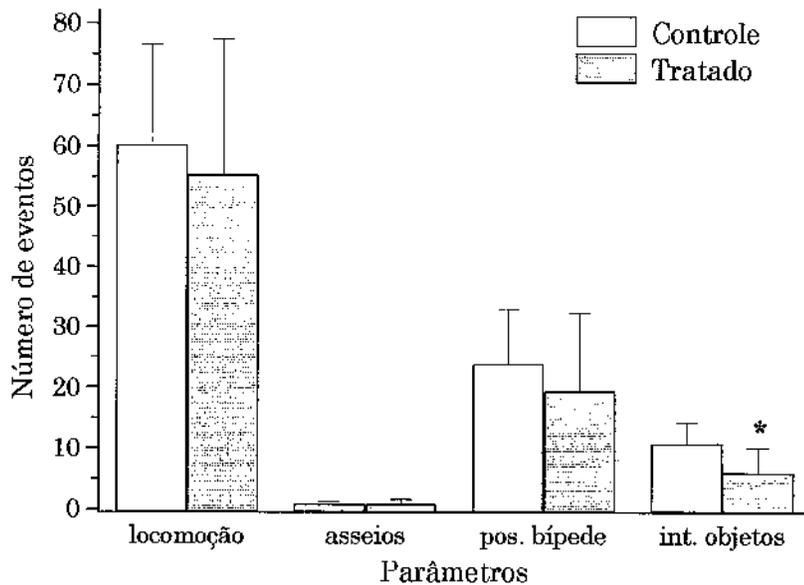
Neste trabalho, o interesse em testar a toxicidade do derivado (X=H) sobre os animais no teste do campo aberto se deve ao fato de existir uma grande similaridade estrutural desse composto com a zimelidina, um antidepressivo comprovadamente neurotóxico que atualmente é utilizado como controle positivo em modelos animais de depressão.

Fixou-se a dose do derivado (mistura isomérica 1:1) a ser utilizada neste experimento em  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ , tomando-se por base os resultados obtidos por Pereira (dados não publicados) que mostraram não haver alterações comportamentais em camundongos tratados com uma dose de  $80 \text{ mg.kg}^{-1}$  do derivado não-substituído.

Os resultados obtidos, para cada um dos parâmetros avaliados, utilizando-se uma dose de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  do composto, estão reunidos na figura 9. Os dados estão apresentados como o número de vezes em que o comportamento analisado foi observado  $\pm$  desvio padrão.

A análise estatística dos dados (teste  $t$  de Student), demonstrou que não ocorreram alterações significativas no comportamento (movimentação e emotividade) dos animais, uma hora após o tratamento com a droga, quando comparado ao comportamento dos animais do grupo controle. No parâmetro que avalia a capacidade exploratória dos animais através da interação com objetos, foi observada uma redução significativa no número de interações com os objetos do campo para o grupo tratado. Este resultado revela que

houve alteração na capacidade de percepção e discriminação dos animais tratados em relação ao grupo controle.



**Figura 9:** Efeitos comportamentais do derivado não-substituído (mistura E/Z 1:1) e do veículo sobre camundongos, observados no teste de campo aberto em camundongos (n=7). \*  $p < 0,05$ , teste t de Student.

A grande variabilidade entre os dados obtidos dentro de cada grupo levou à obtenção de desvios padrão altos. O fato de não existir diferença estatística significativa entre grupo de animais controle e tratado para a maioria dos parâmetros analisados, pode estar relacionado a esses desvios. Sendo assim, torna-se necessário que este experimento seja realizado, posteriormente, com um número maior de animais em cada grupo.

#### **4.6 - Avaliação da atividade tripanossomicida *in vivo***

A atividade tripanossomicida *in vivo*, previamente determinada para a mistura isomérica do derivado (X=H) (Pereira e col., 1998), mostrou que não houve redução significativa dos níveis de parasitemia; logo, a mortalidade em camundongos com 5 dias de parasitemia, tratados com uma dose única de 200 mg.kg<sup>-1</sup> do derivado não-substituído, não foi alterada.

Decidiu-se, portanto, suspender os estudos de atividade tripanossomicida *in vivo* dos isômeros isolados, tendo em vista a baixa atividade apresentada pela mistura isomérica e as dificuldades em se obter massa suficiente de tais compostos para a realização dos testes com doses mais altas (300 mg.kg<sup>-1</sup>, por exemplo).

#### **4.7 - Investigação do mecanismo de ação tripanossomicida**

O estudo do mecanismo de ação do composto (X=H), como possível inibidor da biossíntese do ergosterol, foi realizado utilizando-se o fungo *Trichophyton rubrum* e formas epimastigotas do *T. cruzi*.

#### 4.7.1 - Ensaios preliminares

O fungo *T. rubrum* foi escolhido porque é mais susceptível (*in vitro*) a drogas como a terbinafina e a naftifina do que as leveduras *Saccharomices cerevisiae* e *Candida albicans*, por exemplo. Essas alilaminas inibem, especialmente, a esqualeno epoxidase de fungos patogênicos (dermatófitos). A inibição da esqualeno epoxidase faz com que a terbinafina tenha uma atividade primária em relação a outros antimicóticos, já que tal droga atua na primeira etapa da biossíntese do ergosterol (vide figura 1) (Favre e Ryder, 1996).

A similaridade do derivado de N,N-dimetil-2-propeno-1-amina com as alilaminas justifica, então, a utilização do fungo *T. rubrum* nos ensaios preliminares de investigação.

A observação visual de placas, com meio de cultura sólido, e de Erlenmeyers, com meio líquido contendo o fungo inoculado com o composto (X=H), demonstrou que houve inibição do crescimento do fungo, em relação ao controle.

Após dois dias do inóculo, o fungo cresceu apenas nas placas referentes às concentrações de 10, 50 e 120  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , apresentando uma diminuição no crescimento, em relação ao controle, com o aumento da concentração da droga.

Após três dias, houve um pequeno crescimento do fungo nas concentrações de 240  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 360  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , em relação ao controle.

Em meio líquido o fungo cresceu mais e o efeito apresentado pela droga foi semelhante ao da cultura em meio sólido.

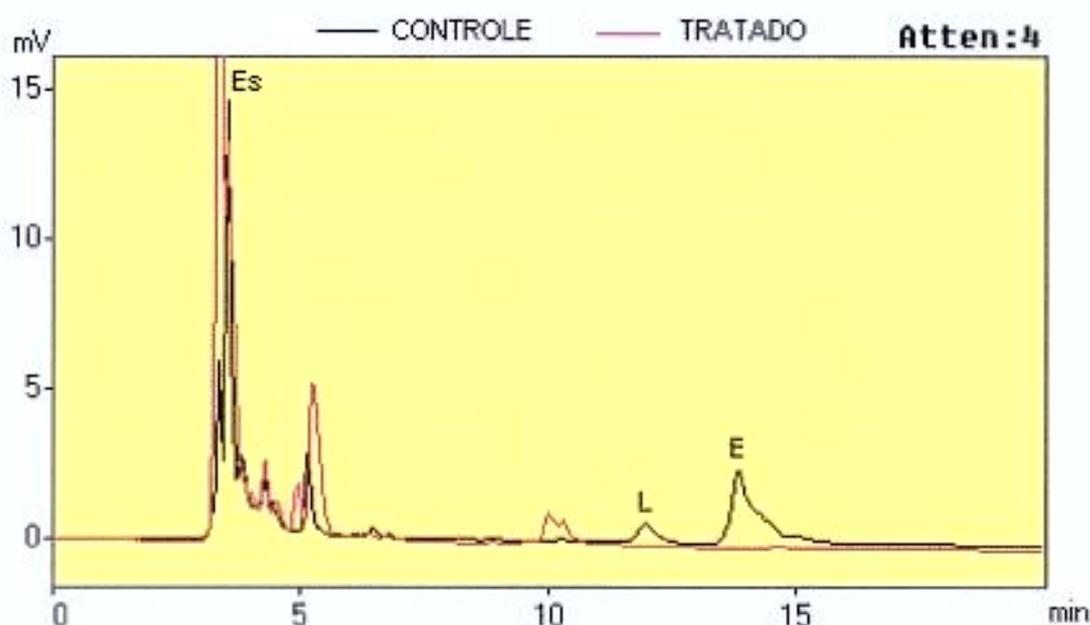
#### 4.7.1.1 – Análise do Extrato Lipídico de *T. rubrum*

Após o procedimento de extração, os extratos lipídicos foram analisados por TLC e HPLC.

A análise cromatográfica por TLC dos extratos lipídicos demonstrou a presença de ergosterol nas amostras controle e a ausência do mesmo nas amostras tratadas. Não se observou acúmulo do esqualeno nas amostras tratadas, o que poderia indicar inibição da biossíntese na etapa de epoxidação do esqualeno.

A injeção de padrões de esteróis na análise por HPLC, forneceu os tempos de retenção para o lanosterol e o ergosterol de 12,3 e 14,2 minutos, respectivamente. O tempo de retenção do esqualeno não pode ser medido com exatidão porque foi pouco retido pela coluna, saindo com alguns interferentes do início da corrida cromatográfica. Nestas condições, portanto, foram analisados apenas o lanosterol e o ergosterol.

A análise cromatográfica dos extratos mostra claramente a inibição da biossíntese do ergosterol, haja vista a depleção deste esterol nas amostras tratadas com o composto (figura 10). Ocorreu também nítida redução dos níveis de lanosterol em tais amostras, o que indica um provável acúmulo de esqualeno.



**Figura 10:** Cromatogramas das amostras de extrato lipídico de *T. rubrum*, referentes ao controle e ao tratamento com droga ( $360 \mu \text{mol.L}^{-1}$ ). E: ergosterol; L: lanosterol; Es: esqualeno.

Foi necessário modificar as condições cromatográficas para tornar possível a análise de esqualeno nas amostras seguintes (extratos de formas epimastigotas do *T. cruzi*).

#### 4.7.2 – Análise do Extrato Lipídico de *T. cruzi*

Nas duas primeiras tentativas, os epimastigotas do *T. cruzi* ficaram por um período de 24 horas em contato com a droga na concentração de  $12 \mu \text{mol.L}^{-1}$  ( $\text{IC}_{50}$  do composto sobre epimastigotas; De Conti, 1996) e  $25 \mu \text{mol.L}^{-1}$ . Em seguida, iniciaram-se as etapas de extração de lipídeos.

Foi necessária uma atenção especial na manipulação da quantidade de amostra obtida, em torno de 2 mg de extrato, para se

evitar a interferência de impurezas na análise dos componentes de interesse.

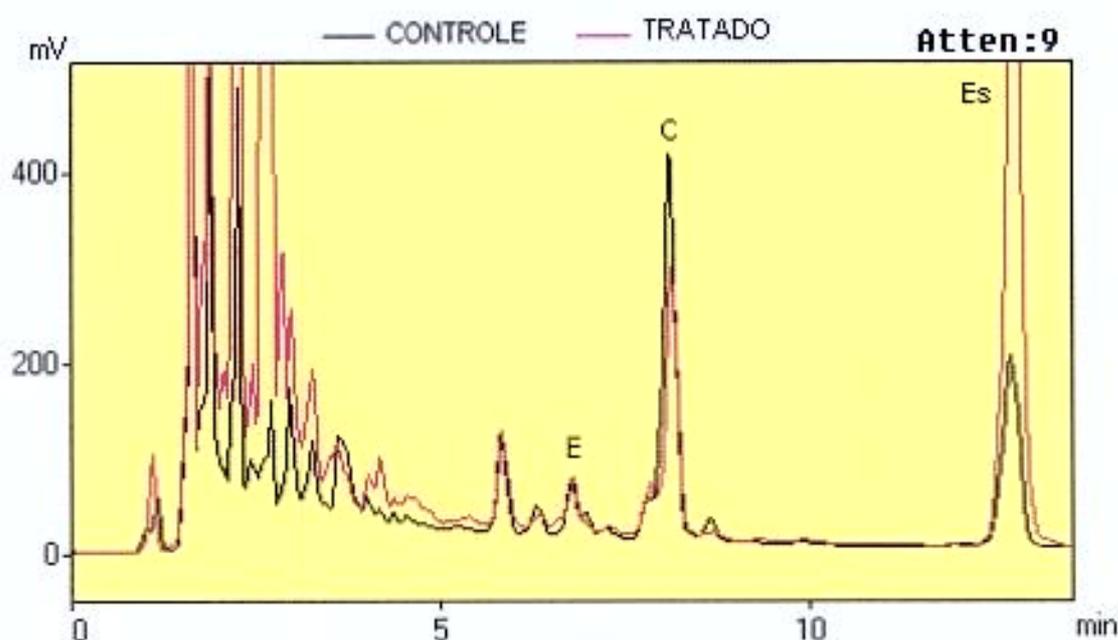
Nas amostras obtidas através do ensaio de 24 horas, analisadas por cromatografia de camada delgada e HPLC, observou-se a presença de ergosterol, esqualeno e colesterol. Porém, não foi possível diferenciar, através desses métodos, os níveis de esteróis presentes.

No terceiro ensaio, utilizou-se um volume maior de cultura de parasitas (50 mL) para se obter maior quantidade de extrato. Neste caso, foi utilizada apenas a concentração de  $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$  do derivado. Obteve-se, então, cerca de 5 mg de cada amostra nos dois períodos de incubação utilizados (24 e 48 horas).

Novamente, as amostras com 24 horas de incubação não apresentaram diferenças entre si, quanto à composição de esteróis. Já as amostras incubadas a 48 horas, apresentaram diferenças quando analisadas por HPLC (figura 11). Através da utilização das curvas de calibração (vide anexo 3) de esqualeno e ergosterol, pode-se notar que houve acúmulo de esqualeno:  $18 \mu\text{g.mL}^{-1}$  no controle e  $76 \mu\text{g.mL}^{-1}$  na amostra tratada e uma pequena redução de ergosterol:  $63 \mu\text{g.mL}^{-1}$  no controle e  $52 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , na tratada.

Também foi possível caracterizar os esteróis presentes nos extratos lipídicos através da utilização da técnica de CG-MS cujo fundamento é a separação dos compostos presentes na amostra por cromatografia gasosa, seguida da análise de cada um dos componentes

por espectrometria de massa. A quantidade de amostra utilizada nessa técnica (1  $\mu\text{L}$  de extrato na concentração de 10  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) foi muito pequena, o que representou uma grande vantagem.



**Figura 11:** Cromatogramas das amostras de extrato lipídico de epimastigotas de *T. cruzi* incubadas durante 48 horas com e sem a droga (controle). E = ergosterol, C = colesterol e Es = esqualeno.

Com base nos resultados obtidos, pode-se dizer que composto inibe a biossíntese do ergosterol de *T. cruzi* e de *T. rubrum*; porém, é necessário um tempo maior de incubação para que se possa observar, com maior precisão evidência, a interferência da droga na biossíntese do protozoário. Os resultados obtidos nos ensaios com o fungo *T. rubrum* revelaram, com clareza, a inibição da biossíntese do ergosterol pelo composto (X=H), pois foi utilizado um tempo de exposição de 5 dias.

O acúmulo de esqualeno nas amostras tratadas sugeriu que a ocorreu inibição na primeira etapa da biossíntese (epoxidação do esqualeno) em epimastigotas de *T. cruzi*. Esse resultado indica que, provavelmente, o composto apresenta um modo de ação igual ao das alilaminas.

A redução dos níveis de ergosterol em formas amastigotas e epimastigotas, tratadas com compostos azólicos e alilaminas, induz alterações ultraestruturais. Lazard e colaboradores (1990) observaram, através de microscopia eletrônica de varredura, alterações como o aumento do volume (entumescimento) do complexo kinetoplastídeo-mitocôndria e perda da organização da membrana interna e de corpos eletronicamente densos de sua matriz. Estes eventos coincidem com o início da lise celular. Como o derivado (X=H) apresentou um mecanismo de ação similar ao desses compostos, sugere-se a realização de um estudo posterior sobre as possíveis alterações ultraestruturais, produzidas em formas epimastigotas, por este composto.

## 5 - CONCLUSÕES

- Obteve-se sucesso na preparação do derivado não-substituído de N, N-dimetil-2-propeno-1-amina e na separação de seus isômeros *Z* e *E* em quantidades suficientes para a realização dos ensaios biológicos;
- O composto *Z* apresentou maior toxicidade nos ensaios de citotoxicidade. A maior toxicidade foi observada ao nível dos lisossomas (incorporação de VN), sugerindo efeito lisossomatrópico dos compostos. No ensaio de MTT foi observado estímulo à redução do sal em baixas concentrações dos compostos;
- Nos ensaios de toxicidade aguda *in vitro* a ordem de toxicidade foi *E* > *Z* > mistura *E/Z*. Provavelmente, os mecanismos de ação tóxica da droga sobre *E. coli* e sobre células V79 são diferentes;
- O isômero *E* foi mais tóxico que o *Z* nos ensaios de toxicidade aguda *in vivo* (dose simples) e houve recuperação das funções normais após 24h de ensaio;
- Não ocorreram alterações significativas nos comportamentos de locomoção e emotividade dos animais tratados com o composto no teste do campo aberto; entretanto, uma redução na capacidade exploratória destes animais foi observada;
- Observou-se na avaliação da atividade tripanossomicida *in vitro*, que o isômero *Z* foi mais ativo que o *E* e semelhante à mistura.

- Os resultados sugerem inibição da biossíntese do ergosterol como um possível mecanismo de ação tripanossomicida do derivado de N,N-dimetil-2-propeno-1-amina.

## 6 - SUMMARY

Recent studies have showed the efficacy of E / Z - 3 - (4' - bromo - [1,1'-biphenyl] - 4- yl) - (4 - X - phenyl) - N, N - dimethyl - 2 - propen - 1-amine derivatives on the three forms from the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the Chagas disease causative agent. The non-substituted derivative (X=H) was one the most active and less toxic from these series. In the present work, the compound (X=H) was prepared and their isomers *Z* e *E* separated by thin layer preparative chromatography for the execution of biological assays. The *Z* isomer was more active than *E* isomer on tripomastigote forms from *T. cruzi*. In the DNA content (DNA) and tetrazolium salt reduction (MTT) assays, using V79 fibroblast cell line, the *Z* isomer was the most toxic. In the neutral red uptake (NRU) method, the isomeric mixture and isolated isomers showed equivalent toxicities. The compounds were more toxics in this method when compared with MTT and DNA. The *E* isomer exhibited the high toxic effect in the evaluation of acute toxicity on *Escherichia coli* bacteria and swiss male mice. In the open field assay there was no behavioral alterations in the treated mice with the isomeric mixture, related to the control. The activity studies of the compound (X=H) on the fungus *Trichophyton rubrum* and epimastigote forms from *T. cruzi*, indicated that the trypanocidal mode of action of this compound, probably, involves the ergosterol biosynthesis inhibition.

---

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, Z.A.; Andrade, S.G.; Sadigursky, M.; Wenthold Jr, R.J.; Hilbert, S.L. e Ferrans, V.J. (1997). "The Indeterminate Phase of Chagas' Disease: Ultrastructural Characterization of Cardiac Changes in the Canine Model". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 57, n. 3, p. 328-336.
- Berkovitz, B. A. e Katzung, B.G. (1994). "Avaliações Básica e Clínica dos Novos Medicamentos". Em: *Farmacologia Básica e Clínica*. Ed. B.G. Katzung, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 46-52.
- Borenfreund, E. e Puerner, J.A. (1984). "A Simple Quantitative Procedure Using Monolayer Cultures for Cytotoxicity Assays (HTDNR-90)". *J. Tiss. Cult. Meth.* v. 9, p. 7-9.
- Bryan, R.T.; Balderrama, F.; Tonn, R.J. e Dias, J.C.P. (1994). "Community Participation in Vector Control: Lessons from Chagas' Disease" *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 50, n.6, 61-71.
- Cazzulo, J.J.; Stoka, V. e Turk, V. (1997). "Cruzipain, the Major Cysteine Proteinase from the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*". *Biol. Chem.* v. 378, p. 1-10.
- Chabala, J.C.; Waits, V.; Ikeler, T.; Patchett, A.A.; Wyvratt, M.; Hanson, W.L. e Fischer, M.H. (1991). "1-(Substituted)benzyl-5-aminoimidazole-4-carboxamides are Potent Orally Active Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* in Mice". *Experientia.* v. 47, p. 5-

53.

- Chan, C.; Yin, H.; Garforth, J.; McKie, J.H.; Jaouhari, R.; Speers, P.; Douglas, K.T.; Reek, P.J.; Yardley, V.; Croft, S.L. e Fairlamb, A.H. (1998). "Phenothiazine Inhibitors of Trypanothione Reductase as Potential Antitrypanosomal and Antileishmanial Drugs". *J. Med. Chem.* v. 41, p. 148-156.
- Cingi, M.R.; De Angelis, I.; Fortunati, E.; Reggiani, D.; Bianchi, V.; Tiozzo, R. e Zucco, F. (1991). "Choice and Standardization of Test Protocols in Cytotoxicology: a Multicentre Approach". *Toxic. In Vitro.* v. 5, n. 2, p. 119-125.
- Cinque, G.; Szajnman, S.H.; Zhong, L.; Docampo, R.; Schwartzapel, A.J.; Rodriguez, J.B. e Gros, E.G. (1998). "Structure-Activity Relationship of New Inhibitors of *Trypanosoma cruzi*". *J. Med. Chem.* v. 41, p. 1540-1554.
- Contreras, L.M.; Vivas, J. e Urbina, J.A. (1997). "Altered Lipid Composition and Enzyme Activities of Plasma Membranes from *Trypanosoma (Schizotrypanum) Cruzi* Epimastigotes Grown in the Presence of Sterol Biosynthesis Inhibitors". *Biochem. Pharmacol.* v. 53, p. 697-704.
- Corrêa, A.D.; Miranda-Filho, N.; Siqueira-Batista, R.; Silva-Reis, C.L.S.; Vahia-Loureiro e A.M.; Huggins, D.W. (1996). Em: *Moléstia de Chagas*. Eds. R. Siqueira-Batista, A.D. Corrêa e D.W. Huggins, Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 16-38.

- Crovato, F.; Reborá, A. (1997). "Chagas' Disease: A Potential Plague for Europe?". *Dermatol.* v. 195, p. 184-185.
- De Castro, S.L. (1993). "The Challenge of Chagas' Disease Chemotherapy: An Update of Drugs Assayed Against *Trypanosoma cruzi*". *Acta Tropica.* v. 53, p. 83-98.
- De Castro, S.L.; Soeiro, M.N.C. e Meirelles, M.N.L. (1987). "Effect of Drugs on Amastigotes and Tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi* on the Interaction of Heart Muscle Cell With Bloodstream Tripomastigotes". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 81, p. 154.
- De Castro, S.L.; Pinto, M.C.F.R. e Pinto, A.V. (1994). "Screening of Natural and Synthetic Drugs Against *Trypanosoma cruzi*". *Microbios.* v. 78, p. 83-90.
- De Conti, R. (1996). *Síntese, Toxicidade e Atividade Tripanocida de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas.
- De Conti, R.; Gimenez, S.M.N.; Haun, M.; Pilli, R.A.; De Castro, S.L. and Durán, N. (1996a). "Synthesis and Biological Activities of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine Derivatives". *Eur. J. Med. Chem.* v. 31, p. 915-918.
- De Conti, R.; Oliveira, D.A.; Fernandes, A.M.A.P.; Melo, P.S.; Rodriguez, J.A.; Haun, M.; De Castro, S.L.; Souza-Brito, A.R.M. e Durán, N. (1998). "Application of a Multi-Endpoint Cytotoxicity

- Assay to the Trypanocidal Compounds 2-propen-1-amine Derivatives and Determination of Their Acute Toxicity". *In Vitro Molec. Toxic.* v. 11, n. 2, p. 153-160.
- De Conti, R.; Santa Rita, R.M.; De Souza, E.M.; Melo, P.S.; Haun, M.; De Castro, S.L. and Durán, N. (1996b). "In Vitro Trypanocidal Activities of a Novel Series of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine Derivative". *Microbios.* v. 85, p. 83-87.
- Denizot, F.; Lang, R. (1986). "Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival: Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reability". *J. Immun. Methods.* v. 89, p. 271-277.
- Do Campo, R.; Moreno, S.N.J. e Stoppani, A.O.M. (1981). "Nitrofurantoin Enhancement of Microsomal Electron Transport, Superoxide Anion Production and Lipid Peroxidation". *Arch. Biochem. Biophys.* v. 207, n. 2, p. 316-324.
- Doyle, P.S. e Weinbach, C. (1989). "The Activity of Tricyclic Antidepressant Drugs Against *Trypanosoma cruzi*". *Parasitol.* v. 68, p. 230-234.
- Durán, N. e Haun, M. (1991). "Trypanocides: State of Art". *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* v. 86, p. 29.
- Durán, N.; Campos, V.; Riveros, R.; Joyas, A.; Pereira, M.F. e Haun, M. (1989). "Bacterial Chemistry-III: Preliminary Studies on Trypanosomal Activities of *Chromobacterium violaceum*

Products". *An. Acad. Bras. Cien.*, v. 61, n. 1, p. 31-36.

Duve, C; Barsy, T.; Poole, B.; Trovet, A.; Tullkens, P. e Van Hoof, F.

(1974). "Lisossomatropie Agents". *Biochem. Pharmacol.* v. 23, p. 2495-2531.

Favre, B. e Ryder, N.S. (1996). "Characterization of Squalene

Epoxidase Activity from the Dermatophyte *Trichophyton rubrum* and Its Inhibition by Terbinafine and Other Antimycotic Agents".

*Antimicrob. Agents Chemother.* v. 40, n. 2, p. 443-447.

Fernandes, A.M.A.P. (1997). *Preparação, Caracterização, e Avaliação*

*da 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.* Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas.

Fry, J.R.; Hammond, A.H.; Atmaca, M.; Dhanjal, P. e Wilkinson, D.J.

(1995). "Toxicity Testing with Hepatocytes: Some Methodological Aspects" *Atla.* v. 23, p. 91-96.

Giraut, S.; Baillet, S.; Horvath, D.; Lucas, V.; Davioud-Charvet, E.;

Tartar, A. e Sergheraert, C. (1997). "New Potent Inhibitors of Trypanothione Reductase from *Trypanosoma cruzi* in the 2-

Aminodiphenylsulfide series" *Eur. J. Med. Chem.* v. 32, p. 39-52.

Goldberg, A.M. e Frazier, J.M. (1989) "Alternatives to Animals in

Toxicity Testing". *Scientific American.* v. 261, n. 2, p. 16-22.

Hein, L.; Lüllmann-Rauch, R. e Mohr, K. (1990). "Human Accumulation

Potential of Xenobiotics: Potential of Catamphiphilic Drugs to Promote Their Accumulation Via Inducing Lipidosis, or Mucopolysaccharidosis". *Xenobiotica*. v. 20, n. 11, p. 1259-1267.

Hunter, K.J.; Le Quesne, S. A. e Fairlamb, A. H. (1994). "Identification and Biosynthesis of N<sup>1</sup>,N<sup>9</sup>-bis (glutathionyl) aminopropyl cadaverine (homotrypanothione)". *Eur. J. Biochem.* v. 226, p. 1019-1027.

Jardim, W.F.; Pasquini, C.; Guimarães, J.R. e Faria, L.C. (1990). "Short-Term Toxicity Test Using *Escherichia coli*: Monitoring CO<sub>2</sub> Production by Flow Injection Analysis". *Wat. Res.* v. 24, n.3, p. 351-354..

Kinnamon, K.E.; Poon, B.T.; Hanson, W.L. e Waits, V.B. (1997). "Evidence that Certain 8-aminoquinolines are Potentially Effective Drugs Against Chagas Disease". *An. Trop. Med. Parasitol.* v. 91, n. 2, p. 147-152.

Kirehhoff, L.V. (1993)."Chagas Disease". *Infectious Disease Clinics of North America*. v. 7, n. 3, p. 487-502.

Knox, K.; Uphill, P.F.; Fry, J.R.; Benford, J. e Balls, M. (1986). "The Frame Multicentre Project on In Vitro Cytotoxicology". *Fd. Chem. Toxic.* v. 24, n. 6/7, p. 457-463.

Larralde, G.; Vivas, J. e Urbina, J.A. (1988)."Concentration and Time Dependence of the Effects of Ketoconazole on Growth and Sterol Synthesis by *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*

- Epimastigotes". *Acta Cient. Venez.* v. 39, p. 140-146.
- Lazardi, K.; Urbina, J.A. e Souza, W. (1990). "Ultrastructural Alterations Induced by Two Ergosterol Biosynthesis Inhibitors, Ketoconazole and Terbinafine, on Epimastigotes and Amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*". *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 34, p. 2097-2105.
- Liendo, A.; Lazardi, K. e Urbina, J.A. (1998). "In Vitro Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of the bis-triazole DO870 and its S(-) Enantiomer Against *Trypanosoma cruzi*" *J. Antimicrob. Chemother.* v. 41, p 197-205.
- Lüllmann, H.; Lüllmann-Rauch, R. e Wassermann, O. (1978). "Lipidosis Induced by Amphiphilic Cationic Drugs". *Biochem. Pharmacol.* v. 27, p. 501-510.
- Manzi, P.; Panfili, G. e Pizzoferrato, L. (1996). "Normal and Reversed-Phase HPLC for More Complete Evaluation of Tocopherols, Retinols, Carotenes and Sterols in Dairy Products". *Chromatographia.* v. 43, n. 1/2, p. 89-93.
- Marsden, P.D. (1997). "The Control of Latin American Trypanosomiasis". *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 30, p. 521-527.
- McCabe, R.E.; Remington, J.S. e Araújo, F.G. (1986). "In Vitro and In Vivo Effects of Itraconazole Against *Trypanosoma cruzi*". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.35, n. 2, p. 280-284.
- Melo, P.S. (1996). *Pigmentos Obtidos de Chromobacterium violaceum e*

- Serratia marcescens*, Propriedade Tripanocida da Prodigiosina e Estudos Toxicológicos. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas.
- Moraes, S.G. (1995). *Degradação de Compostos Organoclorados Aromáticos: Caracterização e Toxicidade de Intermediários*. Tese de Mestrado. Instituto de Química, UNICAMP, Campinas.
- O'Sullivan, M.C.; Dalrymple, D.M. e Zhou, Q. (1996). "Inhibiting Effects of Spermidine Derivatives on *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase". *J. Enzyme Inhibition*. v. 11, p. 97-114.
- Oliveira, D.A.; Fernandes, A.M.A.P.; De Conti, R.; Rodriguez, J.A.; Haun, M.; Souza-Brito, A.R.M.; De Castro, S.L. e Durán, N. (1998). "Evaluation of In Vitro Toxicity of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine Isomers". *Eur. J. Med. Chem.* (submetido).
- Peacock, G.A. e Goosey, M.W. (1989). "Separation of Fungal Sterols by Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography. Application to the Evaluation of Ergosterol Biosynthesis Inhibitors". *J. Chrom.* v. 21, p. 293-304.
- Pereira, D.G.; Castro, S.L.; Durán, N. (1998). "Activity of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine Derivatives in Mice Experimentally Infected With *Trypanosoma cruzi*". *Acta Tropica*. v. 69, p. 205-11.
- Pereira, D.G.; Oliveira, D.A.; Fernandes, A.M.P.; De Castro, S.L.; Souza-Brito e Durán, N. (1998). "Further In Vivo and In Vitro Effects of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine Derivatives Against

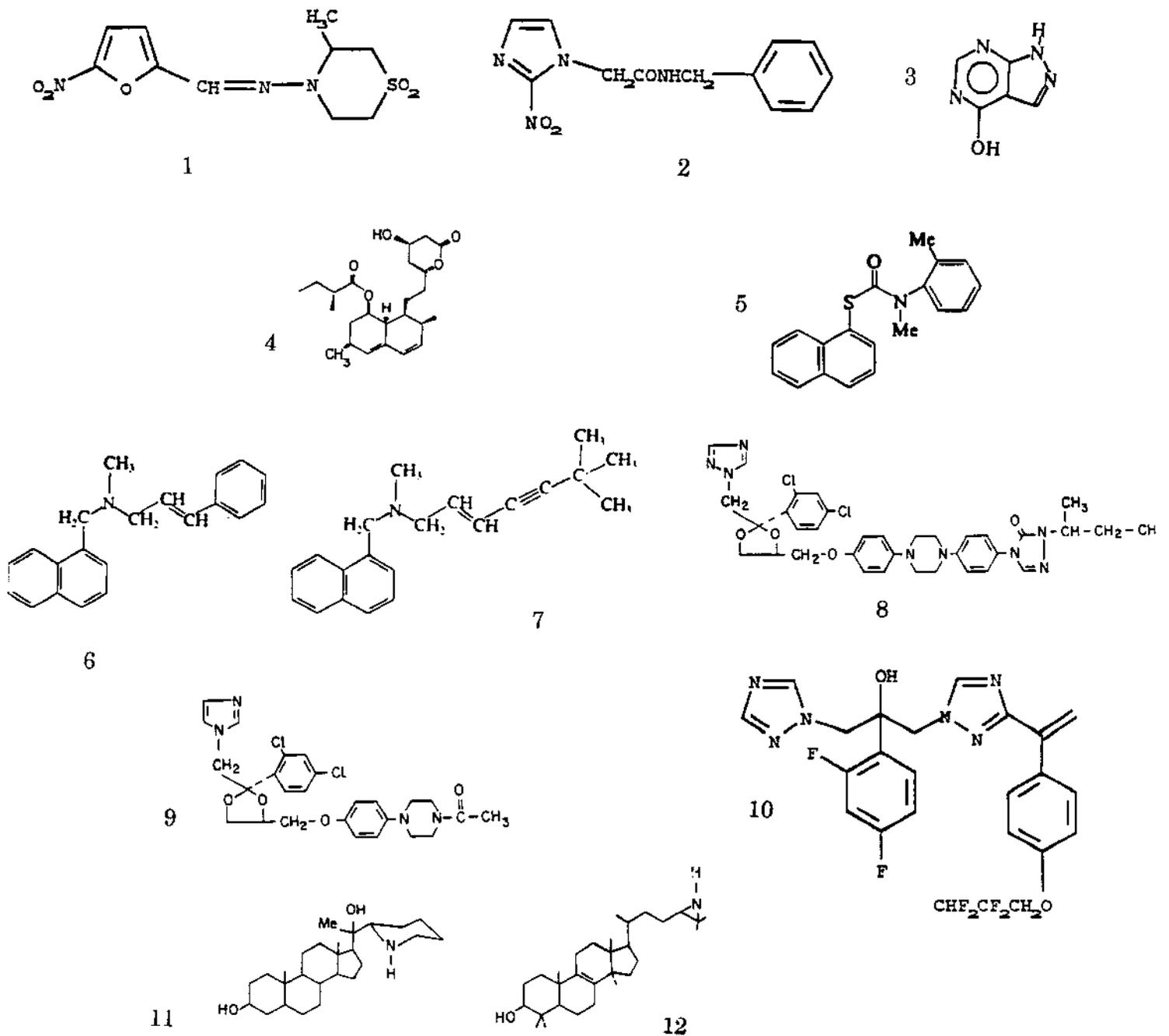
- Trypanosoma cruzi*". *Exper. Parasitol.* (submetido).
- Quintas, L.E.M.; De Castro, S.L.; Urbina, J.A.; Borba-Santos, J.A.; Pinto, C.N.; Siqueira-Batista, R. e Miranda Filho, N. (1996). Em: *Moléstia de Chagas*. Eds. R. Siqueira-Batista, A.D. Corrêa e D.W. Huggins, Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 125-137.
- Renzi, D.; Valtolina, M. e Forster, R. (1993). "The Evaluation of a Multi-Endpoint Cytotoxicity Assay System". *Atla*. v. 21, p. 89-96.
- Riddell, R.J.; Clothier, R.H.; Balls, M. (1986). "An Evaluation of In Vitro Cytotoxicity Assays *Fd. Chem. Toxic.* v. 24, n. 6/7, p. 469-471.
- Ryley, J.F.; McGregor, S. e Wilson, R.G. (1988). "Activity of ICI 195,739 - a Novel Orally Active Bistriazole - in Rodent Models of Fungal and Protozoal Infections". Em: *Antifungal Drugs*. Ed V St.Georgiev, New York: Ann. N. Y. Acad. Sci. v. 54, p. 310.
- Sánchez, G.; Zulantay, I.; Venegas, J.; Solari, A.; Gálvez, R.; Peña, P.; Rodríguez, J. e Apt, W. (1995). "Treatment With Allopurinol and Itraconazole changes Lytic Activity in Patients With Chronic, Low Grade *Trypanosoma cruzi* Infections". *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 89, p. 438-439.
- Schirmer, R.H.; Müller, J.G. e Krauth-Siegel, R.L. (1995). "Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: the design of drugs for trypanosomiasis and malaria". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 141.

- Sehofield, C.J. (1997). "South America: Southern Cone Initiative Against chagas Disease". *The Lancet*. v. 349 (Supl.III), p. 21.
- Schrével, J.; Millerioux, V.; Sinou, V.; Frappier, F.; Santus, R. e Grellier, P. (1996). "New Trends in Chemotherapy on Human and Animal Blood Parasites". *Parasitol. Res.* v. 82, p. 283-284.
- Schvartzapel, A.J.; Zhong, L.; Docampo, R.; Rodriguez, J.B. Gros, E.G. (1997). "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Growth Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* (Epimastigotes)". *J. Med. Chem.* v. 40, p. 2314-2322.
- Siqueira-Batista, R.; Quintas, L.E.M.; Vahia-Loureiro, A.M. (1996). Em: *Moléstia de Chagas*. Eds. R. Siqueira-Batista, A.D. Corrêa e D.W. Huggins, Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 40-51.
- Siqueira-Batista, R.; Storino, R.A.; Chiga, A.L.V.; Quintas, L.E.M. e Filho, N.M. (1993). "Enfermidade de Chagas-Aspectos Políticos e Sociais". Em: *ARS CVRANDI-A Revista da Clínica Médica*. Ed. Eleá Ciência Editorial, Rio de Janeiro, v. 26, n. 9, p. 15-64.
- Souza-Brito, A.R.M. (1994). Em: *Manual de Ensaio Toxicológicos "in vivo"*. Editora da UNICAMP, Campinas, SP.
- Stoppani, A.O.M. (1983). "Bioquímica del *Trypanosoma cruzi*". *Interciencia*. v. 8, n. 6, p. 396-416.
- Sztajzel, J.; Cox, J.; Pache, J.C.; Badaoui, E.; Lerch, R.; Rutishauser, W. (1996). "Chagas Disease May Also Be Encountered in Europe". *Eur. Heart J.* v. 17, p. 1289-1291.

- Urbina, J.A. (1996). Em: *Moléstia de Chagas*. Eds. R. Siqueira-Batista, A.D. Corrêa e D.W. Huggins, Rio de Janeiro: Cultura Médica p. 131-137.
- Urbina, J.A. (1997). "Lipid Biosynthesis Pathways as Chemotherapeutic Targets in Kinetoplastid Parasites". *Parasitol.* v. 114, S91-S99.
- Urbina, J.A.; Lazardi, K.; Aguirre, T.; Piras, M.M. e Piras, R. (1988). "Antiprolifertive Synergism of the Allylamine SF 86,327 and Ketoconazole on Epimastigotes and Amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*". *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 32, n. 8, p. 1237-1242.
- Urbina, J.A.; Lazardi, K.; Aguirre, T.; Piras, M.M. e Piras, R. (1991). "Antiprolifertive Effects and Mechanism of Action of ICI 195,739, a New Bis-Triazole Derivative, on Epimastigotes and Amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*". *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 35, n.4, p. 730-735.
- Urbina, J.A.; Lazardi, K.; Marchan, E.; Visbal, G.; Aguirre, T.; Piras, M.M.; Piras, R.; Maldonado, R.A.; Payares, G. e Souza, W. (1993). "Mevinolin (Lovastatin) Potentiates the Antiprolifertive Effects of Ketoconazole and Terbinafine Against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In Vitro and In Vivo Studies". *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 37, n. 3, p. 580-591.
- Urbina, J.A.; Vivas, J.; Visbal, G. e Contreras, L.M. (1995).

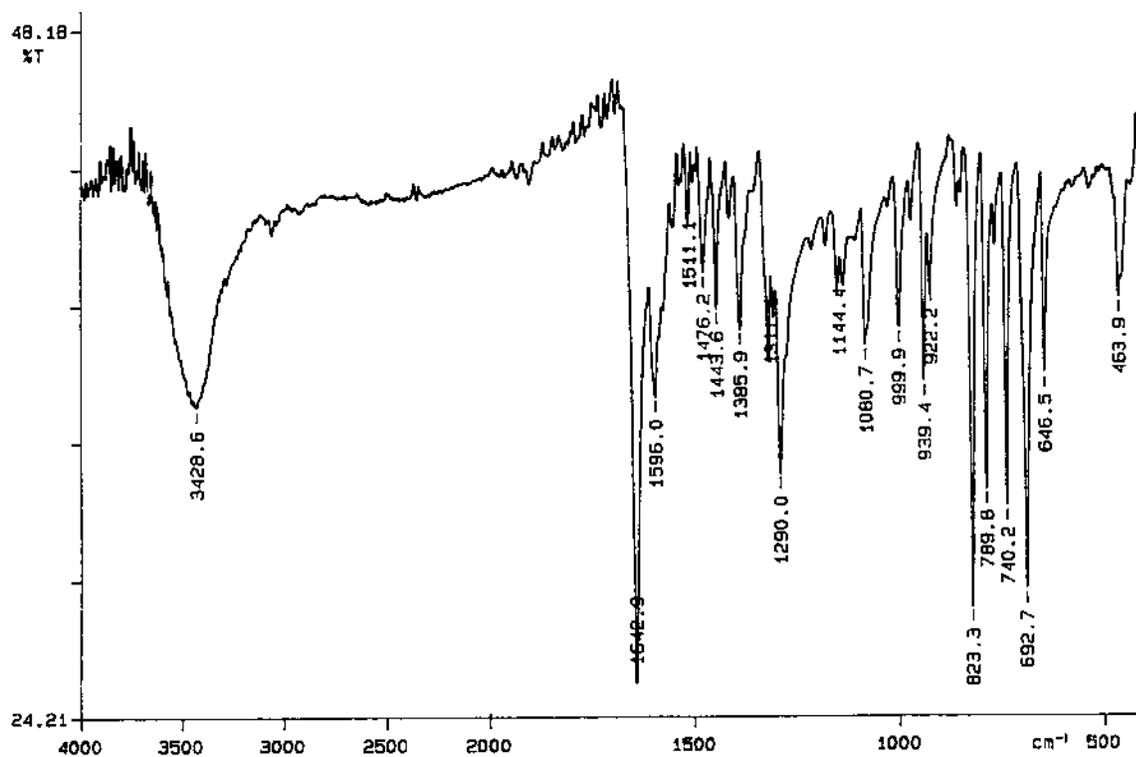
- 
- “Modification of the Sterol Composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* by  $\Delta^{24(25)}$  Sterol Methyl Transferase Inhibitors and Their combinations With Ketoconazole”. *Molec. Biochem. Parasitol.* v. 73, p. 199-210.
- Urbina, J.A.; Payares, G.; Molina, J.; Sanoja, C.; Liendo, A.; Lazardi, K.; Piras, M.M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P. e Ryley, J. (1996). “Cure of Short- and Long-Term Experimental Chagas’ Disease Using DO870”. *Science.* v. 273, p. 969-971.
- Urbina, J.A.; Vivas, J.; Lazardi, K.; Molina, J.; Payares, G.; Piras, M.M.; Piras, R. (1996a). “Antiprolifertive Effects of  $\Delta^{24(25)}$  Sterol Methyl Transferase Inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In Vitro and In Vivo Studies”. *Chemother.* v. 42, p. 294-307.
- Walsh, R.N. e Cummins, R.A. (1976). “The Open-Field Test: A Critical Review”. *Psychological Bulletin.* v. 83, n. 3, p.482-504.

## ANEXO 1

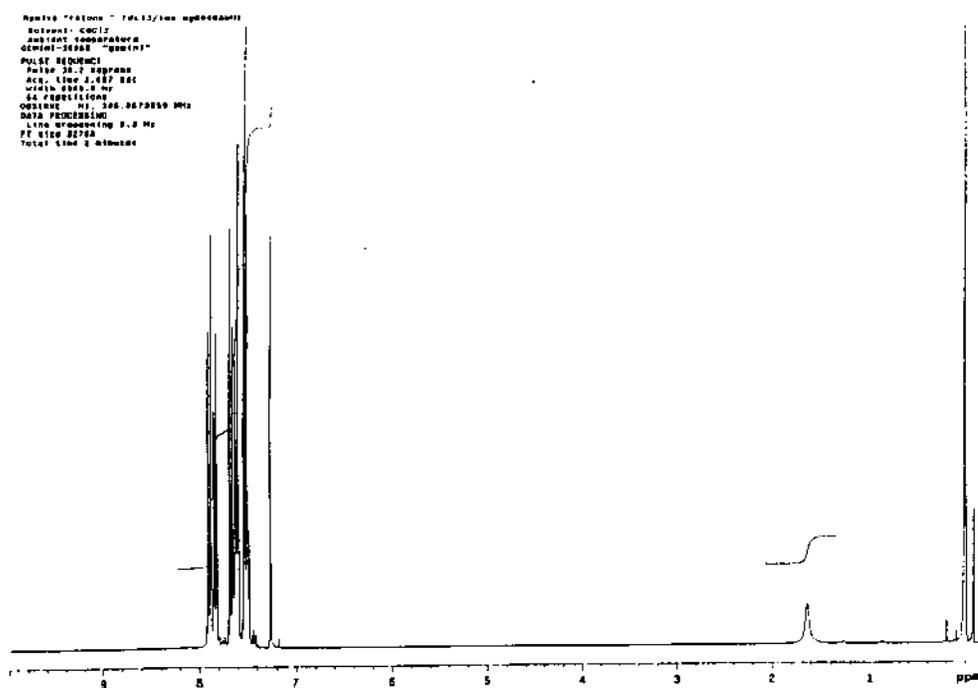


**Figura 12:** Estruturas de compostos estudados contra o *T. cruzi*. (1) nifurtimox; (2) Benznidazol; (3) alopurinol; (4) mevinolina; (5) Tolnaftato; (6) naftinina; (7) terbinafina; (8) itraconazol; (9) cetoconazol; (10) DO870; (11) 22,26-azasterol e (12) 24(R,S), 25-epiminolanosterol.

## ANEXO 2

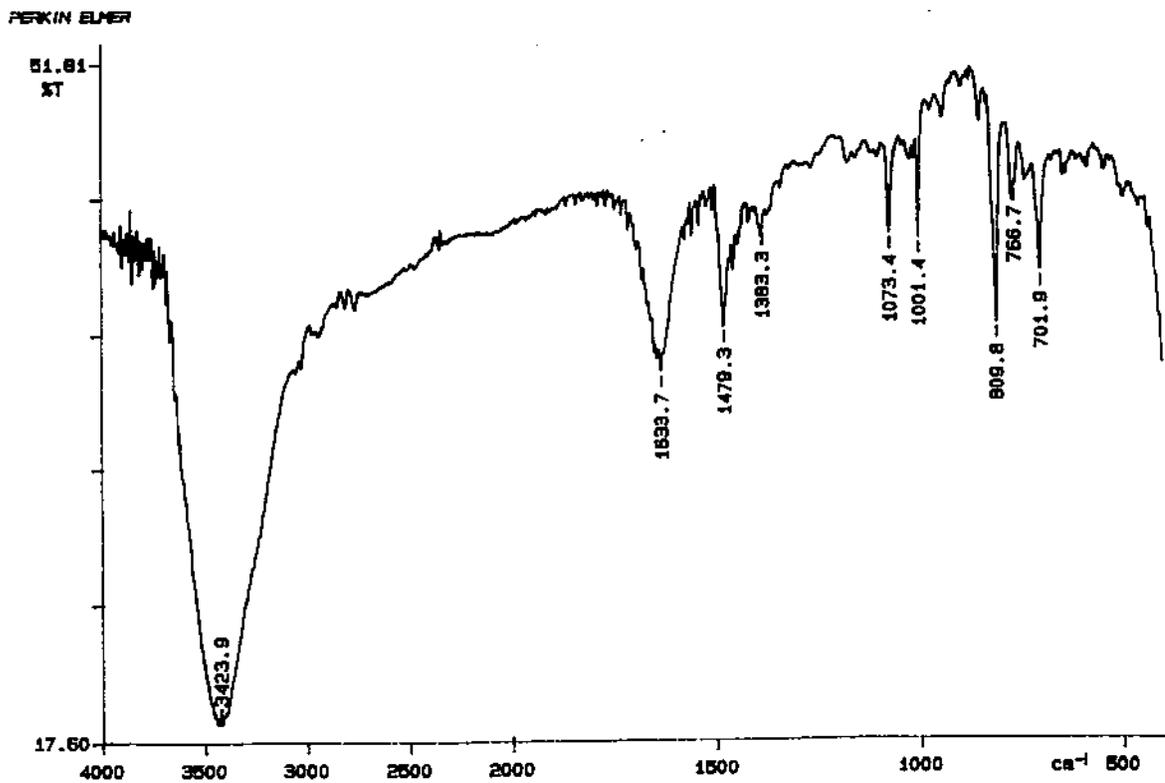
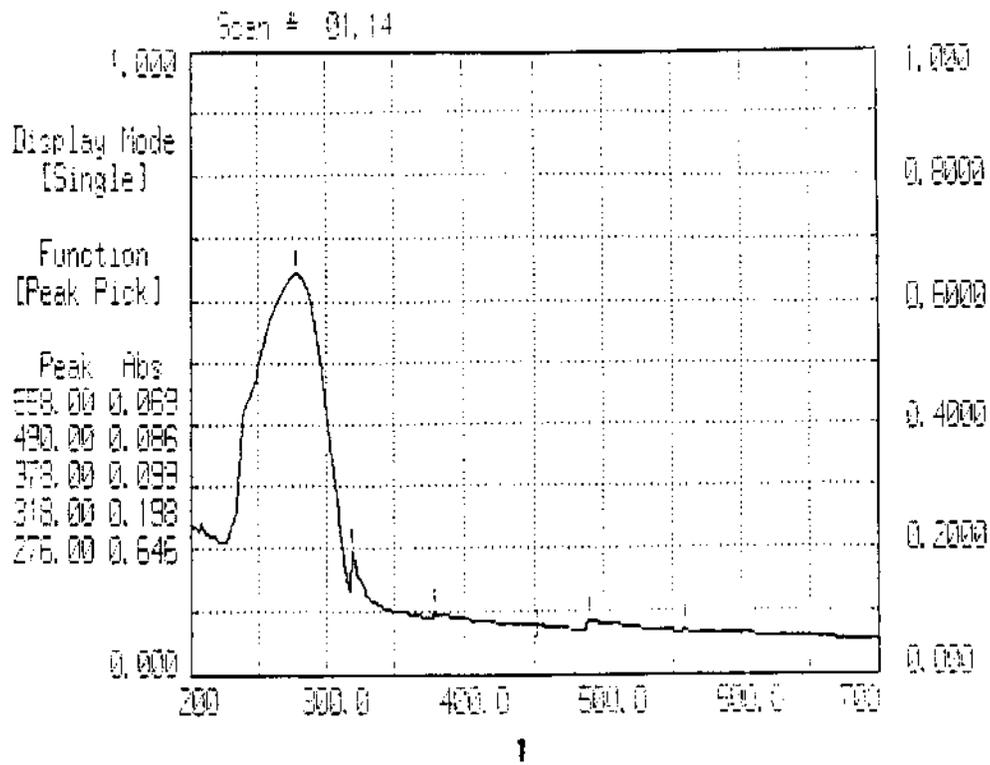


1



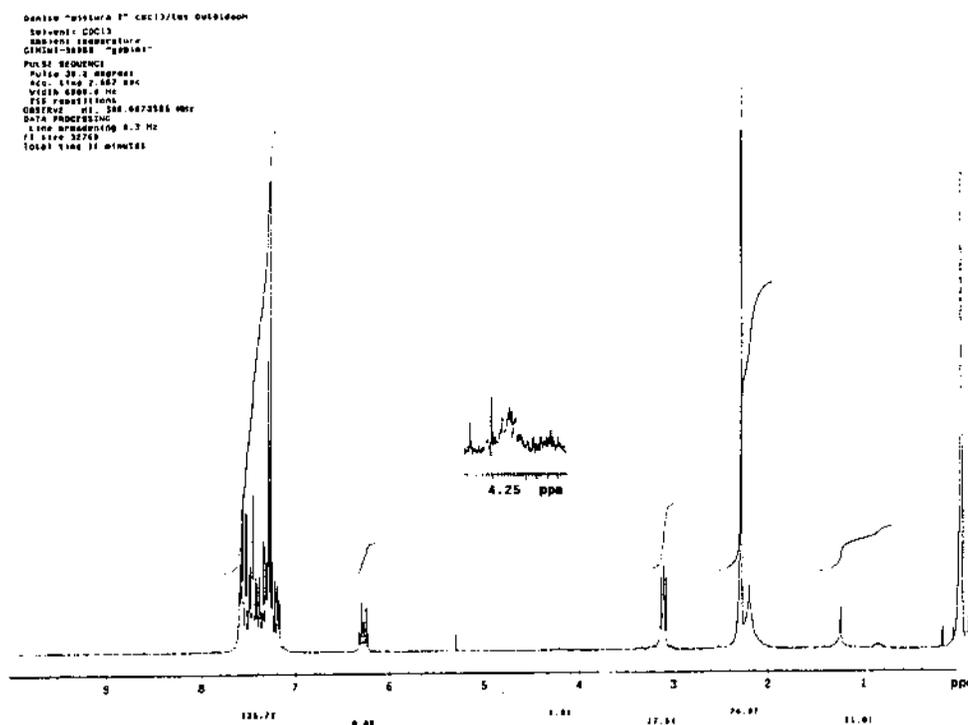
2

Figura 13: Espectros da cetona: (1) IV, pastilha de KBr e (2) RMN<sup>1</sup>H, 300MHz e solvente CDCl<sub>3</sub>.



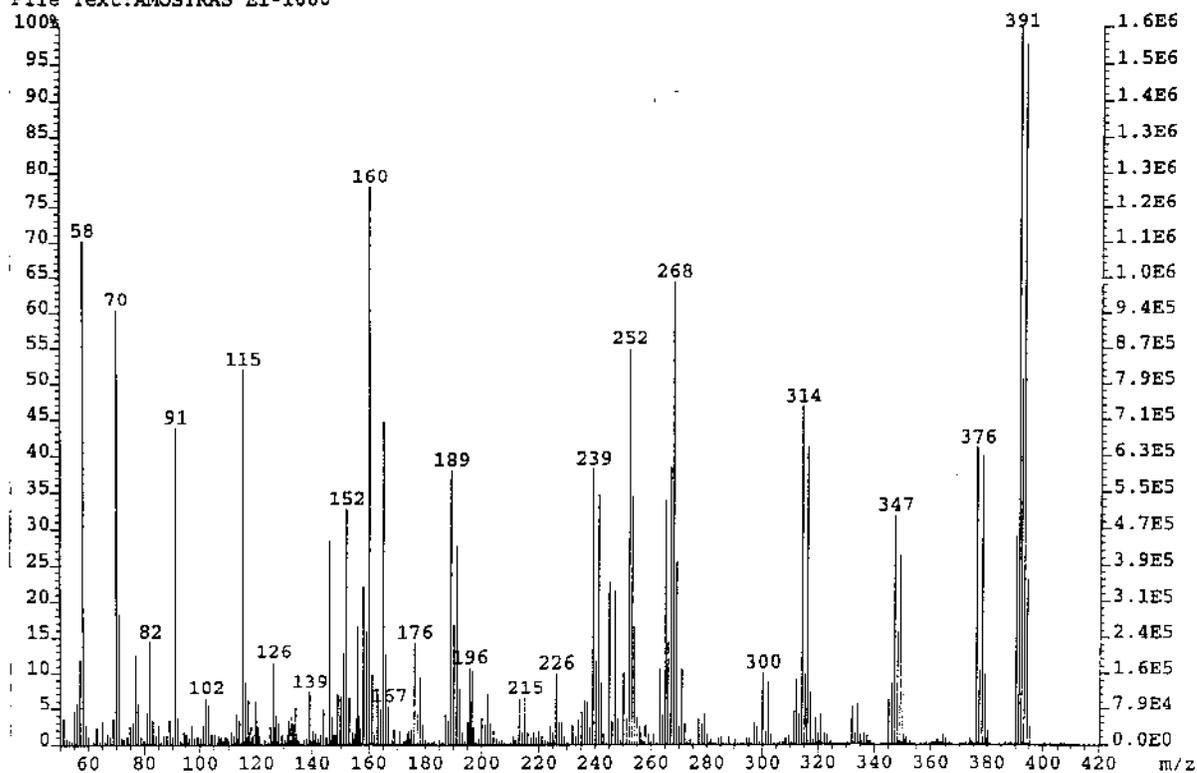
2

Figura 14: Espectros do derivado (X=H), mistura isomérica: (1) UV, solvente  $\text{CHCl}_3$  e (2). IV, pastilha de KBr.



1

File: JAN16 Ident: 151 Acq: 16-JAN-1998 13:59:08 +14:28 Cal: JAN15  
 AutoSpec EI+ Magnet BpI: 1574981 TIC: 37655232 Flags: HALL  
 File Text: AMOSTRAS EI-1000



2

**Figura 15:** Espectros do derivado (X=H), mistura isomérica: (1) RMN<sup>1</sup>H, 300MHz em solvente CDCl<sub>3</sub> e (2) MS.

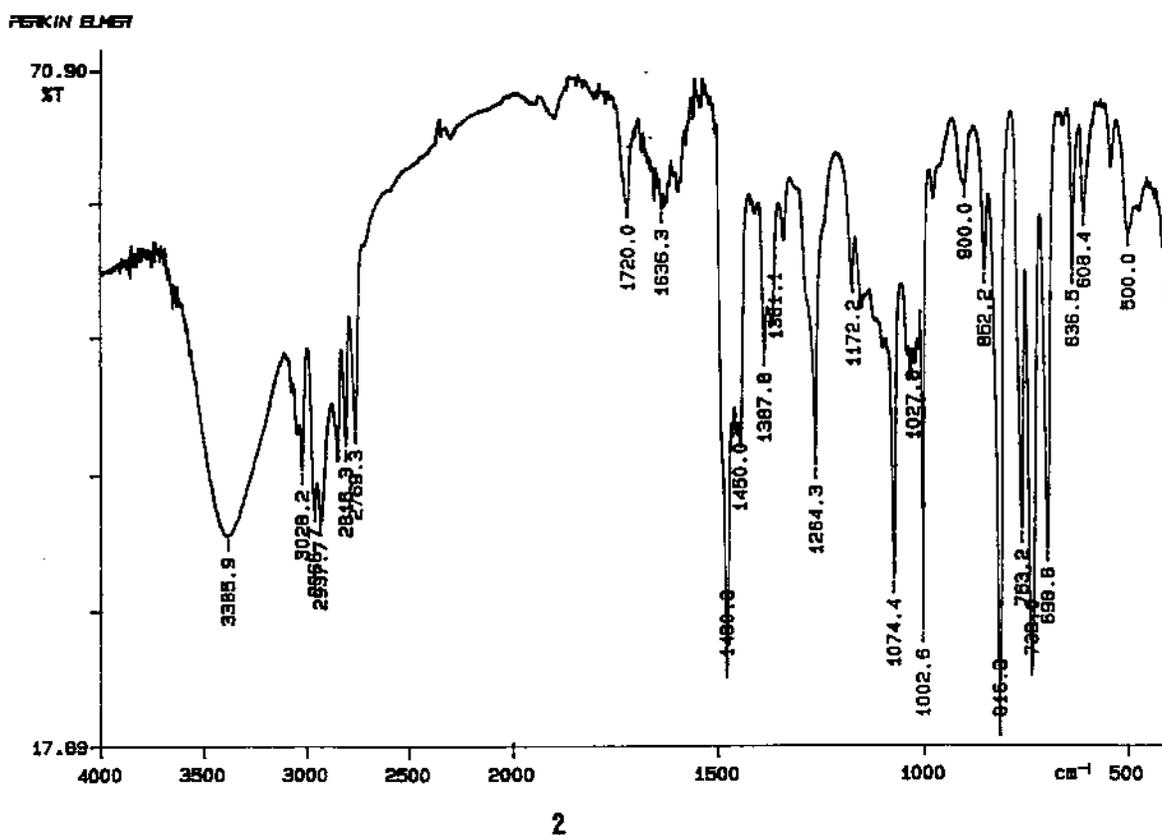
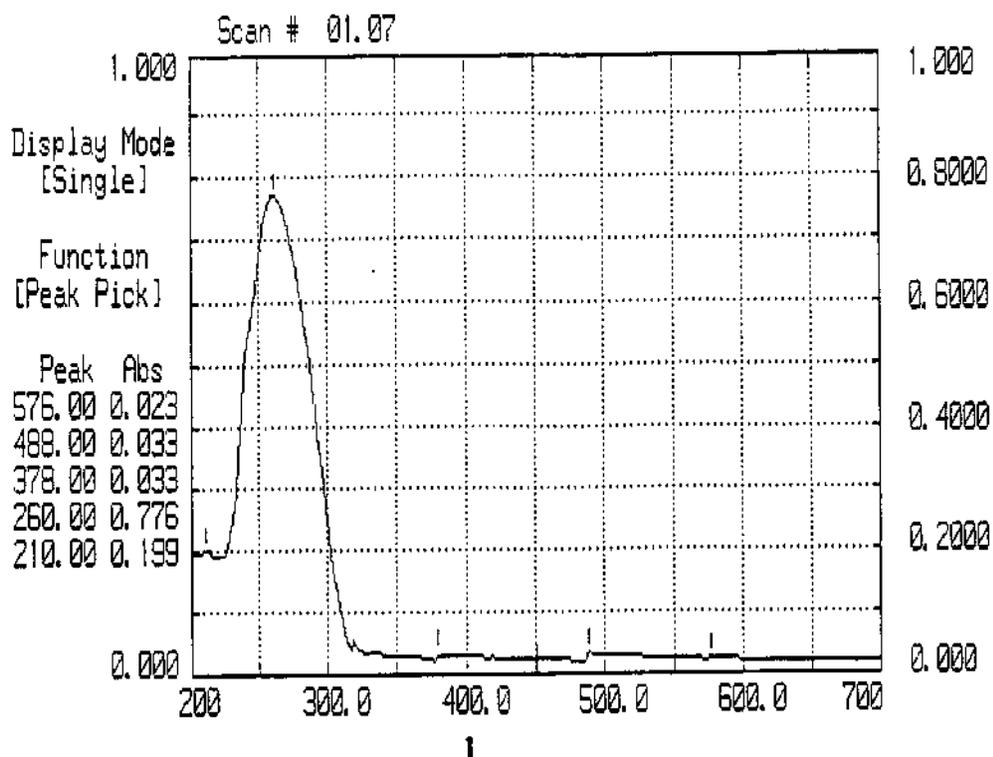
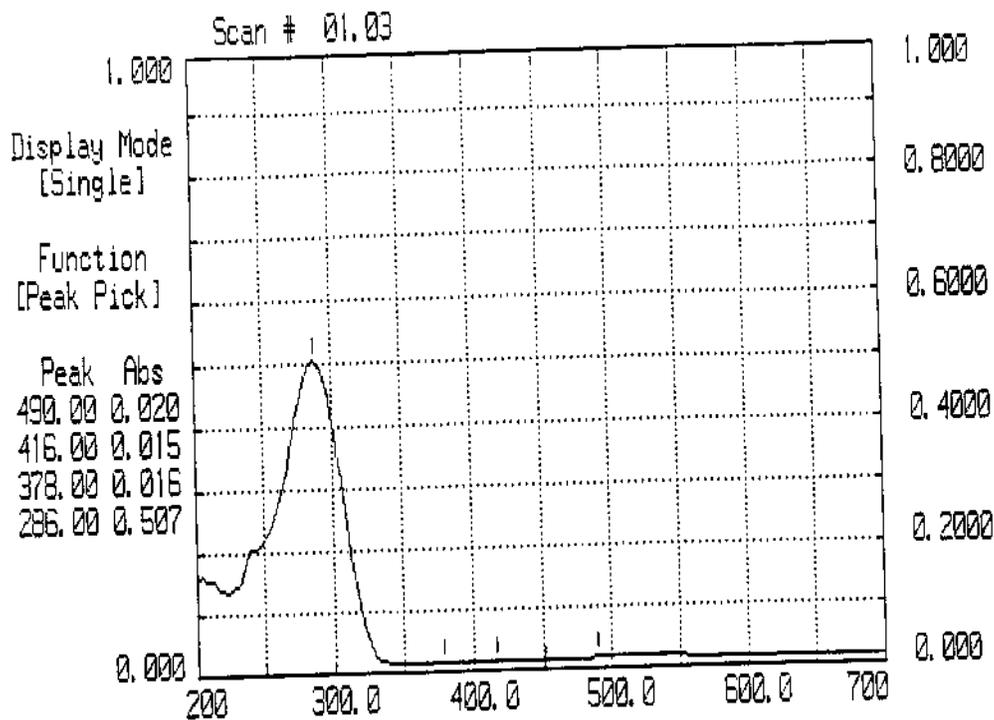
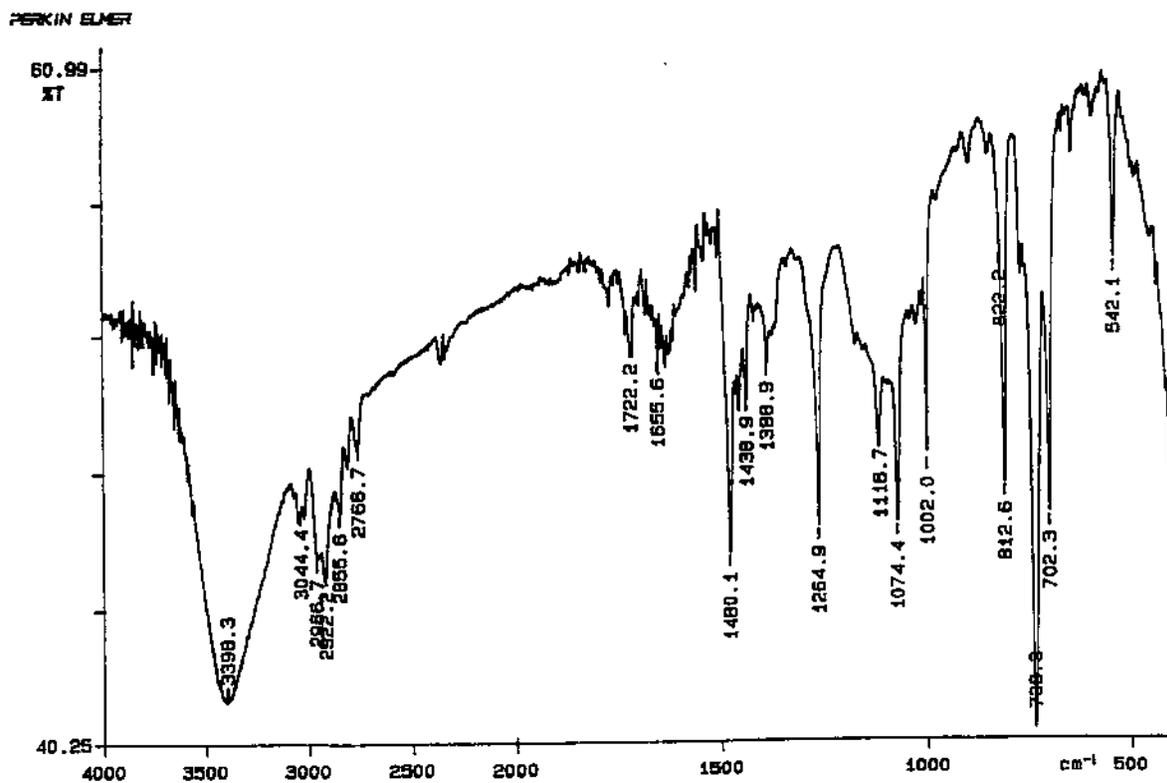


Figura 16: Espectros do isômero Z: (1) UV, solvente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e (2) IV, filme com solvente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



1



2

Figura 17: Espectros do isômero *E*: (1) UV, solvente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e (2) IV, filme com solvente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

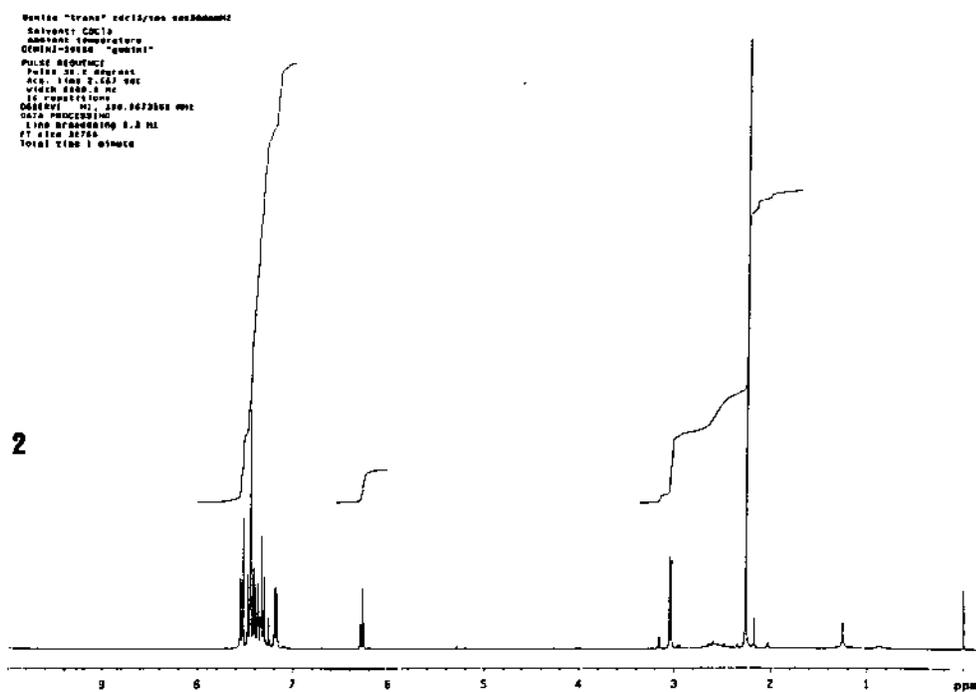
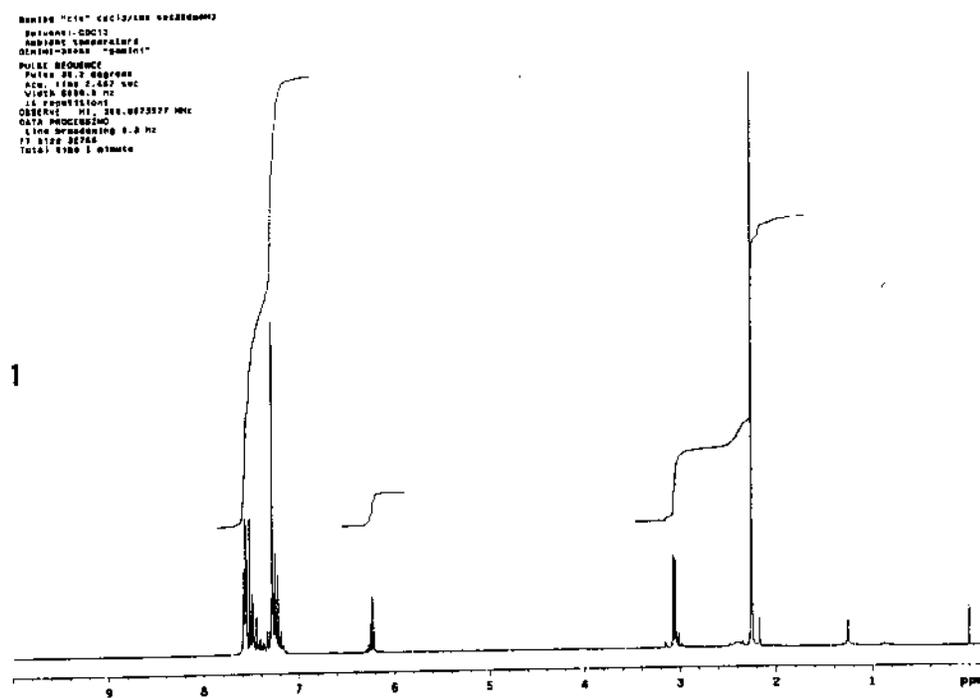
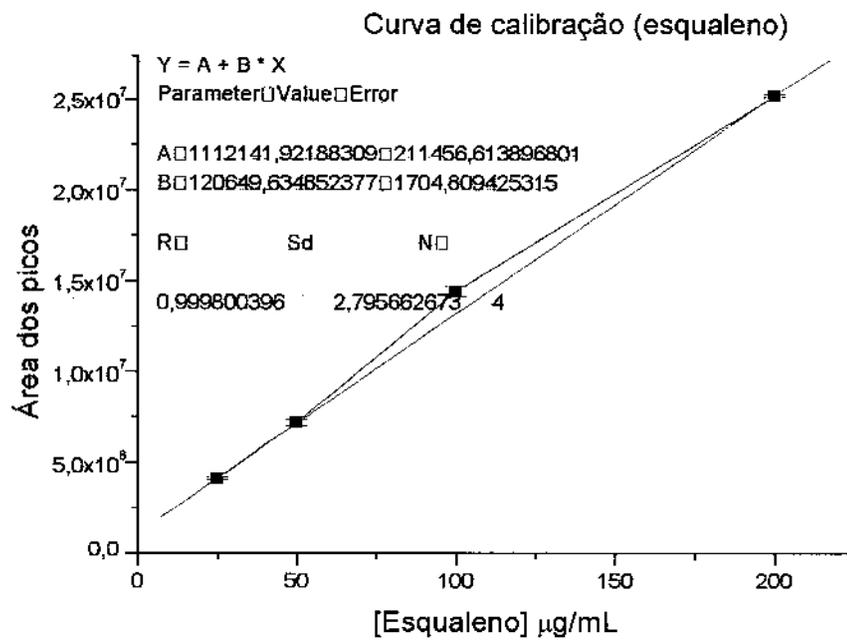
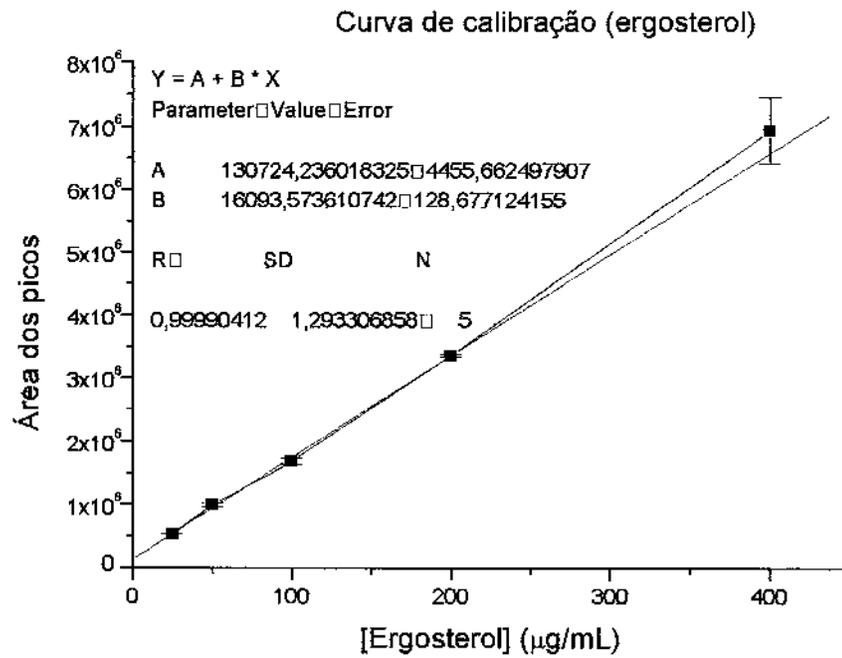


Figura 18: Espectros de RMN<sup>1</sup>H, 300MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>, dos isômeros isolados: (1) isômero *Z* e (2) isômero *E*.

## ANEXO 3



**Figura 19:** Curvas de calibração do ergosterol e do esqualeno utilizadas nos ensaios de investigação do mecanismo de ação tripanossomicida do composto (X=H).