

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA**

**TESE DE DOUTORADO**

**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**



**Candidata: ROSELI MARIA DE CONTI LOURENÇO  
Orientador: DR. NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO**

**Campinas, São Paulo  
1996**



UNIDADE	ICQ
N.º CHAMADA:	
V.	
TOMADO DE	25/3/88
PROC.	CC-1/76
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
X	<input type="checkbox"/>
PREÇO	87,11
DATA	21/10/14
N.º CPD	0.000.938.22

Lourenço, Roseli Maria de Conti

Síntese, toxicidade e atividade  
triptanocida de...

T/UNICAMP/L934s

(28868/96)

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

Lourenço, Roseli Maria De Conti  
L934s Síntese, toxicidade e atividade tripanocida de 3-(4'-bro-  
mo-[1,1'-bifenil]-4-il-)3-(4-x-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-  
1-amina / Roseli Maria de Conti Lourenço. - Campinas,  
[SP : s.n.], 1996.

Orientador: Nelson Eduardo Duran Caballero.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Química.

1. Tripanocida. 2. Doença de chagas. 3. Amino-  
propenos. I. Duran Caballero, Nelson Eduardo. II. Uni-  
versidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III.  
Título.

**A duas pessoas muito especiais**

*Wagner e Vinicius*

**Aos meus pais**

*Ettore e Herminia*

**e irmãs**

*Regina, Ester e Silvia*

**aos sobrinhos**

*Thiago, Mariana e Kelly*

*Aos meus amigos*

## **Agradecimentos**

Ao professor Dr. Nelson Durán pela orientação em todas as etapas deste trabalho e por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho de pesquisa.

Ao professor Dr. Ronaldo Pilli pela orientação na parte de síntese.

A professora Dra Marcela Haun pela orientação nos testes de citotoxicidade.

A professora Dra Solange de Castro e orientados Ricardo e Elen pela realização dos testes de atividade tripanocida.

A Patricia pela ajuda na realização dos testes de citotoxicidade, amizade e incentivo.

As amigas Sonia e Sandrinha pela realização dos testes de toxicidade aguda.

Aos funcionários Cida, Chico e Vanda pelo suporte técnico e amizade.

A Denise que como aluna de iniciação científica colaborou com parte deste trabalho.

Aos amigos do laboratório pela agradável convivência.

Ao Wagner pela ajuda na digitação da tese.

Aos professores e funcionários do I.Q. UNICAMP que colaboraram com a realização deste trabalho

A FAPESP, PADCT, FAEP e CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Uma série de derivados de 3-aminopropeno foi sintetizada e a atividade tripanocida avaliada para as três formas evolutivas do ciclo de vida do parasita *T. cruzi*.

Estudos toxicológicos "in vitro" foram realizados utilizando-se dois sistemas diferentes: bactérias *E. coli* e cultura de células V<sub>79</sub>.

Foi feito um estudo de correlações entre estrutura química e atividade biológica pelo método de Hansch para a série de congêneros sintetizados.

O mecanismo de ação do composto nitro derivado de 3-aminopropeno foi estudado comparativamente ao nifurtimox, através da avaliação da formação de radicais livres.

## SUMMARY

A series of 3-propen-1-amine derivatives were synthesized and their trypanocidal activities evaluated for the three evolutive stages of *T. cruzi* .

Their "in vitro" cytotoxicity to mammalian cells V<sub>79</sub> and bacterias *E. coli* were investigated.

Quantitative structure activity relationship-QSAR studies by the Hansch analysis was undertaken.

Studies on the mechanism of action of the nitro derivative of 3-propen-1-amine and nifurtimox were undertaken by evaluation of free radicals formation.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 Doença de Chagas	1
1.2 Citotoxicidade	8
1.3 Correlação entre estrutura química e atividade biológica	12
<b>2. OBJETIVOS GERAIS</b>	19
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	20
3.1 Síntese de derivados de 3-aminopropeno (I)	20
• Acilação de Friedel-Crafts	21
• Reação de Wittig	23
3.2 Separação dos isômeros geométricos	27
• Separação dos isômeros geométricos por cristalização fracionada	28
• Separação dos isômeros geométricos por placa preparativa	32
• Separação dos isômeros geométricos de 3-[4'-bromo-(1,1'-bifenil)-4-il]-3-fenil-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Ib por HPLC preparativa	37
• Aplicação de NOE para a caracterização dos isômeros cis e trans do composto 3-[4'-bromo-(1,1'-bifenil)-4-il]-3-fenil-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Ih	40

3.3 Avaliação da atividade biológica	45
3.3.1 Atividade tripanocida	45
3.3.2 Toxicidade aguda	47
3.3.3 Citotoxicidade	49
• Análise da proliferação celular pelo método do conteúdo total de proteínas	49
• Investigação do mecanismo de toxicidade celular	51
3.4 Investigação do mecanismo de ação de 3-[4'-bromo-(1,1'-bifenil)-4-il-3 (4-nitrofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Id	64
• Consumo de O <sub>2</sub>	65
• Quimioluminescência	66
3.5 Estudos preliminares de correlações entre estrutura química e atividade biológica	71
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>76</b>
4.1 Procedimento geral para a preparação das cetonas II a-g	76
4.2 Preparação do cloreto de ácido p-nitrobenzóico	80
4.3 Síntese de 4'-bromo-4-bifenil-p-metil sulfonil cetona (IIh)	80
4.4 Procedimento geral para a preparação dos derivados de 3-amino propeno I a-h	81

4.5 Separação dos isômeros geométricos dos compostos I a-b por cristalização fracionada	88
4.6 Separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo- [1,1'-bifenil]-4-il) 3-fenil-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Ib por placa preparativa	89
4.7 Separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il) 3-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Ia por placa preparativa	90
4.8 Separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il) 3-(4-metoxifenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Ic por placa preparativa	90
4.9 Separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il) 3-(4-nitrofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Id por placa preparativa	91
4.10 Separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il) 3-(4-metilsulfonilfenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Ih por placa preparativa	92
4.11 Atividade tripanocida	93
4.12 Toxicidade aguda (E. coli )	93
• Meio de cultura	93
• Procedimento do teste	94
• Monitoramento de CO <sub>2</sub> no sistema fia condutométrico	94

4.13 Citotoxicidade	95
• Manutenção da cultura	95
• Tratamento com as drogas	95
• Proliferação celular (PR)	95
• Captação do corante vermelho neutro (VN)	96
• Redução do sal de tetrazólio (MTT)	96
4.14 Investigação do Mecanismo de Ação de 3-[4'bromo-(1,1'-bifenil)-4il 3-(4-nitrofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Id	97
• Preparação dos microsomas	97
• Dosagem de proteínas	97
• Consumo de O <sub>2</sub>	97
• Quimioluminescência	98
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>99</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>102</b>
<b>7. ATIVIDADES ACADÊMICAS RELACIONADAS COM A TESE</b>	<b>108</b>
• Cursos extra curriculares	108
• Apresentações de trabalhos em congressos	108
• Publicações	110

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Doença de Chagas**

A doença de Chagas é uma tripanosomíase que atinge grande parte do continente americano, principalmente a América do Sul, contaminando mais de 20 milhões de pessoas, sendo uma das principais doenças parasitárias da América Latina. No Brasil seu nível endêmico é alto apresentando cerca de 5 milhões de chagásicos (Dias, 1987; Siqueira-Batista *et alii*, 1993).

O agente causador da doença é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado pertencente a família Kinetoplastídea.

A transmissão da doença se dá principalmente através do triatomíneo (barbeiro) e a segunda mais importante forma de transmissão é a transfusão sanguínea (Neves, 1988). Esta forma de transmissão tem importância epidemiológica devido a migração da população rural para centros urbanos (Moraes-Souza *et alii*, 1994; Wanderley *et alii*, 1993).

Em áreas endêmicas esta doença está associada com outras doenças tais como malnutrição, diarreia, tuberculose e outras infecções parasitárias que afetam a classe social mais baixa. O desenvolvimento social e político das regiões endêmicas seria o suficiente para o controle da doença. Entretanto esta rota é complexa e lenta em países subdesenvolvidos devido a pequena ou nenhuma prioridade política das áreas rurais onde normalmente ocorre.

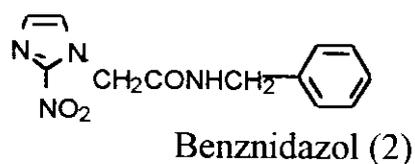
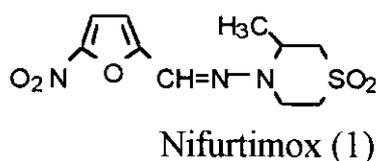
Como várias doenças parasitárias a doença de Chagas poderia ser controlada pela eliminação do inseto vetor de forma simples com a utilização de inseticidas ou ainda pela melhoria das habitações no meio rural (Bryan *et alii*, 1994).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo que envolve a forma replicativa amastigota e não replicativa tripomastigota de corrente sanguínea presentes no hospedeiro mamífero. Também apresenta a forma replicativa epimastigota e a forma não replicativa infectiva tripomastigota metacíclica presentes no inseto vetor (Brener, 1973).

Não existe vacina para a prevenção da doença de Chagas e nem uma quimioterapia segura. Progressos porém, estão sendo feitos no diagnóstico da doença de Chagas o que poderia reduzir consideravelmente ou ainda abolir a transmissão através da transfusão de sangue (Goldenberg *et alii*, 1991; Goldenberg, 1993).

O *T. cruzi* tem sido amplamente estudado por técnicas de biologia molecular (Goldenberg, 1993; Brener, 1994; Nilsen, 1994; Cazzulo, 1994; Andrews, 1995). Estudos do parasita à nível molecular são de grande importância uma vez que a detecção de processos peculiares ao parasita e o estudo de enzimas específicas do parasita que diferem do hospedeiro mamífero, poderão levar ao desenvolvimento de novas drogas mais efetivas para o tratamento da doença de Chagas. Também o estudo do *T. cruzi* tem enriquecido o campo da biologia molecular uma vez que novos mecanismos e fenômenos foram observados pela primeira vez nestes protozoários (Agabian, 1990; Johnson *et alii*, 1987; Simpson e Shaw, 1989).

A terapêutica da doença de Chagas baseia-se em dois compostos nitroheterocíclicos. Um derivado nitrofurano-nifurtimox (1) e um derivado nitroimidazol-benznidazol (2).



Estas drogas entretanto são parcialmente efetivas no tratamento da fase aguda da doença, não efetivas na fase crônica e altamente tóxicas.

Nifurtimox causa neurotoxicidade e desordens digestivas (Cançado *et alii*, 1975; Laplumé *et alii*, 1985; Ohnishi *et alii*, 1980). Também alguns testes de avaliação de mutagenicidade indicaram que nifurtimox e benznidazol são potencialmente genotóxicos (Nagel e Nepomnaschy, 1983; Ferreira e Ferreira, 1986; Gorla *et alii*, 1989; Nagel, 1987). Estas drogas portanto não são ideais para o tratamento da doença de Chagas não preenchendo requisitos importantes tais como: curar a parasitemia na fase aguda e crônica da doença, ser efetiva por via oral em pequenas doses, apresentar baixo custo, não apresentar efeitos colaterais significantes e teratogenicidade e não levar à resistência do parasita (Brener, 1984). Os mecanismos de ação do nifurtimox e benznidazol são semelhantes na formação de radicais livres intracelulares (Do Campo, 1990).

Devido a falta de retorno financeiro e ao enorme investimento necessário, a indústria farmacêutica não tem interesse na pesquisa para o desenvolvimento de drogas nesta área (Gutteridge, 1987).

A pesquisa de drogas alternativas para a doença de Chagas é baseada em duas principais abordagens. Testar novas drogas sintetizadas ou comercialmente disponíveis e detectar moléculas alvo específicas para o planejamento racional de drogas.

Uma grande variedade de drogas experimentais tem sido testadas contra *T. cruzi* (De Castro *et alii*, 1994; Duran *et alii*, 1989; Haun *et alii*, 1992; Chabala *et alii*, 1991; Doyle e Weinbach, 1989). Este assunto foi amplamente revisado por Brener (1984), Duran e Haun (1991) e De Castro (1993).

Barret (1976) estudou uma série de derivados de 3-aminopropenos e desta série o composto 353-C (E)-3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-cloro fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina se mostrou bastante ativo contra *T. cruzi*. Estudos "in vivo" indicaram que este composto é 10 vezes mais efetivo que benznidazol e 20 vezes mais efetivo que nifurtimox. Também, estudos toxicológicos mostraram que o composto 353C não apresenta efeitos hematológicos, bioquímicos e histopatológicos em camundongos e cachorros tratados com a droga (Barret *et alii*, 1982)

Um estudo comparativo de susceptibilidade de várias drogas em cinco diferentes cepas de *T. cruzi*, "in vivo" e "in vitro", indicou também que este composto 353-C apresenta consistência na sua atividade nas cinco diferentes cepas testadas juntamente com nifurtimox e benznidazol (Neal e Van Bueren, 1988).

Entre as drogas comercialmente disponíveis que tem sido amplamente estudadas contra a doença de Chagas estão principalmente alopurinol, itraconazol e cetoconazol.

Alopurinol é amplamente utilizado no tratamento de gôta em humanos, apresentando baixa incidência de efeitos colaterais. Avila *et alii* (1981) mostrou que a administração de alopurinol em camundongos infectados com *T. cruzi* na fase aguda da parasitemia, diminuiu consideravelmente a taxa de mortalidade e a parasitemia. Gallerano *et alii* (1990) estudando 307 pacientes infectados com *T. cruzi*, mostrou que alopurinol é tão efetivo quanto nifurtimox no tratamento da doença de Chagas entretanto apresenta menor toxicidade.

O mecanismo de ação tripanocida do alopurinol se dá através da interferência no metabolismo de purinas. Tripanosomatídeos são incapazes de

sintetizar purinas de novo e portanto dependem das purinas do hospedeiro. As purinas podem ser interconvertidas por uma variedade de rotas fazendo com que este ataque quimioterapêutico pareça pouco promissor, entretanto alopurinol é metabolizado de formas diferentes pelo parasita e hospedeiro mamífero. Em humanos alopurinol é transformado em oxipurinol pela xantina oxidase mas não no *T. cruzi* onde esta enzima é ausente. Em tripanosomatídeos alopurinol é metabolizado a alopurinol ribonucleotídeo o qual é convertido a aminopirazoto pirimidina trifosfatos pela adenosil succinato sintetase e então incorporado ao RNA levando assim à citotoxicidade ao parasita (Avila *et alii*, 1987).

A atividade tripanocida dos derivados de imidazol, cetoconazol e itraconazol tem sido bastante estudados. Estes compostos antimicóticos são bastante efetivos "in vivo" e "in vitro" contra patogenia de protozoários tais como *Leishmania* e *T. cruzi*.

O mecanismo de ação destes compostos se dá através da inibição da biosíntese do ergosterol à nível de citocromo P-450 (C-14 demetilação do lanosterol). A base da atividade baseia-se no fato de que ergosterol e esteróides C-24 metilados são únicos e apresentam funções especiais no metabolismo deste tipo de organismo, não podendo ser substituídos por colesterol ou outros esteróides presentes no hospedeiro mamífero (Adams *et alii*, 1993).

Urbina *et alii* (1991) estudando a atividade tripanocida de cetoconazol mostrou que este potente agente antimicótico causa alterações irreversíveis à membrana plasmática e ao complexo mitocondrial do *T. cruzi* à concentrações relativamente baixas (1 µM). Paralelamente estudos com terbinafina, uma alilamina com atividade antimicótica, inibe o crescimento do *T. cruzi* e também apresenta ação sinérgica com cetoconazol, levando a inibição da proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi* à concentrações de 1 nM (Urbina *et alii*, 1988). É conhecido que o mecanismo de ação da terbinafina se dá pela interferência na biosíntese do ergosterol por inibição da enzima esqualeno epoxidase (Petranayi, 1984; Stutz *et alii*, 1986; Stutz, 1987; Abe *et alii*, 1994; Adamns *et alii*, 1993).

Estudos "in vitro" e "in vivo" com itraconazol mostraram que este composto é bastante ativo levando à inibição completa da replicação de *T. cruzi* em três diferentes cepas. Também camundongos infectados com o parasita apresentaram sorologia negativa após o tratamento com a droga (Mac Cabe *et alii*, 1986).

Devido ao lento progresso no desenvolvimento de drogas para a quimioterapia da doença de Chagas, cientistas vem dando maior ênfase ao planejamento racional de drogas. Esta abordagem envolve a identificação de processos bioquímicos no parasita que são essenciais à sua sobrevivência, isolamento e caracterização de moléculas alvo a nível molecular e o planejamento de inibidores específicos que atuem como composto líderes para o subsequente desenvolvimento de drogas. Idealmente estas moléculas alvo devem estar ausentes no hospedeiro mamífero e serem comuns às três formas do ciclo de vida do parasita *T. cruzi* (Fairlamb, 1990; Schimer *et alii*, 1995).

Seguindo esta abordagem, grande ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de drogas que atuem através da interferência do metabolismo de tióis e poliaminas.

As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) e glutathione ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinil glicina) são encontradas em concentrações mM na maioria dos sistemas biológicos e são componentes de vários processos biológicos importantes, incluindo-se crescimento e diferenciação celular e regulação de processos enzimáticos importantes. Glutathione apresenta um papel importante no balanço do chamado stress-oxidativo e na regulação do balanço intracelular do chamado tiol/dissulfeto redox. Glutathione serve como cofator para a redução de peróxidos, redução de ribonucleotídeo, isomerização cis/trans e em organismos superiores atua na detoxificação de substâncias estranhas. O nível da glutathione reduzida é mantida pela redução da glutathione oxidada pela enzima glutathione redutase NADPH dependente. As poliaminas são necessárias para o ótimo crescimento de vários tipos de organismos, porém suas funções regulatórias precisas não são totalmente conhecidas (Walsh *et alii*, 1991).

O principal sistema de defesa contra espécies ativas de oxigênio em organismos superiores é o chamado ciclo glutathione redox que envolve as enzimas glutathione redutase/glutathione peroxidase e também as enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. Em contraste, os parasitas não apresentam estas enzimas, ao invés disso apresentam análoga a glutathione redutase, a tripanotiona redutase que é uma peroxidase dependente do cofator glutathione espermidina, a qual é única e essencial à vida destes organismos sendo o seu principal mecanismo de defesa contra o stress-oxidativo (Do Campo, 1990).

Tripanotiona redutase foi isolada de *Chirithidia fasciculata* em 1986 (Shames *et alii*, 1986) e de *T. cruzi* em 1987 (Krauth-Siegel *et alii*, 1987) e

subsequente caracterização mostrou que esta enzima é bastante similar a glutationa redutase presente nos organismos superiores. Entretanto, estas enzimas apresentam um grande grau de especificidade para os respectivos substratos, fazendo com que a inibição da enzima do parasita possa ser alcançada na presença da redutase do hospedeiro mamífero (Krauth-Siegel *et alii*, 1987; Jokers-Scheruol *et. alii*, 1989).

A importância do sistema tripanotona é delineada pelo fato de que um grande número de compostos tripanocidas existentes interagem com esta importante via metabólica de tripanosomatídeos (Fairlamb, 1990; Schimer *et alii*, 1995; Wash *et alii*, 1991; Hunter *et alii*, 1990; Henderson *et alii*, 1988).

Estes incluem: os compostos aromáticos de arsênio trivalentes inibidores da tripanotona redutase, o óxido de melarsen o qual forma adutos estequiométricos (1:1) com ditioltripanotona (Fairlamb *et alii*, 1989), os nitroarenos nifurtimox e benznidazol que geram espécies ativas de oxigênio através do chamado cicloredox (Do Campo, 1990), e naftoquinonas que agem "in vitro" contra *T. cruzi* também por inibição de tripanotona redutase (Henderson *et alii*, 1988).

Importante descoberta nesta área foi feita com a introdução de (d/l)- $\alpha$ -difluorometil ornitina (eflornitina). Esta droga foi inicialmente desenvolvida como um agente anticâncer, porém apresentou grande efetividade na cura da doença do sono causada por *Trypanosoma brucei*. O mecanismo de ação da eflornitina é baseado na inativação da ornitina descarboxilase, diminuindo o nível de espermidina e portanto está associada à diminuição no nível de tripanotona redutase. Devido ao curto período de meia vida da ornitina em humanos o metabolismo de poliaminas não é afetado. Esta droga porém é inativa contra *T. cruzi*, que produz espermidina por outros caminhos metabólicos ou obtém através do sangue do hospedeiro (Fairlamb, 1990; Fairlamb e Cerami, 1992).

Estudos de modelagem molecular mostraram que os antidepressivos clorimipramina e primaquina se ligam aos sítios hidrofóbicos da tripanotona redutase e estudos cinéticos confirmaram que estes compostos são inibidores da tripanotona redutase e portanto considerados grandes candidatos para direcionar a síntese de novos compostos com atividade inibidora da tripanotona redutase (Schimer *et alii*, 1995).

Estudos recentes mostraram que *T. cruzi* pode utilizar um análogo de putrescina, a cadaverina, como fonte de poliaminas funcionais e poliamina

glutathione conjugates differently from the mammalian host. The presence of a new polyamine-thiol conjugate was detected in epimastigote forms of *T. cruzi* whose chemical structure was confirmed as being N<sup>7</sup>, N<sup>9</sup>-bis-(glutathionyl) aminopropyl cadaverine (homotripanotiona). This apparent lack of specificity may therefore be explored in the chemotherapy of Chagas disease (Hunter *et alii*, 1994).

## 1.2 Citotoxicidade

Todo ano milhares de compostos químicos passam por testes rigorosos de avaliação de toxicidade. Para se assegurar a ausência de riscos de um novo composto químico é necessária a realização de uma bateria de testes com animais sobre toxicidade aguda, crônica e local, alergia, mutagenicidade e teratogenicidade. Além do alto custo estes ensaios demandam longo tempo e um grande consumo de animais experimentais, o que tem gerado em países desenvolvidos uma pressão contrária de vários setores da população envolvidos com proteção ambiental (Langowski, 1993).

Como parte do movimento para o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais, muito interesse tem sido dado aos testes "in vitro" para a avaliação do potencial tóxico de compostos químicos. Testes "in vitro" significam de modo geral pesquisas que não envolvem animais superiores intactos e incluem uma bateria de sistemas vivos tais como bactérias, cultura de células animais, ovos fertilizados e embriões que podem ser empregados para a avaliação da toxicidade de compostos químicos em seres humanos. Estes testes são geralmente rápidos, sensíveis, fáceis de automação e mais viáveis em termos econômicos com relação ao uso de animais experimentais (Goldberg e Frazier, 1989).

A disponibilidade de cultura de células de mamíferos motivou a sua utilização em toxicologia "in vitro". Atualmente cultura de células tem sido utilizada no teste e investigação do modo de ação de produtos químicos com aplicações diversas tais como drogas, detergentes, cosméticos, inseticidas e preservantes (Freshney, 1994).

Citotoxicidade é um evento complexo "in vivo" onde suas expressões podem se manifestar por uma variedade de efeitos, desde simples morte até aberrações metabólicas complexas. As medidas de citotoxicidade "in vitro" é um evento puramente celular, sendo portanto difícil de recriar o efeito de farmacocinética de exposições as drogas. Também muitas substâncias não tóxicas se tornam tóxicas após serem metabolizadas pelo fígado e substâncias tóxicas "in vitro" podem ser detoxificadas pelas enzimas do fígado (Freshney 1994). Para se avaliar citotoxicidade através do metabolismo de drogas, cultura de hepatócitos tem sido utilizada, possibilitando maior correlação entre os ensaios "in vivo" e "in vitro" (Roguet *et alii* , 1993).

Cultura de células em testes de citotoxicidade são bastante úteis na complementação de testes de toxicidade com animais e podem fornecer novas abordagens para a redução do número de experimentos com animais nos testes de toxicidade aguda. Apesar dos resultados obtidos em cultura de células não poderem ser extrapolados diretamente para a situação do organismo como um todo, servem como base para a avaliação das características toxicológicas de novos compostos químicos, tanto quanto habilita decidir sobre quais experimentos "in vivo" deverão ser realizados e quais são os órgãos ou organelas mais afetadas (Halle e Spielmann, 1992).

Pressupondo a existência de certa correlação entre os parâmetros quantificados de  $IC_{50}$  (concentração que reduz a atividade celular em 50%) e os de toxicidade aguda  $DL_{50}$  (quantidade de composto químico que produz 50% de morte numa população de animais), Halle e Spielmann (1992) correlacionaram valores de  $IC_{50}$  em vários sistemas de cultura de células de mamíferos e os valores de  $DL_{50}$  encontrados na literatura, por análise de regressão linear. Nestes estudos, correlações significativas foram encontradas sugerindo que os valores de  $DL_{50}$  podem ser estimados através de estudos "in vitro" e doses mais precisas podem então ser utilizadas nos testes de toxicidade aguda desta forma reduzindo o número de testes com animais experimentais (Halle e Spielmann, 1992).

Rosenkraz *et alii* (1992) correlacionou também valores de  $IC_{50}$  encontrados na literatura de 175 compostos farmacologicamente ativos com os valores de MTD (máxima dose tolerada), em ratos e cachorros e encontrou correlações altamente significativas entre os dois parâmetros para várias classes de compostos estudados.

Vários testes de citotoxicidade utilizando cultura de células foram desenvolvidos e entre eles se destacam os métodos do conteúdo total de proteínas, método da incorporação do vermelho neutro, redução do sal tetrazólico e exclusão do azul tripan. Estes testes são baseados em quatro diferentes métodos de análise de ponto final que são indicativos de citotoxicidade. As células são cultivadas em placas de plástico e tratadas com várias concentrações da substância teste. Após 24 horas de exposição a substâncias teste é retirada do meio e os diferentes métodos de análise empregados (Renzi *et alii*, 1993).

O método da exclusão do azul tripan permite avaliar a integridade estrutural das células. Este método mede a habilidade das células vivas que

possuem a membrana celular intacta em excluir corante azul tripan permitindo a quantificação do número de células vivas (Lovelland *et alii* , 1992).

Os outros tres métodos fornecem informações sobre as funções metabólicas celulares.

O método do corante vermelho neutro (VN) mede a integridade lisossomal uma vez que reflete a capacidade de células vivas de incorporar o corante em seus lisossomas (Babich e Borefreund, 1990). O Vermelho Neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenazina) um corante vital solúvel em água fracamente catiônico, consegue penetrar na membrana celular por difusão passiva não iônica e se concentra nos lisossomas onde se fixa através de ligações eletrostáticas `a grupos aniônicos inclusive fosfatos hidrofóbicos da matriz lisossomal. Neste método, a medida quantitativa do corante vermelho neutro captado pelos lisossomas das células após tratamento com a substância teste é feita através da medida da absorbância `a 540 nm, pois há uma relação linear entre a quantidade do corante vermelho neutro extraído e o número de células viáveis desta cultura (Forsby A. *et alii* , 1991).

O método de avaliação do conteúdo total de proteínas ou, determinação do DNA (PR) avalia a capacidade proliferativa das células. Neste método a análise do conteúdo total de proteínas é feita através da medida da absorbância `a 260 nm, parâmetro este que indica a população celular, visto que a relação entre os valores da absorbância (260 nm) e o número de células no lisado descrevem uma função linear (Repetto e Sanz, 1993; Knox *et alii* , 1986 e Cingi *et alii* , 1991). Os resultados são expressos em concentração do material teste que produz redução de 50% no conteúdo de proteínas de células tratadas.

O método do sal de tetrazólio é baseado na redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltriazol)-2-il)-2,5-difenil tetrazólio](MTT), um corante amarelo, pela succinato desidrogenase mitocondrial, formando um produto azul escuro-formazan. Somente células viáveis com mitocôndrias ativas reduzem quantidades significativas do MTT. A quantidade do produto formazan é medida pela absorbância `a 570 nm e é proporcional ao número de células presentes no meio de cultura. Os resultados são expressos como concentração que reduz a redução do MTT em 50% (Denizot e Lang, 1986).

Métodos que utilizam microorganismos para a avaliação do potencial tóxico de substâncias químicas podem também ser empregados. Estes testes preliminares de toxicidade podem ser vantajosos pois apresentam baixo custo, são rápidos e de fácil automação. Testes de curta duração utilizam bactérias

fungos e leveduras pois estes organismos podem responder ao estresse causado por agentes químicos em tempos relativamente curtos. O estresse pode ser medido e avaliado monitorando-se um ciclo bioquímico vital do organismo tal como a atividade enzimática, pool ATP, bioluminescência, respiração, etc...(Jardim *et alii*, 1989; Brower, 1991).

Dois testes em particular, os quais utilizam bactérias, tem sido bastante utilizados. O teste Ames que detecta mutagenicidade em *Salmonella typhimurim* e o Microtox, que determina a atividade antimicrobiana de compostos químicos utilizando-se a bactéria marinha *Photobacterium phosphorium* e mede a diminuição da emissão de luz por estas bactérias quando expostas `a substâncias químicas (Rosenkraz *et alii* , 1993).

Em nosso laboratório tem sido rotineiramente empregado um teste de curta duração desenvolvido por Jardim *et alii* (1989), o qual utiliza a bactéria *E. coli* para a avaliação do potencial tóxico de compostos químicos. Neste teste o parâmetro utilizado para a avaliação da toxicidade é a respiração microbiana.

A validade de testes toxicológicos utilizando-se bactérias, na predição de toxicidade de eucarióticos é bastante questionável uma vez que humanos e bactérias diferem drasticamente com respeito a anatomia e metabolismo. Porque uma substância é tóxica para humanos e também (ou não tóxica) para bactérias é difícil de responder, entretanto a importância dos estudos toxicológicos comparativos é bem reconhecida, e podem chamar a atenção para novos aspectos de toxicologia celular e fisiológica (Rosenkraz *et alii* , 1993; Kerzman, 1993).

Em um estudo comparativo de toxicidade foram correlacionados valores de concentração mínima inibitória (MIC) para células bacterianas de duas diferentes espécies e vários tipos de dados obtidos em sistemas humanos. Por análise de regressão linear correlações altamente significativas foram encontradas entre os valores de MIC em bactérias *E. coli* e *Bacillus subtilis* e concentrações letal aguda em sangue de humanos. Foi correlacionada também a inibição do crescimento bacteriano com valores obtidos de testes de citotoxicidade "in vitro" com vários tipos de células humanas. Novamente correlações altamente significativas foram encontradas (Rozenkraz *et alii*, 1993).

### 1.3 Correlação entre Estrutura Química e Atividade Biológica

A racionalização das interações entre estrutura e atividade biológica de compostos químicos é feita através de estudos de correlações estrutura-atividade (SAR).

A importância prática destes estudos é que permitem prever a atividade biológica de compostos não testados biologicamente ou até mesmo de compostos hipotéticos. Em adição, os conhecimentos obtidos através destes estudos (SAR), podem indicar certas propriedades moleculares importantes para a atividade biológica de interesse, assim confirmando ou não o mecanismo de ação ou sugerindo maiores investigações para o entendimento deste mecanismo.

Estas correlações são de grande importância econômica para a indústria farmacêutica no planejamento racional de drogas. Nos Estados Unidos, o gasto na pesquisa de desenvolvimento de drogas é de 11 bilhões de dolares por ano. A isto deve-se acrescentar os gastos de pesquisa em pesticidas e toxicologia do meio ambiente. As verbas do NIH (National Institute of Health) ultrapassa a 9 bilhões de dolares por ano. Portanto o gasto anual nos Estados Unidos é provavelmente maior que 20 bilhões de dolares/ano o que é aproximadamente metade do dinheiro gasto mundialmente em pesquisa e desenvolvimento de drogas e áreas afins (Hansch, 1993).

O uso de modelos para o entendimento da correlação entre estrutura química e a atividade biológica, teve início com Overton e Meyer no século passado (Hansch e Leo, 1979). Estes pesquisadores sugeriram o uso dos coeficientes de partição entre óleo e água para modelar a partição de compostos orgânicos em tecidos nervosos e assim obtiveram um mecanismo para o estudo da ação narcótica. Um grande avanço neste sentido foi feito por Hammett (Hansch e Leo, 1979) que tratou de forma quantitativa os efeitos eletrônicos causados por substituintes nas constantes de velocidade e constantes de equilíbrio em reações orgânicas.

Usando o ácido benzóico como um sistema de referência, foi definida uma escala para os efeitos eletrônicos dos substituintes em sistemas aromáticos através da (Eq. 1).

$$\sigma_x = \log K_x - \log K_H \quad (\text{Eq. 1})$$

onde  $K_x$  é a constante de ionização do ácido benzóico substituído e  $K_H$  é a constante de ionização do ácido benzóico em água a 25 °C. Quando  $K_x$  é maior que  $K_H$  (ácido substituído mais forte que o ácido benzóico),  $\sigma_x$  é positivo (ex: p-NO<sub>2</sub> = 0.78), indicando um efeito retirador de elétrons pelo substituinte. Quando  $K_x$  é menor que  $K_H$ , a constante  $\sigma_x$  é negativa indicando um efeito doador de elétrons pelo substituinte (p-OCH<sub>3</sub> = -0.27).

Hammett através do gráfico da constante de equilíbrio de várias reações versus os valores de  $\sigma$  dos derivados do ácido benzóico, obteve uma reta (uma vez que não houvesse efeitos de interação estérica ou efeito direto de ressonância entre os substituintes e o centro reacional), resultando na famosa equação de Hammett (Eq.2).

$$\text{Log } K_x = \rho\sigma + \text{log } K_H \quad (\text{Eq. 2})$$

O coeficiente angular  $\rho$  sendo único para cada reação é uma medida da sensibilidade da reação pelo efeito do substituinte.

Taft aplicou o mesmo principio e definiu  $E_s$  para os efeitos estéricos dos substituintes em sistemas alifáticos, também Pauling e Pressman propuseram parâmetros de refratividade molar (MR) para correlacionar forças de dispersão dos substituintes em reações bioquímicas (Hansch e Leo, 1979).

No início dos anos 60, Hansch e Fujita, (1964) formularam parâmetros hidrofóbicos  $\pi$ , utilizando como sistema de referência octanol-água para definir o caráter hidrofóbico relativo dos substituintes. Estes estudos denominados correlações lineares de energia livre (LFER), levaram a um melhor entendimento para a análise de parâmetros físico-químicos que governam interações de compostos orgânicos com sistemas biológicos (enzimas, organelas etc...).

O método de Hansch, baseado nos estudos de Hammett (LFER), é o método mais utilizado nas correlações quantitativas de estrutura-atividade biológica (QSAR)(Hansch e Leo, 1979; Hansch e Klein, 1991; Ganellin e Roberts, 1993; King, 1994; Kubinyi, 1993).Este método utiliza regressões lineares ou multilíneas entre os parâmetros biológicos e os parâmetros dos substituintes ou grandezas que variam com os substituintes para uma série de compostos congêneros.

A abordagem de Hansch nos estudos de correlações quantitativas estrutura-atividade biológica resulta em equações do tipo (Eq. 3).

$$\log 1/C = a + b \pi + c \sigma + d ES + e MR \quad (\text{Eq. 3})$$

onde  $C$  é a concentração necessária para produzir alguma resposta biológica (podendo ser EC<sub>50</sub>, MIC, LD<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> etc...).

Os valores  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$  e  $e$  na Eq. 3 são calculados por análise de regressão múltipla, que fornecem medidas de  $s$  (desvio padrão observado de  $C$ ),  $r$  (coeficiente de correlação) e  $n$  (número de dados utilizados) (Naeff *et alii*, 1991).

Parâmetros os quais levam em conta as propriedades estruturais dos substituintes são necessários afim de se correlacionar atividade biológica com a estrutura química de uma maneira quantitativa. Neste caso as propriedades físico-químicas são bastante úteis pois estão diretamente relacionadas às forças intramoleculares envolvidas nas interações droga-receptor e também no transporte e na distribuição de drogas (Kubyni, 1993).

Centenas de parâmetros tem sido utilizados em estudos de QSAR entretanto os parâmetros mais empregados são a constante de Hammett ( $\sigma$ ) e constantes F e R obtidas por Swain e Lupton que são parâmetros de efeitos eletrônicos do substituinte, a constante de efeito estérico de Taft (ES), constante hidrofóbica ( $\pi$ ) e de refratividade molar (MR)(Kubyni, 1993).

Atualmente existem na literatura várias escalas de parâmetros dos substituintes. Valores de  $\pi$ , MR,  $\sigma_m$  e  $\sigma_p$ , F e R foram obtidos para cerca de 2000 substituintes diferentes (Hansch e Leo, 1979). Uma outra revisão feita por Hansch, Leo e Taft foi publicada em 1991 (Hansch *et alii*, 1991).

A constante de Hammett ( $\sigma$ ) é a medida de mudanças de natureza eletrônica de um composto causada pela introdução de um grupo substituinte. Valores positivos de  $\sigma$  indicam o caráter retirador de elétrons do substituinte em relação ao hidrogênio e valores negativos representam o caráter doador de elétrons do substituinte (Hansch e Leo, 1979).

Taft estabeleceu que há duas contribuições principais de efeitos eletrônicos dos substituintes. O efeito indutivo de campo que se propaga através de ligações  $\sigma$  e o efeito de ressonância ou mesomérico exercido através de sistemas de elétrons  $\pi$ . Taft mediu os efeitos eletrônicos do substituinte em sistemas onde não havia conjugação através de ligações  $\pi$ , e assim definiu o

parâmetro de efeito indutivo de campo  $\sigma_I$ . O componente de ressonância  $\sigma_R$  foi então calculado para os substituintes em posição para do anel benzênico através da **equação 4** utilizando-se os valores conhecidos de  $\sigma_p$  de Hammett e os valores de  $\sigma_I$  obtidos para os diferentes substituintes (Hansch e Leo, 1979).

$$\sigma = \sigma_I + \sigma_R \quad (\text{Eq. 4})$$

Uma outra abordagem estatística foi feita por Swain e Lupton (1968) que definiu as constantes de efeito indutivo de campo F e ressonância R, **equação 5**.

$$\sigma = fF + rR \quad (\text{Eq. 5})$$

Através da **equação 5** as constantes F e R foram calculadas para 43 substituintes a partir de  $\sigma_p$  e  $\sigma_m$  de Hammett assumindo-se que qualquer conjunto de constantes do substituinte ( $\sigma_m$ ,  $\sigma_p$ ,  $\sigma$ , etc...) pode ser expresso em função linear de  $fF + rR$  onde,  $r = 0$  para o cálculo de  $\sigma$  na dissociação de ácido [2,2,2] octano carboxílico 4-substituído, onde o efeito do substituinte neste sistema é totalmente um efeito indutivo de campo devido a ausência de insaturação ou conjugação. Também foi assumido que  $R = 0$  para o substituinte trimetilamônio  $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+]$  que é incapaz de doar ou aceitar elétrons por ressonância.

O parâmetro de efeito estérico de Taft (ES) é a medida do efeito estérico exercida pelo substituinte. Foi definido utilizando-se como o sistema de referência a hidrólise ácida de ésteres alifáticos (RCOOEt) e os parâmetros estéricos ES do substituintes calculados através da **equação 6**:

$$\text{ES} = \log ( K_R / K_{\text{Me}} )_A \quad (\text{Eq. 6})$$

onde  $( K_R / K_{\text{Me}} )_A$  é a razão entre as constantes de velocidade da hidrólise ácida de RCOOR' e MeCOOR'. Por definição  $\text{ES} (\text{Me}) = 0$ . Quanto mais volumoso o substituinte mais negativo o valor de ES (Fujita e Iwamura, 1983). Outros parâmetros foram também definidos os quais contam com o efeito estérico do substituinte.

O parâmetro de refratividade molar (MR) é um parâmetro relacionado à polarizabilidade do substituinte, que é de crucial importância em interações de ligantes com macromoléculas. Enquanto este parâmetro é a medida de polarizabilidade, é altamente colinear com o volume molecular, e em adição, MR e  $\pi$  (hidrofobicidade relativa) para um conjunto de substituintes podem estar altamente interligados. Assume-se que um coeficiente positivo com MR na equação de correlação sugere a importância de forças de dispersão e mudanças conformacionais favorecendo o processo de interação ligante macromolécula. Um coeficiente negativo com este parâmetro, indica um efeito estérico na interação ligante macromolécula (Hansch e Leo, 1979).

$L$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  e  $B_4$  são parâmetros estéricos direcionais do substituinte introduzidos por Verloop em 1976 os quais contam com a forma do substituinte.  $L$  é a medida do comprimento do substituinte ao longo do eixo de substituição e o esqueleto da molécula parente. Os parâmetros  $B$  que contam com a largura do substituinte são todos ortogonais a  $L$  e com ângulos de  $90^\circ$  entre si. São arranjados de tal maneira que  $B_1$  tem o menor valor e  $B_4$  o maior valor. Na maioria dos casos  $B_4$  é próximo à largura máxima do substituinte (Hansch e Leo, 1979).

A importância de interações hidrofóbicas de ligantes macromoléculas, ou membranas, levaram ao uso extensivo do parâmetro  $\log P$  (coeficiente de partição), em estudos de QSAR. Apesar de  $\log P$  ser uma medida de hidrofobicidade da molécula como um todo, no sistema de referência octanol/água normalmente trabalha-se com conjunto de compostos congêneros no qual uma grande porção da molécula permanece constante. Neste caso, a hidrofobicidade relativa do substituinte  $\pi$  pode ser suficiente para a análise de correlações, quando conhecido.

Para se trabalhar com a hidrofobicidade relativa do substituinte e desta forma separar efeitos hidrofóbicos de efeitos eletrônicos e estéricos dos substituintes, o parâmetro  $\pi$  foi definido. **(Equação 7)**

$$\pi_x = \log P_x - \log P_H \quad (\text{Eq. 7})$$

onde:

$P_x$  é o coeficiente de partição do derivado no sistema octanol-água e

$P_H$  é o coeficiente de partição da molécula parente

Valores positivos de  $\pi$  significam que a molécula derivada tem maior afinidade por octanol que a molécula parente. (Hansch e Fujita, 1964; Hansch e Leo, 1979).

Parâmetros de mecânica quântica obtidos por cálculo de orbitais moleculares tem sido amplamente empregados em estudos de correlação estrutura-química atividade biológica (Kubinyi, 1993). Estes cálculos de orbitais moleculares além de fornecerem valores numéricos das propriedades eletrônicas moleculares, permitem os cálculos de energia conformacional que são de grande importância no entendimento de interações ligante macromolécula.

Diferentes cálculos de orbitais moleculares para uma mesma molécula podem fornecer energias conformacionais diferentes dependendo dos parâmetros moleculares (comprimento de ligação, ângulo de ligação) e do método utilizado para os cálculos. Entretanto, não está bem claro qual dos métodos semi empíricos é mais confiável. Mais importante porém, que o problema de precisão dos vários cálculos de orbitais moleculares é se a conformação preferida (de energia mínima) de uma molécula isolada é a mais provável de estar envolvida em sua interação droga-receptor.

Diferenças entre energia mínima conformacional são da ordem de poucas kcal e podem ser mais que compensadas pela energia de interação droga-receptor. Assim um conhecimento (delineação) da natureza e magnitude de barreiras energéticas conformacionais pode ser mais importante do que o conhecimento detalhado de configuração correspondendo à energia mínima (Redl *et alii*, 1974).

As correlações de estrutura atividade utilizando-se parâmetros de cálculo de orbitais moleculares são baseados nos índices computacionais que refletem a estrutura eletrônica da molécula. Normalmente utiliza-se nas correlações carga líquida em cada átomo, energias de orbitais de fronteira  $E_{HOMO}$  e  $E_{LUMO}$  e densidade eletrônica dos orbitais (Shusterman *et alii*, 1989; Shusterman, 1990).

Em geral os índices de cálculos de orbitais moleculares são calculados para átomos individuais e assim o conjunto de parâmetros disponíveis para a análise de correlações é grande. A seleção destes parâmetros deve ser baseada em razões bioquímicas quando conhecidas ou muitas vezes em estudos preliminares estes parâmetros podem ser escolhidos de forma arbitrária. Porém deve se levar em consideração que a possibilidade de se obter boas correlações

umenta consideravelmente com o número de parâmetros testados (Kubinyi, 1993).

Um dos problemas mais sérios no desenvolvimento de QSAR é escolher uma série de compostos congêneros de forma a se evitar colinearidade entre os parâmetros, maximização da variância do sistema e obter o máximo de informações do conjunto de dados escolhido (Hansch e Leo, 1979; Norrington *et alii*, 1975; Redl *et alii*, 1974).

Uma vez que existem muitos substituintes possíveis o número de compostos a se considerar é bastante grande em estudos de QSAR. Portanto seria altamente vantajoso analisar em um estágio preliminar do estudo, quais compostos seriam interessantes de se sintetizar, afim de se trabalhar com um grupo limitado de substituintes os quais fornecem boa discriminação entre os parâmetros  $\pi$ ,  $\sigma$ , ES etc....

Craig (1971) mostrou a importância de se plotar  $\pi$  versus  $\sigma$  para se obter um conjunto de substituintes com mínima colinearidade e ao mesmo tempo abrangendo variação máxima de  $\pi$  e  $\sigma_p$  entre os substituintes. Substituintes de cada um dos quadrantes do diagrama resultante devem ser escolhidos.

Generalizando esta abordagem para vários parâmetros ( $\pi$ , R, F, MR,  $\sigma_m$ ,  $\sigma_p$ ) Hansch e Unger (1973) usaram a forma de matrizes para se avaliar colinearidades.

Topliss (1972) desenvolveu esquemas operacionais, baseados em regras de decisão onde o uso de computadores e cálculos estatísticos não é necessário.

Na seleção dos parâmetros algumas considerações devem ser feitas. Uma grande variedade de parâmetros devem ser testados tais como log P,  $\pi$ ,  $\sigma$ , MR, Es, etc. Os parâmetros selecionados devem ser independentes com coeficientes de intercorrelação não sendo maior que 0.6-0.7. Na análise de regressão deve haver pelo menos 5 pontos (ou compostos) estudados para cada parâmetro utilizado na equação de correlação (Kubinyi, 1993).

## **2. OBJETIVOS GERAIS**

Este trabalho teve como objetivos estudar a síntese e a atividade biológica de compostos com atividade antichagásica.

Barret (1976) descreveu pela primeira vez a síntese de uma série de derivados de 3-aminopropeno e observou que estes compostos eram ativos contra *T. cruzi*.

Seguindo esta linha de pesquisa decidimos sintetizar uma série de novos derivados de 3-aminopropeno e estudar a atividade tripanocida "in vitro" destes compostos.

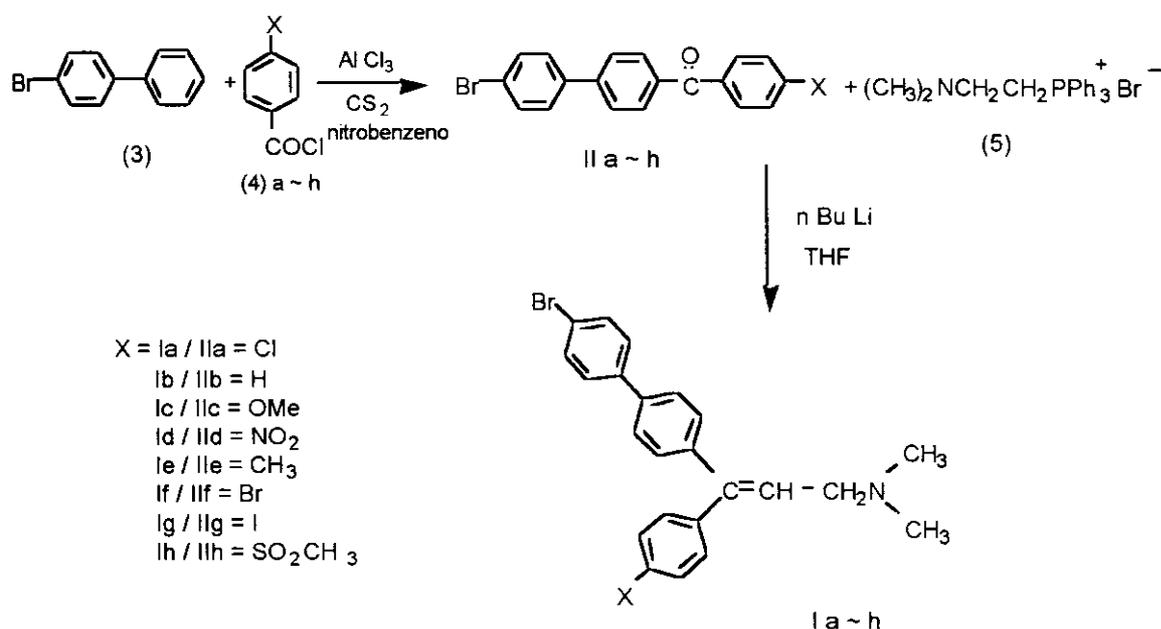
Este trabalho teve também como objetivo a avaliação da toxicidade dos compostos sintetizados correlacionar estrutura química e atividade biológica e estudar preliminarmente seus possíveis mecanismos de ação tripanocida e tóxico.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Síntese de derivados de 3-aminopropeno (I)

Os derivados de 3-amino propeno **I a-h** foram sintetizados por uma rota de síntese de duas etapas (**Esquema 1**), consistindo de uma acilação de Friedel-Crafts entre 4-bromobifenila **3** e o cloreto de ácido correspondente **4 a-h** na obtenção das cetonas **II a-h**. As cetonas obtidas foram tratadas com fosforana correspondente ao brometo de dimetilamino etiltrifenil fosfônio **5** obtendo-se os compostos **I a-h**.

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



### • Acilação de Friedel-Crafts

Reagindo-se 4-bromobifenila (**3**) com cloreto de p-cloro benzoila (**4a**), cloreto de benzoila (**4b**), cloreto de anisoila (**4c**), cloreto de p-nitro benzoila (**4d**), cloreto de p-metil benzoila (**4e**), cloreto de p-bromo benzoila (**4f**), cloreto de p-iôdo benzoila (**4g**) e cloreto de p-metilsulfonyl benzoila (**4h**) em presença de cloreto de alumínio e bissulfeto de carbono ou nitrobenzeno como solvente, as cetonas 4-bromo-4-bifenil p-clorofenil cetona (**IIa**), 4-bromo-4-bifenil fenil cetona (**IIb**), 4-bromo-4-bifenil p-metoxifenil cetona (**IIc**), 4-bromo-4-bifenil p-nitrofenil cetona (**IId**), 4-bromo-4-bifenil p-metilfenil cetona (**IIe**), 4-bromo-4-bifenil p-bromofenil cetona (**IIf**), 4-bromo-4-bifenil p-iôdofenil cetona (**IIg**) e 4-bromo-4-bifenil p-metilsulfonylfenil cetona (**IIh**), respectivamente foram sintetizadas.

O cloreto de p-nitro benzoila (**4d**) foi sintetizado reagindo-se ácido p-nitro benzóico com cloreto de tionila e após recristalização em hexano foi obtido com 95% de rendimento.

O cloreto de ácido p-metilsulfonyl benzóico (**4h**) foi sintetizado a partir do tratamento de ácido p-metilsulfonyl benzóico com cloreto de tionila e utilizado na etapa de acilação de Friedel-Crafts sem purificação posterior.

Tentativas de síntese da cetona (**IIh**) pelo mesmo procedimento utilizado na síntese das cetonas (**II a-g**) resultou na recuperação dos reagentes 4-bromobifenila e ácido p-metilsulfonyl benzóico observando-se traços da cetona desejada (**IIh**), por espectroscopia de infravermelho e cromatografia em camada delgada.

Vários fatores podem alterar o rendimento nas acilações de Friedel-Crafts, tais como proporções relativas dos reagentes, sequência de adição dos reagentes, solvente utilizado, etc.... Vários solventes tem sido utilizados nestas acilações de Friedel-Crafts entretanto, os solventes mais utilizados são bissulfeto de carbono e nitrobenzeno, os quais levam essencialmente a dois tipos de acilações - reações homogêneas e reações heterogêneas. Em solventes apolares ou pouco polares, tais como bissulfeto de carbono e diclorometano, o cloreto de alumínio e o complexo formado com o cloreto de ácido não são totalmente solúveis e a reação é bastante heterogênea. Já em nitrobenzeno, solvente bastante polar, o cloreto de alumínio e também o complexo cloreto de alumínio-cloreto de ácido são totalmente solúveis (Trost e Fleming, 1991).

Devido a não solubilidade do cloreto de ácido p-metilsulfônil benzóico (**4h**), cloreto de alumínio e do complexo formado cloreto de alumínio-cloreto de ácido em bissulfeto de carbono, decidimos utilizar nitrobenzeno na tentativa de obtenção da cetona (**IIh**), pois problemas de solubilidade poderiam estar ocasionando a não obtenção do produto desejado.

Reagindo-se então 4-bromobifenila (**3**) com o cloreto de ácido p-metilsulfônil benzóico (**4h**) em presença de cloreto de alumínio e nitrobenzeno como solvente, a cetona 4'-bromo-4-bifenil p-metilsulfônil fenil cetona (**IIh**) foi obtida com 50% de rendimento.

A **tabela 1** a seguir apresenta as propriedades físicas e rendimentos dos compostos (**IIa-h**)

**Tabela 1:** Condições de reação, propriedades físicas e rendimentos de 4'-bromo-4-bifenil 4-x-fenil cetona (**II a-h**)

Composto II a-h (X)	Solvente	Tempo de reação (horas)	Solvente de recristalização	Rend. (%)	p.f (°C)	U.V $\lambda_{\max}$ (nm) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Cl	CS <sub>2</sub>	7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexano	79	204	294
H	CS <sub>2</sub>	5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexano	72	156-7	292
OMe	CS <sub>2</sub>	8	Benzeno	62	219-20	258
NO <sub>2</sub>	CS <sub>2</sub>	7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexano	75	182-3	272
Me	CS <sub>2</sub>	7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexano	82	195	290
Br	CS <sub>2</sub>	5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexano	68	215	294
I	CS <sub>2</sub>	7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexano	80	239	290
SO <sub>2</sub> Me	Nitrobenzeno	7	Etanol	50	201-2	246

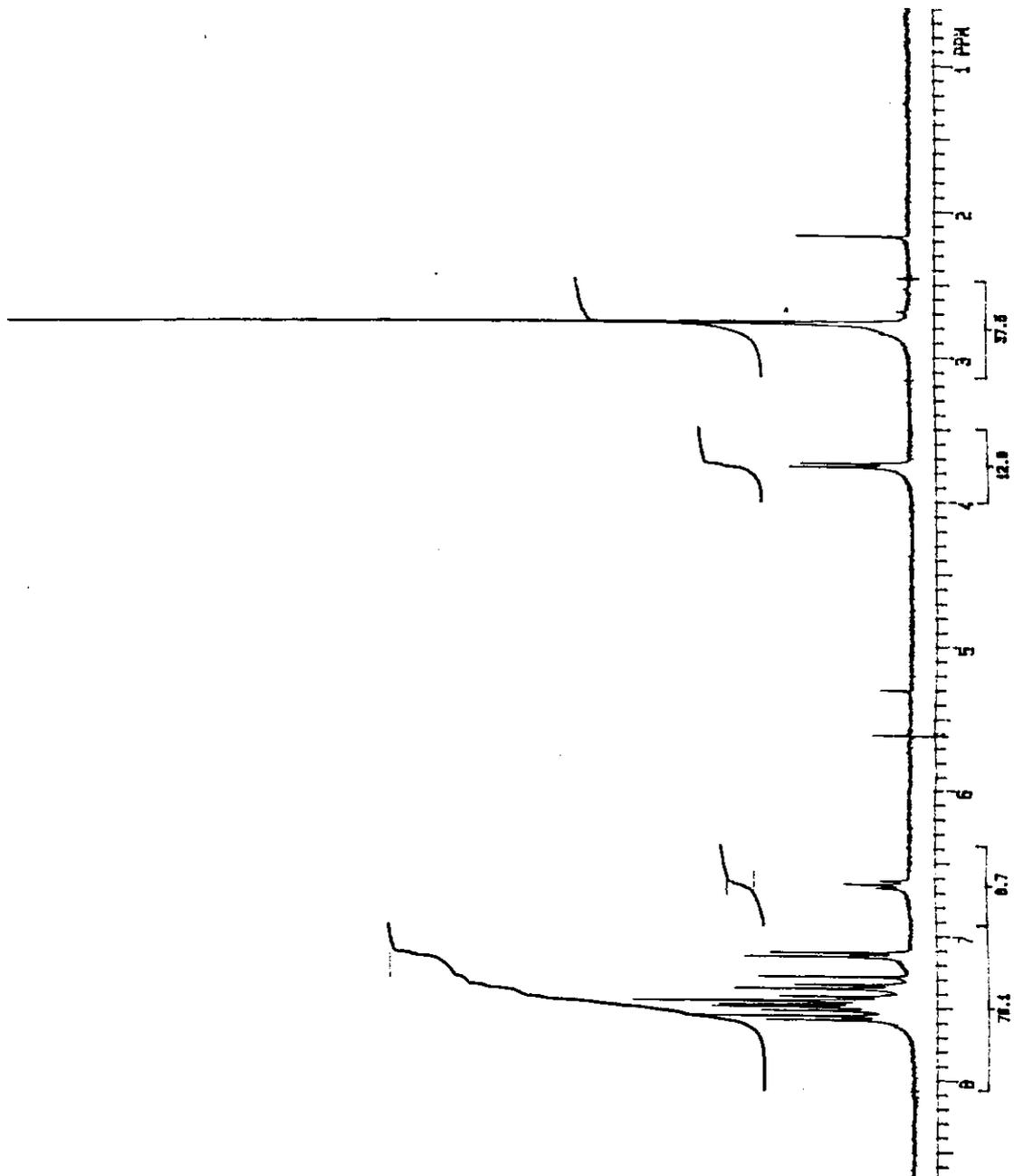
### • Reação de Wittig

Reagindo-se 4-bromo-bifenil p-clorofenil cetona (**IIa**) e brometo de dimetilamino etiltrifenilfosfônio em presença de n-butil lítio (n-BuLi) e tetrahidrofurano (THF) como solvente, 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (**Ia**) é obtido na proporção de 1:1 dos isômeros geométricos E/Z.

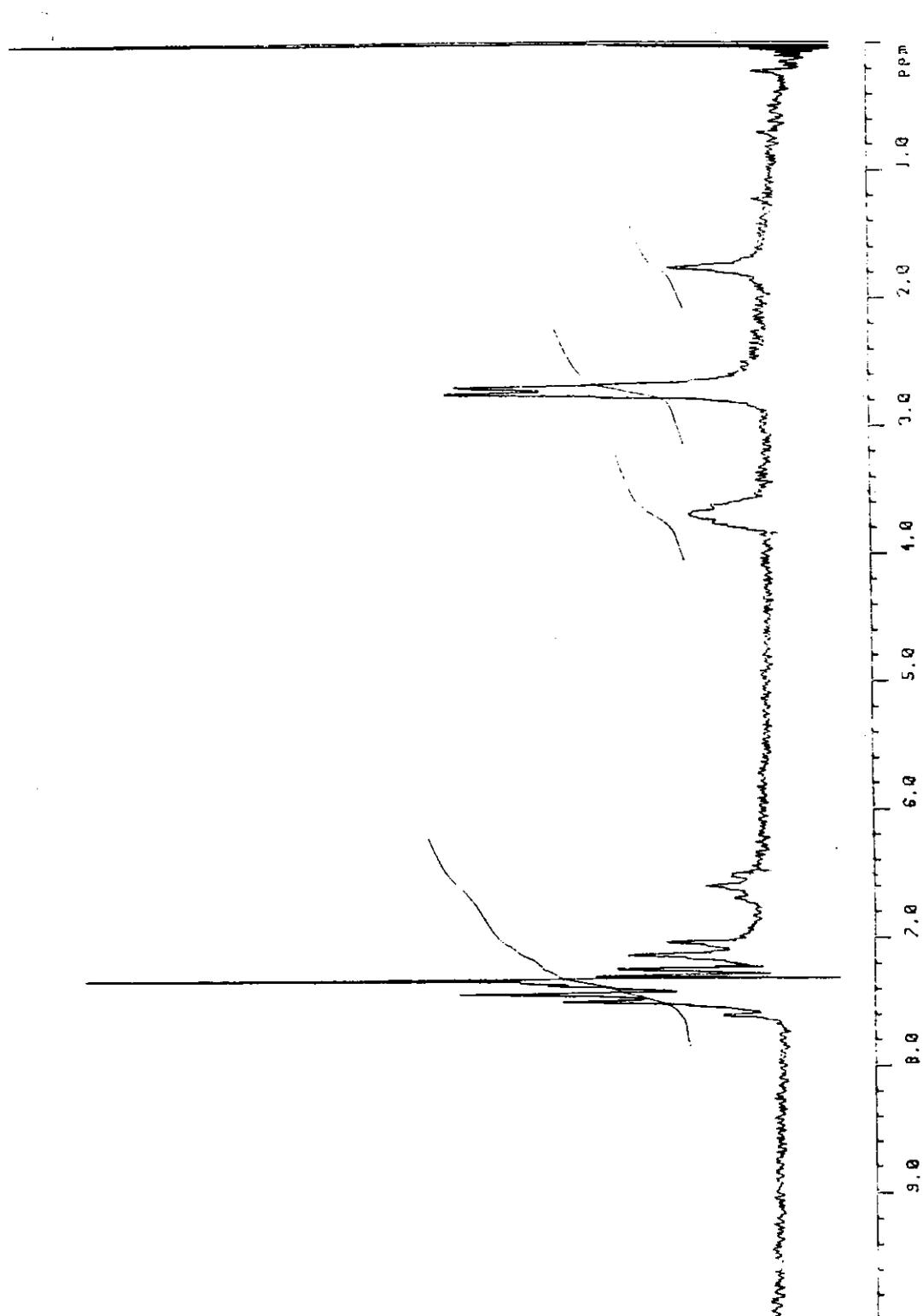
Inicialmente, alguns ensaios foram realizados na obtenção do composto (**Ia**) visando a otimização da reação. As reações foram feitas nas mesmas condições de temperatura, tempo e solvente variando-se apenas o tratamento da reação no isolamento do produto. Quando o produto **Ia** foi isolado na forma de sal de hidrocloreto e cristalizado em benzeno somente o isômero **Z** foi obtido com baixo rendimento e identificado por ressonância magnética nuclear de próton (**Fig. 1**). Através dos espectros de ressonância nuclear de próton e ultra violeta da mistura isomérica e dos isômeros **E** e **Z** separados, foi possível a determinação da configuração **Z** para este composto, o que será descrito posteriormente neste trabalho (**item 3.2**). Numa segunda tentativa utilizando-se um excesso de ácido clorídrico no isolamento do produto, uma mistura 1:1 dos isômeros foi obtida como mostra o espectro  $^1\text{H}$  RMN (**Fig. 2**).

Foram também realizadas algumas reações utilizando-se uma mistura de solventes tetrahidrofurano e hexametil fosforamida (HMPA), com o objetivo de se obter toda a cetona (**IIa**) solúvel no meio reacional, visando um aumento no rendimento da reação. Infelizmente nestas condições o produto não foi detectado por cromatografia de camada delgada (CCD) em nenhuma das tentativas.

Os melhores resultados foram obtidos quando a reação foi feita utilizando-se THF como solvente e o produto isolado na forma de base livre e purificado por cromatografia de coluna (CC), obtendo-se o composto (**Ia**) com 50% de rendimento.



**Figura 1:**  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de Z-Ia HCl



**Figura 2:**  $^1\text{H}$  RMN (80 MHz;  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de E/Z (1:1) Ia HCl

Os outros derivados de 3-amino propeno (**I b-h**) foram então sintetizados utilizando-se este mesmo procedimento e obtidos sob a forma de uma mistura 1:1 dos respectivos isômeros geométricos. As propriedades físicas e rendimentos dos compostos (**I a-h**) encontram-se na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Características de síntese, propriedades físicas e rendimentos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-x-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (**Ia-h**)

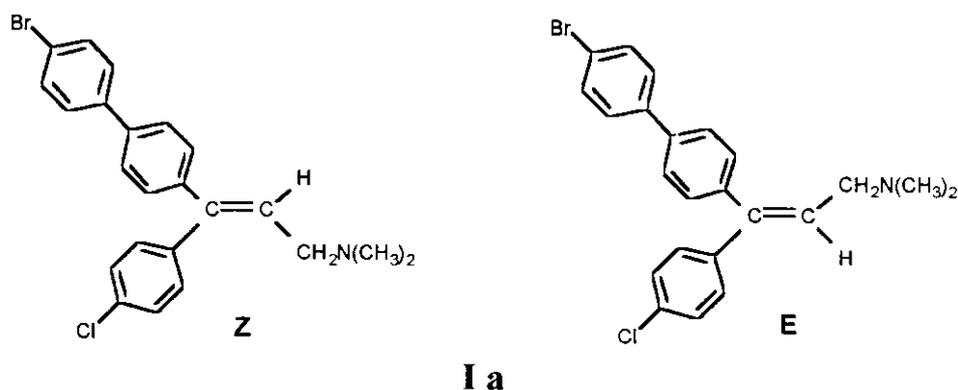
Composto I a-h (X)	Sistema de solvente cromatografia de coluna	Rendimento (%)	p.f (°C)	U.V $\lambda_{\max}$ (nm) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Cl	Hexano/eter/Et <sub>3</sub> N 8 : 2 : 1	50	115-20	272
H	Hexano/eter/Et <sub>3</sub> N 9 : 1 : 1	60	100-02	276
OMe	Hexano/eter/Et <sub>3</sub> N 9 : 1 : 1	45	óleo	268
NO <sub>2</sub>	Acetato de etila/Etanol 100 : 1	58	120-25	280
Me	Hexano/eter/Et <sub>3</sub> N 8 : 2 : 1	58	85-7	272
Br	Acetato de etila/Etanol gradiente 1-5%	50	101	268
I	Acetato de etila/Etanol gradiente 1-5%	56	142	268
SO <sub>2</sub> Me	Acetato de etila/Etanol gradiente 5-15%	62	óleo	264

### 3.2 Separação dos isômeros geométricos

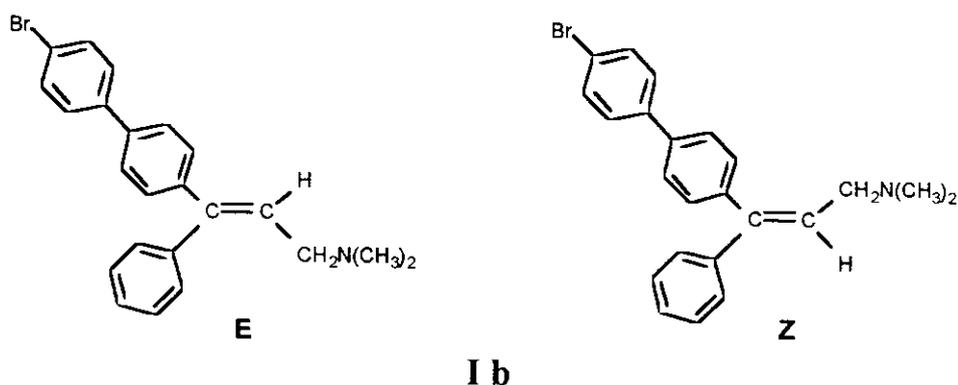
Os derivados de 3-amino propeno (**I a-h**) sintetizados apresentam isomerismo geométrico. Considerando processos biológicos, os isômeros geométricos podem apresentar diferentes atividade biológica podendo, um dos isômeros ser mais ativo que o outro ou até um dos isômeros não apresentar a atividade desejada. Portanto, a separação dos isômeros e a avaliação da atividade tripanocida da mistura de isômeros e de cada um dos isômeros separados é de considerável importância.

Isômeros geométricos por apresentarem propriedades físicas diferentes, podem em princípio ser separados por cristalização fracionada (diferença de solubilidade), cromatografia de coluna, cromatografia líquida e cromatografia gasosa (diferente polaridade e diferente adsorção).

Os isômeros geométricos do composto cloro derivado de 3-aminopropeno (**Ia**) são designados pela regra de Cahn-Ingold-Prelog como sendo:



e do composto não substituído (**Ib**)



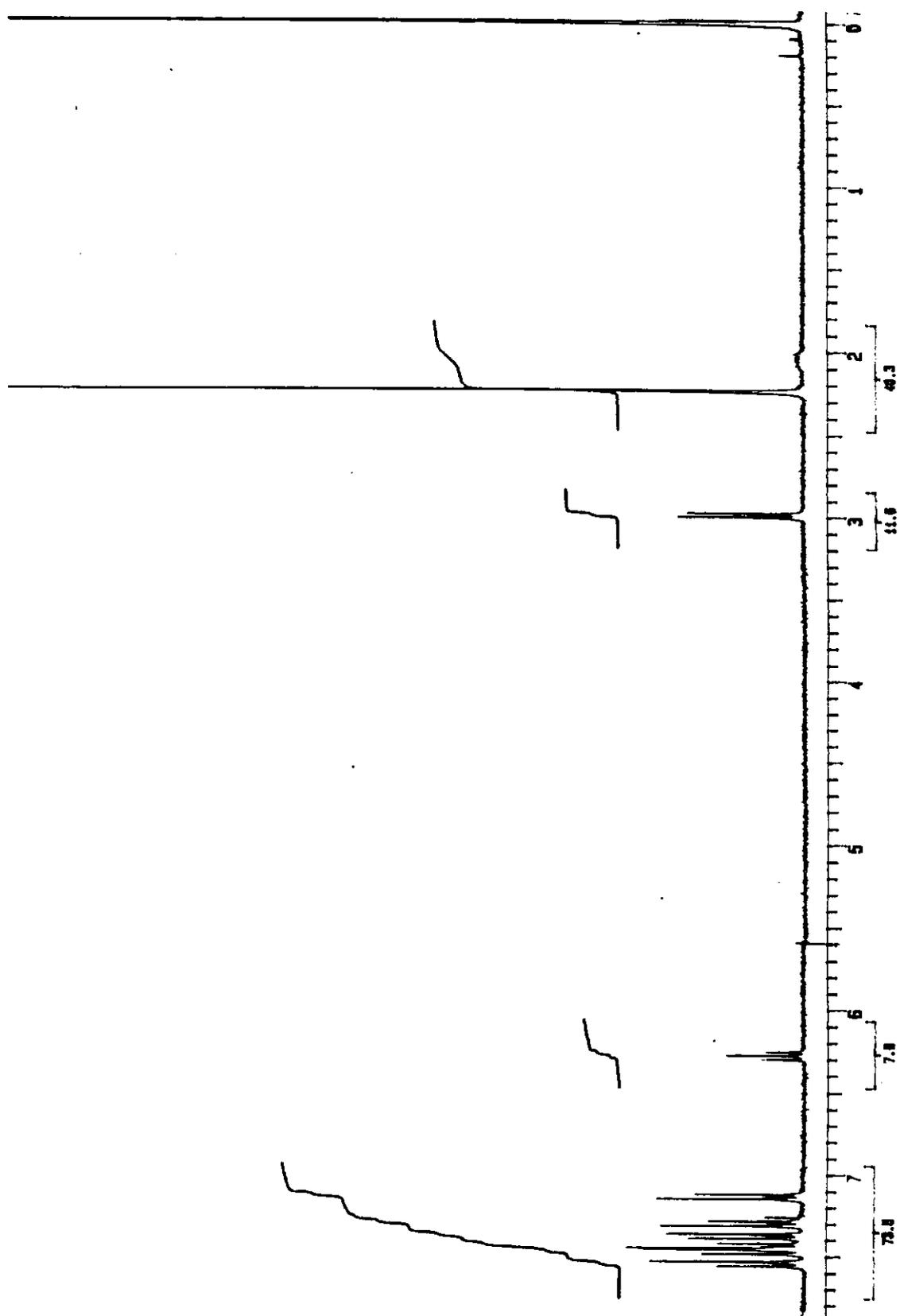
Neste trabalho para maior facilidade na discussão dos resultados, os compostos nos quais os grupos mais volumosos estiverem do mesmo lado da dupla ligação serão denominados **cis** e em lados opostos **trans** independente das designações **Z** ou **E** de (Cahn-Ingold-Prelog).

#### • Separação dos isômeros geométricos por cristalização fracionada

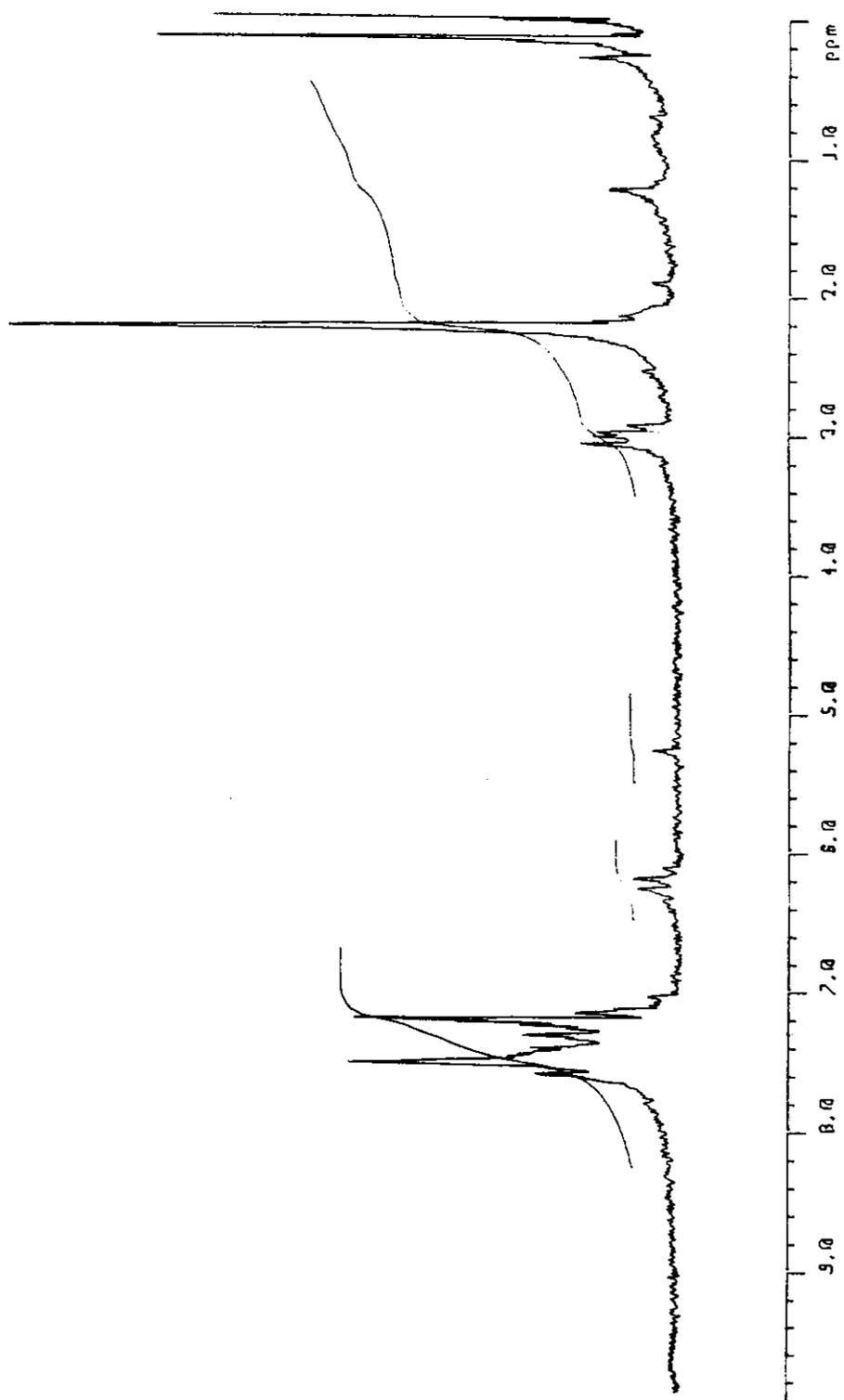
Inicialmente decidiu-se utilizar técnicas de cristalização fracionada na tentativa de separação dos isômeros de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (**Ia**).

Cristalização fracionada de **Ia** em diclorometano/hexano levou a obtenção de um dos isômeros de configuração desconhecida (**cis** ou **trans**) puro na forma cristalina (**Fig. 3**), e a mistura de isômeros enriquecida no isômero mais solúvel no sistema de solventes utilizado (**Fig. 4**) (**Ver tabela 3**).

Baseando-se nos espectros de ultra violeta (U.V), sugeriu-se que o isômero obtido puro e que apresentou absorção no ultravioleta no comprimento de onda mais longo (284 nm), é o isômero **trans**, onde os grupos mais volumosos estão em lados opostos e, portanto, livres para assumir o plano da dupla ligação.



**Figura 3:**  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de trans-Ia



**Figura 4:**  $^1\text{H}$  RMN (80 MHz;  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de Ia - mistura enriquecida no isômero cis

No caso do isômero **cis**, os grupos substituintes mais volumosos encontram-se do mesmo lado da dupla ligação e o grupo bifenila apresenta impedimento estérico, resultando na absorção em comprimento de onda menor (264 nm).

Utilizando-se o mesmo método de separação dos isômeros geométricos do cloro derivado, cristalização fracionada do composto (**Ib**) 3-[4'bromo-(1,1'-bifenil)-4-il]-3-fenil-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina com hexano / diclorometano, levou a obtenção do isômero **trans** puro (**Vide tabela 3**) e a uma mistura enriquecida no isômero **cis** mais solúvel no sistema de solventes utilizado. A pureza isomérica (100%) foi determinada por ressonância magnética de próton ( $^1\text{H}$ ; 300 MHz). O isômero, **trans** obtido na forma de sólido cristalino apresentou as mesmas características espectroscópicas e aspecto físico do isômero puro obtido para o composto (**Ia**) (**Tab. 3**).

**Tabela 3:** Separação dos isômeros geométricos dos compostos **Ia** e **Ib** propriedades físicas

Composto	Aspecto	PF (°C)	U.V (nm)
<b>Ia - cis/trans</b>	óleo + sólido	-	276
<b>Ia - trans*</b>	sólido	122-23	286
<b>Ia - mistura enriquecida-cis</b>	sólido + óleo	-	264
<b>Ib - cis/trans</b>	óleo	-	272
<b>Ib - trans*</b>	sólido	123-25	286
<b>Ib - mistura enriquecida-cis</b>	óleo + sólido	-	264

\* Configurações atribuídas por espectroscopia de U.V

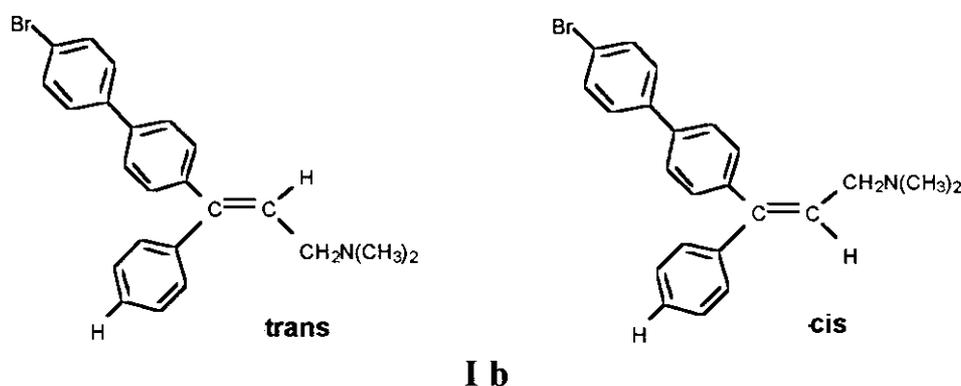
Sucesivas cristalizações da mistura enriquecida no isômero **cis** dos compostos **Ia** e **Ib** não foram bem sucedidas.

Estas misturas foram cromatografadas em colunas de sílica, utilizando-se vários sistemas de solventes. Novamente os isômeros **cis** não foram obtidos puros nas várias condições utilizadas.

### • Separação dos isômeros geométricos por placa preparativa

Decidiu-se, estudar técnicas de cromatografia de placas (CCD) na tentativa de separação dos isômeros geométricos dos compostos derivados de 3-amino propeno **I a-h** sintetizados.

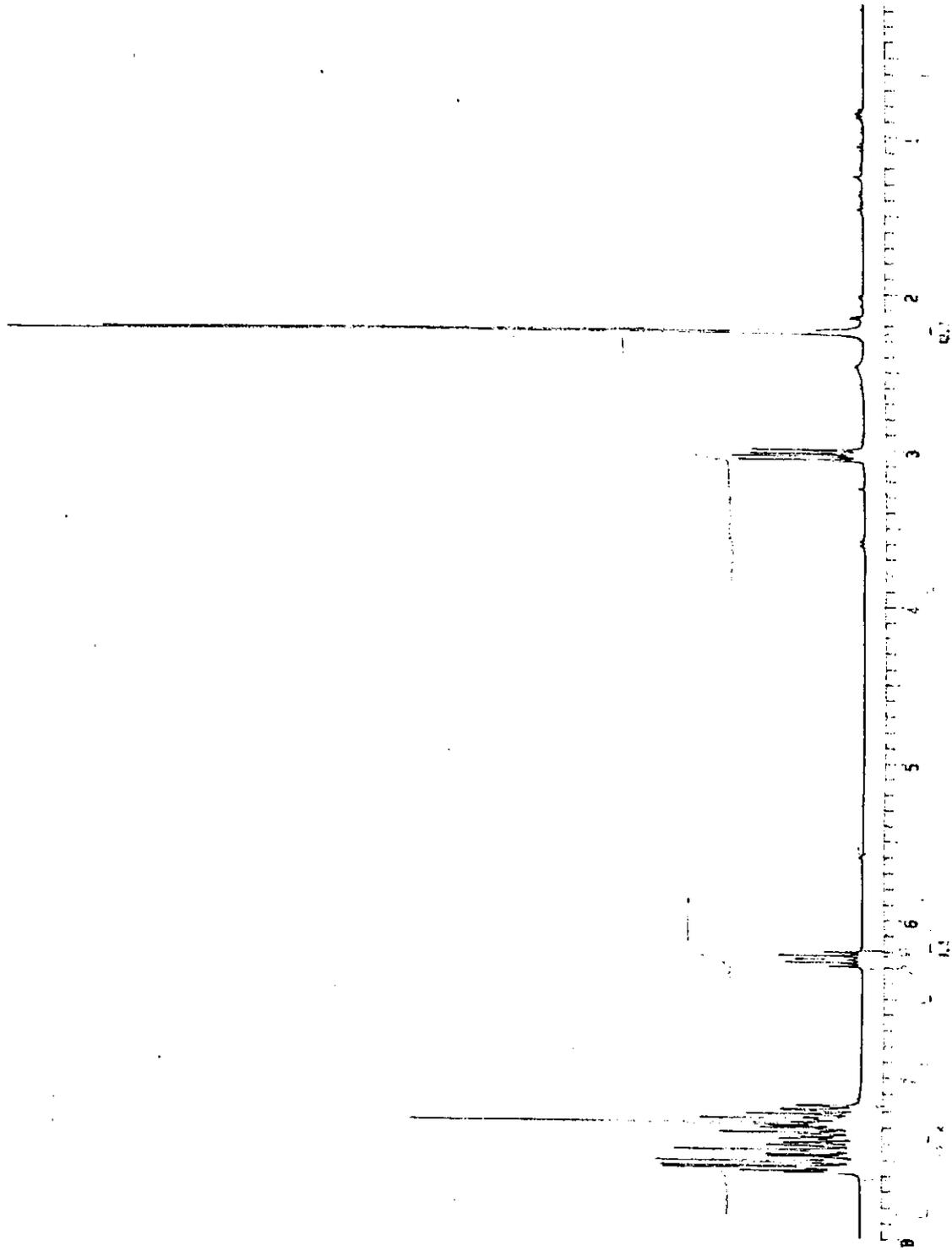
Os isômeros geométricos do composto **Ib** 3-[4'bromo-(1,1'-bifenil)-4-il]-3-fenil-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina foram separados por cromatografia de placa preparativa utilizando-se como fase móvel éter/hexano/NH<sub>4</sub>OH 50:50:1.5 e o solvente eluido cinco vezes.



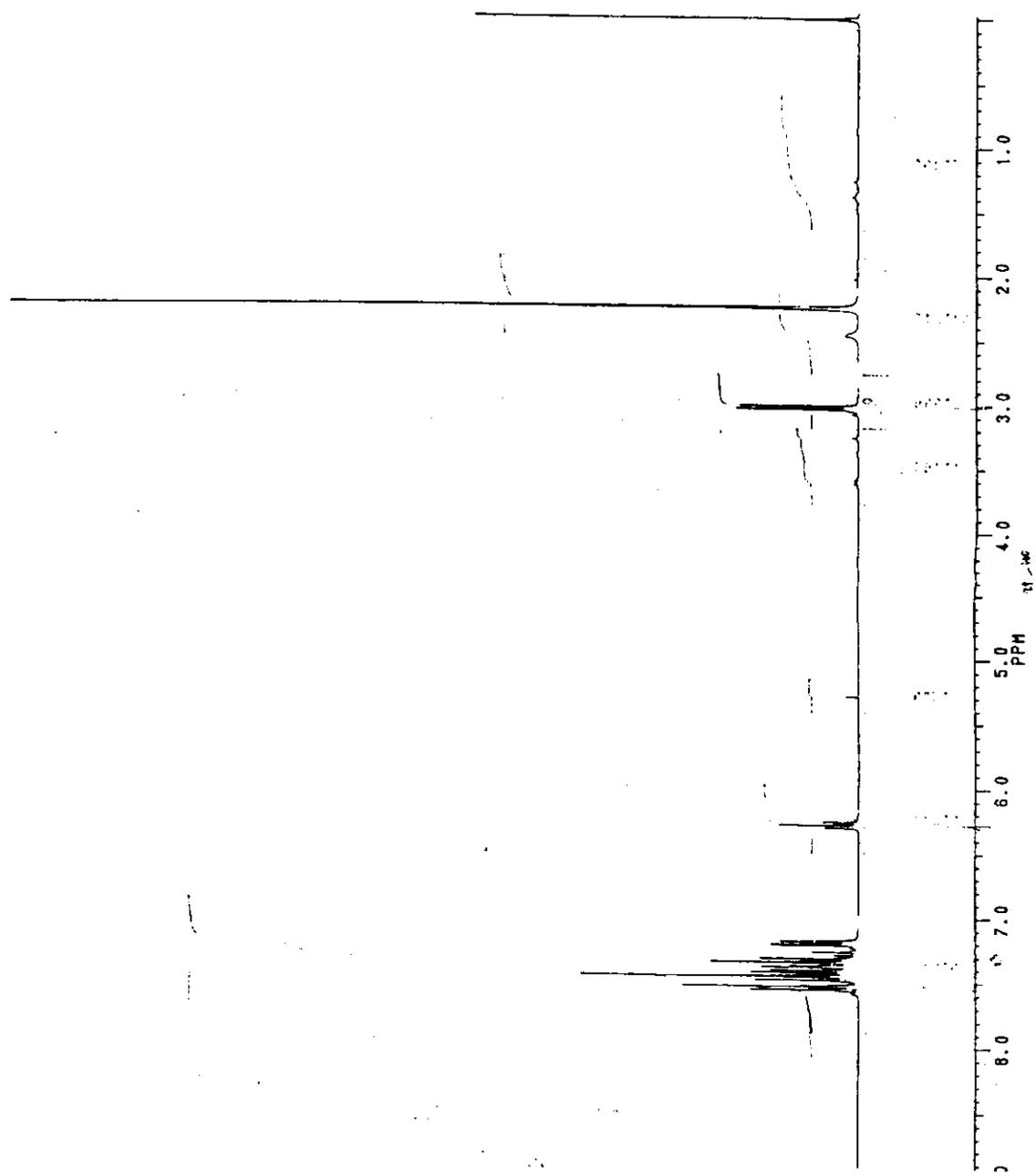
A mistura de isômeros e cada um dos isômeros separados apresentaram diferenças no espectro de U.V e <sup>1</sup>H RMN, o que possibilitou a discriminação entre os isômeros **cis** e **trans** do composto **Ib**.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton da mistura **cis/trans** (**Fig. 5**) e dos isômeros separados foram analisados, observando-se que para o isômero **trans** (**Fig. 6**), os prótons aromáticos do grupo bifenila ( $\delta$  7.3 - 7.45 ppm) apresentam-se como um conjunto de dubletos distintos e separados dos prótons aromáticos do grupo fenila.

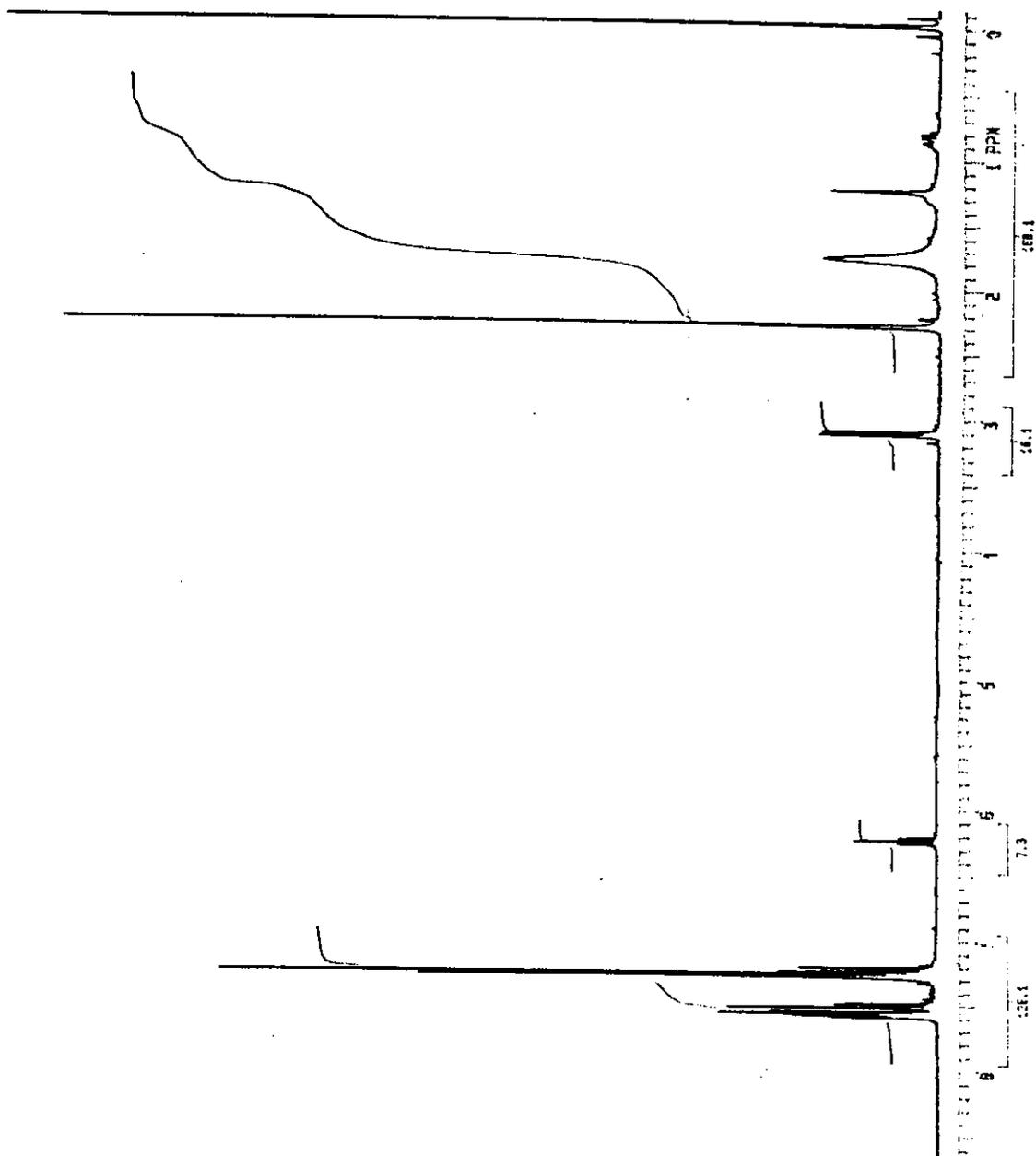
No isômero **cis** (**Fig. 7**) os prótons aromáticos apresentam-se como dois multipletos distintos ( $\delta$  7.2-7.3 e  $\delta$  7.5-7.6 ppm) com áreas correspondentes a 8 e 5 prótons respectivamente, provavelmente em razão de perturbação de natureza estérica que dificulta a coplanaridade do anel bifenila com o sistema de elétrons  $\pi$ .



**Figura 5:**  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de cis/trans Ib



**Figura 6:**  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) do composto *trans* Ib



**Figura 7:**  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) do composto *cis* Ib

Observa-se que no isômero **trans** o próton vinílico  $\delta$  6.30 ppm (t, CH,  $J = 6.7$  Hz) está pouco mais desprotegido que no isômero **cis**  $\delta$  6.25 ppm (t, CH,  $J = 6.7$  Hz). Já os prótons do grupo  $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , estão mais protegidos no isômero **trans**  $\delta$  3.0 ppm (d,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 6.7$  Hz) e desprotegidos  $\delta$  3.1 ppm (d,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 6.7$  Hz) no isômero **cis**.

Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos compostos **I a-h** mostraram o mesmo padrão de comportamento dos prótons aromáticos, prótons vinílicos e prótons do grupo  $\text{CH}_2$ , permitindo a discriminação dos isômeros **cis** e **trans** nos espectros da mistura de isômeros.

Os compostos cloro, metóxi, nitro e metilsulfonyl derivados de 3-aminopropeno foram também cromatografados em placa preparativa (20 X 20 cm) preparados com sílica-gel (2-25  $\mu$ ) - Aldrich. Os sistemas de solventes utilizados na separação dos isômeros **cis-trans** dos compostos estudados encontram-se relacionados na **Tabela 4**

**Tabela 4:** Separação dos isômeros geométricos de alguns dos derivados de 3-amino propeno

Composto I (X)	Sistema de solventes	Eluições (Nº)	U.V $\lambda_{\text{max}}$ (nm) $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	p.f (°C)
Cl / Ia - cis	Hexano/Etér/ $\text{NH}_4\text{OH}$	5	264	óleo
Cl / Ia-trans	50 : 50 : 1.5		286	óleo
H / Ib-cis	Hexano/Etér/ $\text{NH}_4\text{OH}$	5	264	óleo
H / Ib-trans	50 : 50 : 1.5		286	óleo
OMe / Ic-cis	Hexano/Clorofórmio	5	262	óleo
OMe / Ic-trans	saturado com $\text{NH}_4\text{OH}$		284	óleo
$\text{NO}_2$ / Id-cis	Hexano/Clorofórmio	5	264	óleo
$\text{NO}_2$ / Id-trans	saturado com $\text{NH}_4\text{OH}$		282	óleo
$\text{SO}_2\text{Me}$ / Ih-cis	Hexano/Etér/ $\text{NH}_4\text{OH}$	4	264	óleo
$\text{SO}_2\text{Me}$ / Ih-trans	90 : 10 : 5		286	óleo

• **Separação dos isômeros geométricos de 3-[4'bromo-(1,1'-bifenil)-4-il]-3 fenil-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina **Ib** por HPLC preparativa**

Afim de se checar a especificidade dos isômeros geométricos **cis** e **trans** dos derivados de 3-aminopropeno sintetizados em sua atividade biológica, os isômeros geométricos do composto **Ib** (não substituído), foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) preparativa.

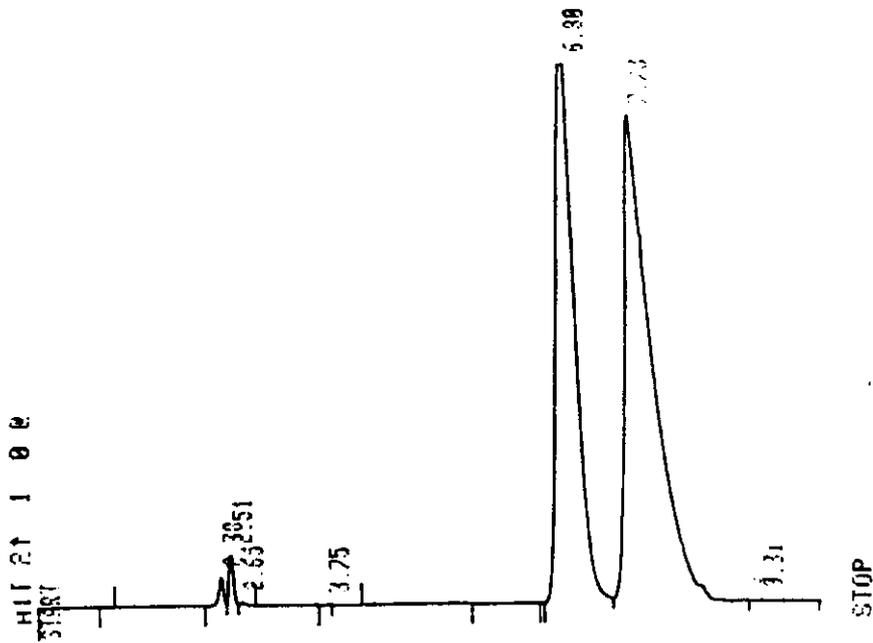
Este método de separação nos pareceu interessante pois permite separações com alto grau de pureza.

Primeiramente utilizando-se detetor de ultravioleta em comprimento de onda de 280 nm, em uma coluna de 200 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro contendo sílica-gel 5 µm, foram testados como fase móvel acetato de etila / metanol num gradiente de 5-20%. Ao se utilizar a composição acetato de etila / metanol 20% como fase móvel com um fluxo de 1ml /min, boa separação dos isômeros foi observada, com tempos de retenção de 6.89 e 7.73 minutos (**Fig.8**). A integração apresentou áreas de 41% para o isômero **cis Ib** e de 56% para o isômero **trans Ib**.

Em uma coluna semi preparativa de 250 mm de comprimento por 10 mm de diâmetro contendo sílica-gel 5 µm nas mesmas condições utilizadas anteriormente, o composto ficou retido na coluna após 1 hora da injeção.

Decidiu-se então utilizar nesta mesma coluna acetato de etila / trietilamina 1% como fase móvel, com um fluxo de 2 ml/min e detecção por ultravioleta no comprimento de onda de 272 nm. Nestas condições uma boa separação dos isômeros foi observada. O isômero **cis** (264 nm) com tempo de retenção de 41 minutos e integração 41% e o isômero **trans** (286 nm) 44 minutos com integração 54% (**Fig.9**).

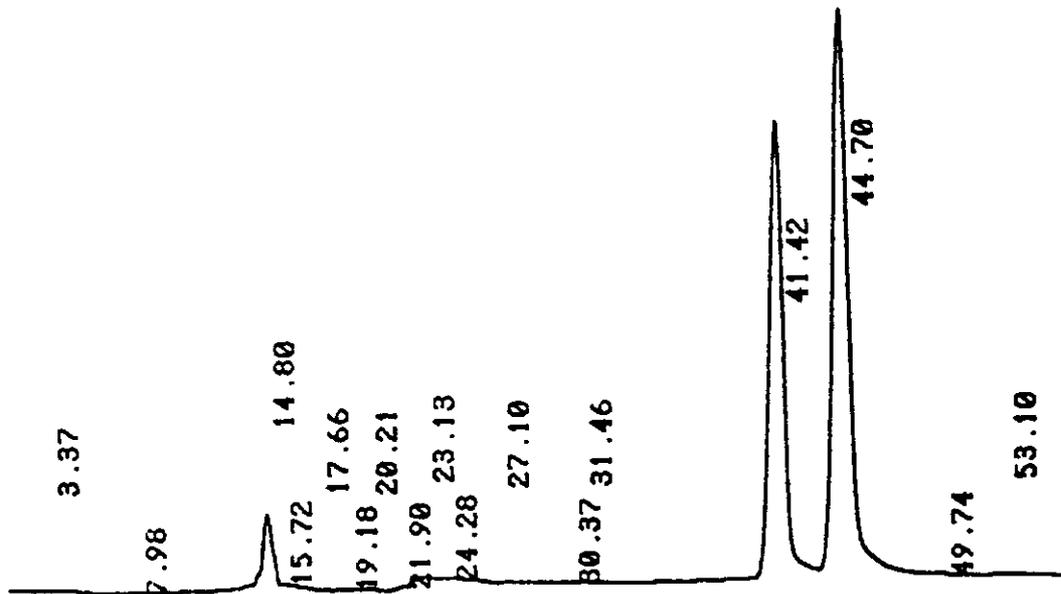
Os isômeros **cis** (Z) e **trans** (E) foram então coletados e a atividade tripanocida avaliada (ver item 3.3.1).



**Figura 8:** Cromatograma da mistura E/Z-Ib

Eluente: acetato de etila/metanol 20%; Fluxo: 2 ml/min

Detector: ultravioleta 280 nm



**Figura 9:** Cromatograma da mistura E/Z-Ib  
Eluente: acetato de etila/trietilamina 1%; Fluxo: 2 ml/min  
Detector: ultravioleta 272 nm

• **Aplicação de NOE para a caracterização dos isômeros cis e trans do composto 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-4-metilsulfonyl)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina **Ih****

Foi feito o estudo de NOE diferencial para o derivado 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-4-metilsulfonyl)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina **Ih** para a confirmação das designações **cis/trans** atribuídas aos isômeros separados dos compostos em estudo.

NOE (Nuclear Overhouse Effect) é uma técnica não dependente de acoplamentos de escala para sua operação, ao invés disso a interação envolvida é o acoplamento direto entre núcleos. A aplicação não simplifica o espectro em si, mas simplifica a interpretação dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. É uma técnica de efeitos laterais de ressonância dupla, que causa um aumento nas intensidades observadas dos sinais de ressonância devido a núcleos próximos, aos núcleos duplamente irradiados.

NOE diferencial é um tipo de relaxação nuclear, isto é, mudança na intensidade de uma ressonância quando as transições de outras são perturbadas de alguma forma (irradiações com um campo de força fraco).

O aumento da intensidade de sinais não precisa ser devido a espaços próximos através de ligações, os núcleos podem estar separados por várias ligações mas, devem estar acoplados no espaço, numa distância de aproximadamente 4 Å, por algum movimento da geometria ou conformação de preferência. O efeito do aumento da intensidade de sinais através do espaço, fornece informações úteis na relação espacial dos átomos que estão distanciados por várias ligações (Brown *et alii*, 1988).

Esta técnica é uma ferramenta bastante versátil na discriminação configuracional de isômeros geométricos, pois permite determinações rápidas, confirmando argumentos de deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ -RMN.

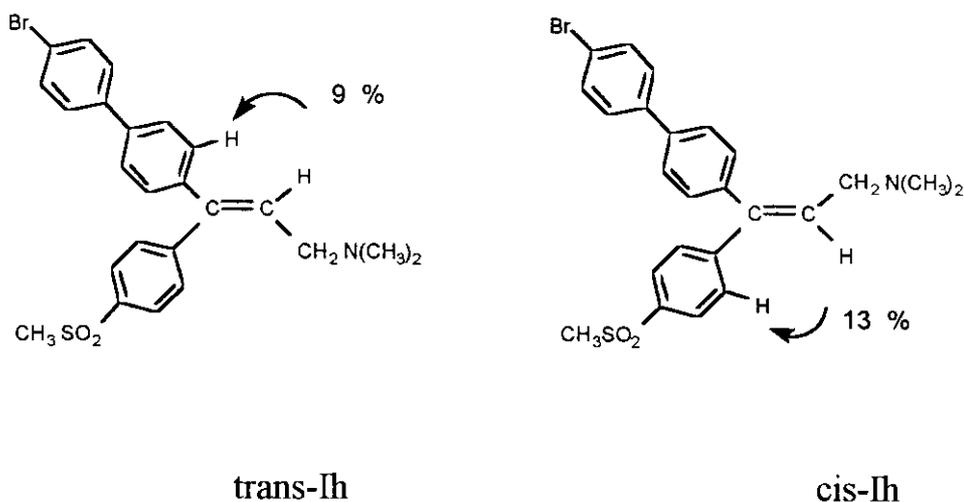
Nas **figuras 10a e b e 11a e b** são apresentados os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN e espectros de NOE diferencial do composto **trans-Ih**.

Irradiação dos prótons metílicos  $\delta$  3.14 ppm ( $\text{CH}_3\text{SO}_2$ ) levou a um efeito marcante de NOE diferencial nos prótons aromáticos do grupo fenila substituído  $\delta$  8.0 ppm ( $\text{CH}_3\text{SO}_2$ -) **Fig. 10b**.

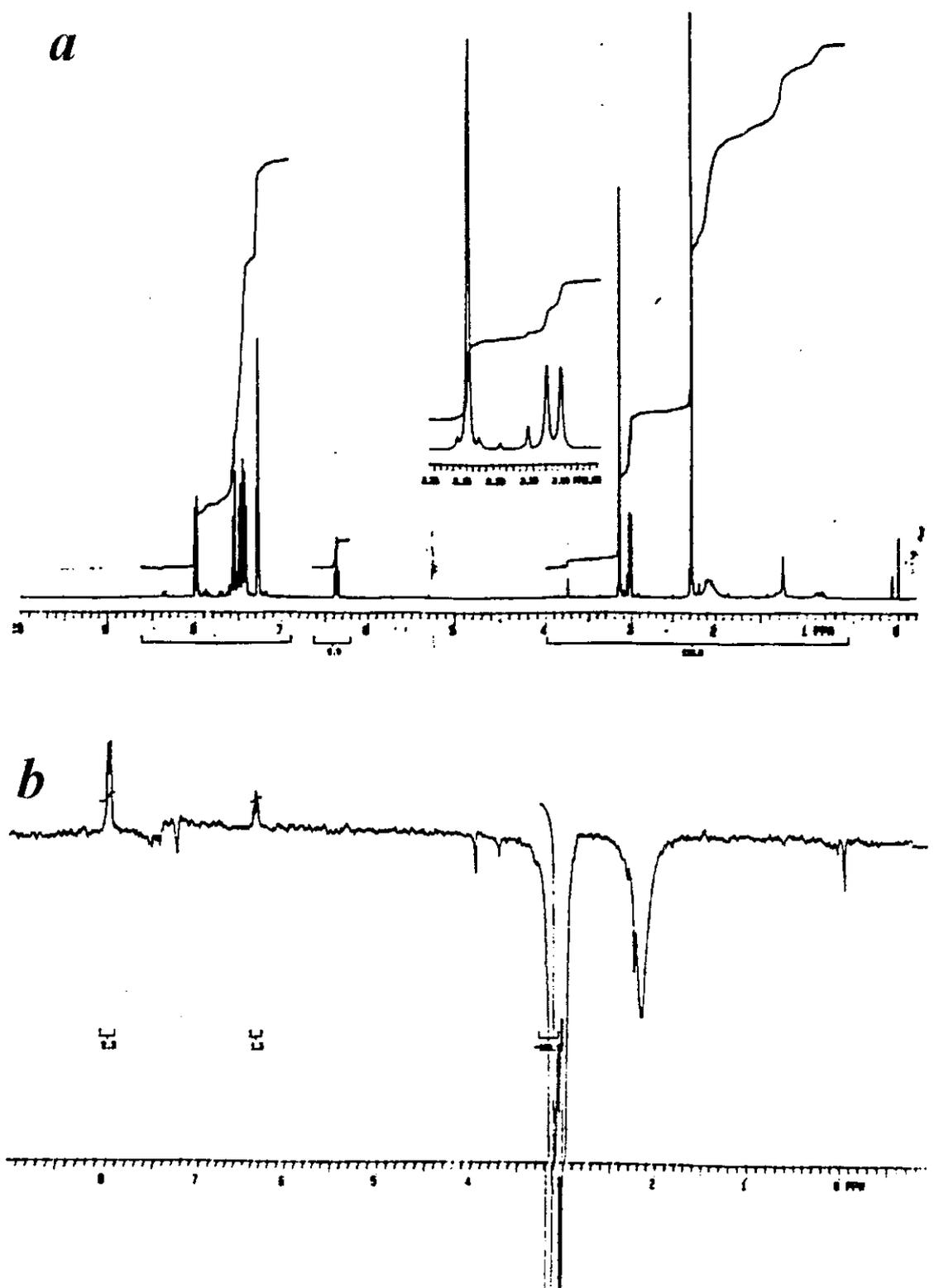
Com irradiação em  $\delta$  8.0 ppm observou-se um efeito positivo de NOE diferencial na região  $\delta$  7.40 ppm indicando ser o duplete ( $^1\text{H}$ -RMN) nesta

região referente aos prótons aromáticos do grupo fenila substituído ( $\text{CH}_3\text{SO}_2$ -) **Fig. 11a**.

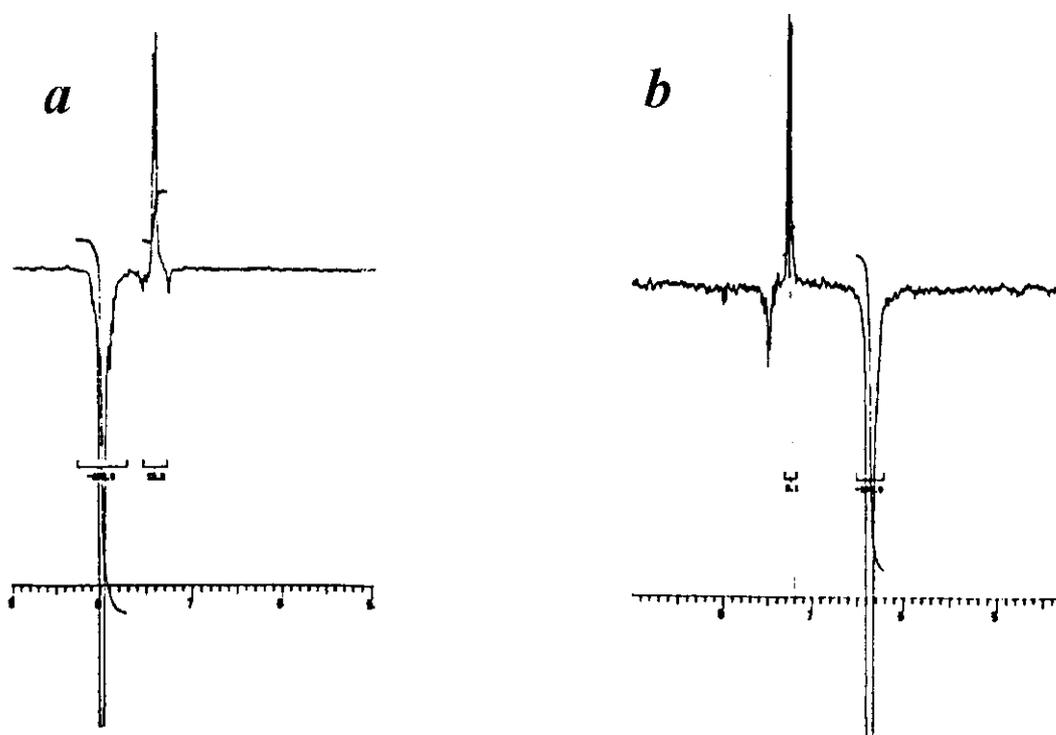
Irradiação do próton olefínico  $\delta$  6.35 ppm ( $\text{CH}=\text{CH}_2$ ) levou a um incremento de 9% no sinal referente ao próton orto do anel bifênica  $\delta$  7.2 ppm (**Fig. 11b**) entretanto, os prótons aromáticos do grupo fenila ( $\delta$  8.0 ppm e  $\delta$  7.4 ppm) não foram afetados. Isto claramente indicou a configuração **trans** para este isômero do composto **I h** estudado.



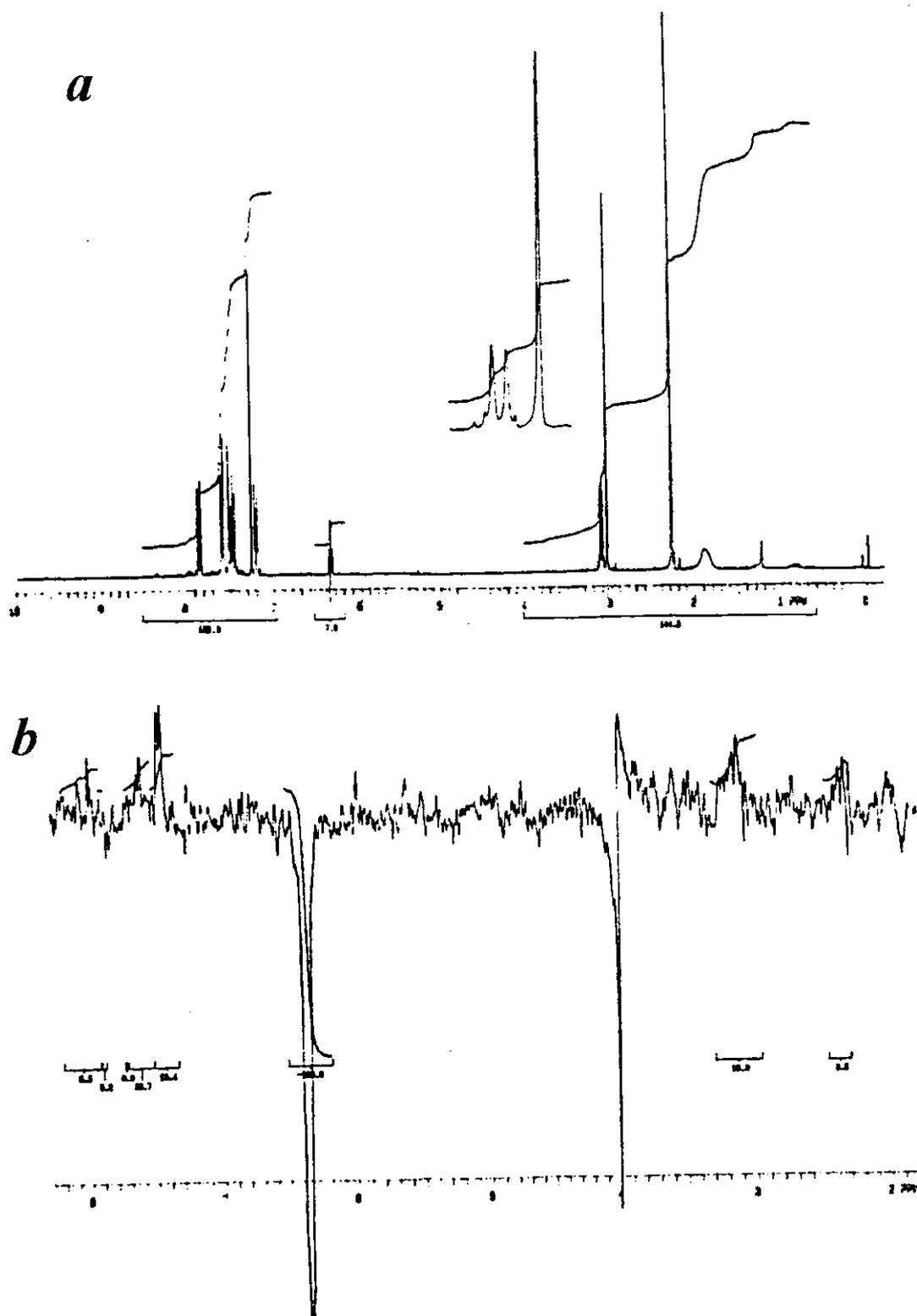
Irradiação do próton olefínico ( $\delta$  6.35 ppm) do correspondente isômero **cis** do composto **I h**, levou a um incremento de 13% no sinal referente ao próton orto do grupo fenila substituído  $\delta$  7.40 ppm, confirmando assim a configuração **cis** para este isômero (**Fig. 12a e b**).



**Figuras 10 a e b:** a) Espectro de  $^1\text{H}$  RMN trans 1h; b) Espectro de NOE diferencial resultante da irradiação em  $\delta$  3.14 ppm



**Figuras 11 a e b:** a) Espectro de NOE diferencial de trans 1h resultante da irradiação em  $\delta$  8.00 ppm; b) irradiação em  $\delta$  6.35 ppm



**Figuras 12 a e b:** a) Espectro de  $^1\text{H}$  RMN cis-1h; b) Espectro de NOE diferencial de cis-1h resultante da irradiação em  $\delta$  6.35 ppm

### 3.3 Avaliação da Atividade Biológica

#### 3.3.1 Atividade Tripanocida

A avaliação da atividade tripanocida dos compostos **I a-h** foi feita em colaboração com a professora Solange de Castro - Fiocruz - Rio de Janeiro.

*T. cruzi* cepa-Y foi utilizado (Silva e Nussenzweig, 1953). As formas tripomastigotas foram obtidas de camundongos infectados e as formas amastigotas obtidas do sobrenadante de macrófagos infectados J- 7746-8 pelo método descrito na literatura (De Castro *et alii*, 1987). As formas epimastigotas foram mantidas em meio LIT (Liver Infusion Triptose) e coletadas na fase exponencial de crescimento.

Os valores de ID<sub>50</sub> - concentração das drogas que corresponde a eliminação de 50% do parasita e lise total foram obtidos para as três formas do ciclo de vida do parasita - tripomastigota, amastigota e epimastigota, e encontram-se relacionados na **Tabela 5**.

Tabela 5 : Efeitos de E/Z I a-h em *Trypanosoma cruzi* (ID<sub>50</sub> e Lise Total)

Composto I a-h (X)	ID <sub>50</sub> /24 horas (lise total) ( $\mu$ M)		
	Tripomastigota (4 °C)	Amastigota (28 °C)	Epimastigota (28 °C)
Ia - Cl	50.8 $\pm$ 8.1 (75-100)	6.7 $\pm$ 0.3 (40-50)	15.8 $\pm$ 1.7 (50-60)
Ib - H	18.8 $\pm$ 1.2 (40-50)	6.6 $\pm$ 1.2 (20-30)	12.7 $\pm$ 0.1 (40-50)
Ic - OCH <sub>3</sub>	54.9 $\pm$ 2.2 (100-200)	6.1 $\pm$ 0.8 (25-30)	27.1 $\pm$ 2.2 (40-50)
Id - NO <sub>2</sub>	35.0 $\pm$ 2.7 (75-100)	6.9 $\pm$ 0.4 (25-30)	24.3 $\pm$ 2.0 (40-50)
Ie - CH <sub>3</sub>	22.0 $\pm$ 0.5 (40-50)	23.1 $\pm$ 1.0 (30-40)	25.1 $\pm$ 3.5 (40-50)
If - Br	12.1 $\pm$ 1.0 (25-30)	2.3 $\pm$ 0.2 (10-15)	13.2 $\pm$ 1.6 (40-50)
Ig - I	33.0 $\pm$ 0.5 (50-75)	8.9 $\pm$ 0.3 (20-30)	17.8 $\pm$ 2.1 (40-50)
Ih - SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	34.4 $\pm$ 4.8 (75-100)	6.0 $\pm$ 0.6 (10-15)	18.2 $\pm$ 3.0 (25-30)
Nifurtimox	157.0 $\pm$ 3.0 (500)	207.3 $\pm$ 35.4 (500)	163.7 $\pm$ 4.1 (500)
VC	536.6 $\pm$ 3.0	-	-
Z-Ib-H	10.0 $\pm$ 1.1	-	-
E-Ib-H	63.4 $\pm$ 5.5	-	-

Considerando-se cada uma das formas de *T. cruzi* os compostos **I a-h** apresentaram atividades similares. Os valores de ID<sub>50</sub> para a forma amastigota variando de 2.3 a 8.9 µM com exceção do derivado metila 23.1 µM. Para as formas epimastigotas foram encontrados valores de ID<sub>50</sub> entre 12.7 a 27.1 µM e tripomastigota entre 12.1 a 54.9 µM. Para as duas formas proliferativas amastigotas e epimastigotas do *T. cruzi*, lise total ocorreu entre 20 a 60 µM e na forma infectiva tripomastigota de corrente sanguínea, 40 a 200 µM.

A ordem de susceptibilidade das três formas do parasita tratadas com as drogas foi então estabelecida: AMA > EPI > TRIPO. Os compostos que se mostraram mais ativos foram o hidrogênio e bromo derivados.

O fato de a forma da corrente sanguínea (TRIPO) em geral se apresentar mais resistente aos compostos pode ser devido às diferenças de temperatura nas quais os experimentos são conduzidos, 28 °C para EPI e AMA e 4 °C para TRIPO. Outro fator que poderia estar envolvido, são as diferenças intrínsecas entre as diferentes formas do parasita.

As diferenças na composição de fosfolipídeos e ou açúcares e lipídeos nas formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas podem ser responsáveis pelas diferenças de susceptibilidade às drogas estudadas.

O composto Z-3-[4'-bromo-(1,1'-bifenil)-4-il]-3-fenil-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina apresentou maior atividade tripanocida (ID<sub>50</sub> = 10.0 ± 1.1 µM) que o isômero E-3-[4'-bromo-(1,1'-bifenil)-4-il]-3-fenil-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (ID<sub>50</sub> = 68.4 ± 5.5 µM).

A atividade do isômero **Z** (ID<sub>50</sub> = 10.0 ± 1.1 µM) foi similar a mistura **E/Z (1:1)** (ID<sub>50</sub> = 18.8 ± 1.2 µM).

Estes valores indicam que o isômero **Z** é reconhecido pelo receptor na forma tripomastigota de *T. cruzi*. Inclusive esta preferência se observa na mistura de isômeros **Z/E (1:1)**. O valor alto de ID<sub>50</sub> (68.4±5.5 µM) encontrado para o isômero **E** sozinho corrobora esta hipótese.

A violeta genciana é recomendada para o tratamento profilático em bancos de sangue em áreas endêmicas da doença de Chagas, portanto nós comparamos sua atividade com a dos compostos **I a-h** para a forma tripomastigota *T. cruzi*, observando-se que estes são cerca de 10-15 vezes mais ativos que violeta genciana nas mesmas condições experimentais (De Castro, 1994). Observa-se também pela **tabela 5** que os compostos **I a-h**

sintetizados até o momento são tripanocidas mais efetivos "in vitro" que nifurtimox.

### 3.3.2 Toxicidade Aguda

Testes de toxicidade são baseados no uso do material vivo para definir a natureza e o grau de efeitos nocivos produzido por agentes tóxicos. Neste tipo de ensaio o organismo selecionado é exposto a um potencial contaminante por um período de tempo. Estes ensaios podem ser feitos para se determinar inúmeros parâmetros, tais como taxa de mortalidade, a imobilidade, taxa de respiração, taxas de reprodução, crescimento, etc... (Guimarães e Jardim, 1990).

Informações de toxicidade tanto a nível celular (citotoxicidade, toxicidade aguda) como atividade tripanocida são bastante importantes no desenvolvimento de novos antichagásicos. Portanto foram feitos os testes de toxicidade aguda a nível de membrana (*E. coli*) para os compostos **I a-h** derivados de 3-amino propeno pelo método descrito na literatura (Jardim *et alii*, 1989).

Neste teste de toxicidade aguda em *E. coli*, a inibição na respiração microbiana é o parâmetro utilizado para avaliar o potencial tóxico do agente estressante. O CO<sub>2</sub> que participa ativamente no metabolismo microbiano, principalmente como produto de respiração é monitorado para a avaliação da atividade metabólica do microorganismo.

*E. coli* linhagem ATCC 25922, cedida pelo laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP foi utilizada.

Os compostos **I a-h** foram adicionados a várias concentrações a um meio de cultura líquido contendo *E. coli* e o monitoramento de CO<sub>2</sub> foi feito a cada 10 minutos por análise de injeção de fluxo e a inibição da atividade microbiana foi obtida em relação ao controle (meio de cultura *E. coli* sem droga). Foram feitos então os gráficos de porcentagem de inibição microbiana (no tempo 60 minutos) versus concentração e obteve-se valores de ID<sub>50</sub> (dose que inibe em 50% da atividade microbiana), (**Tabela 6**).

Tabela 6: Toxicidade Aguda *E. coli* de E/Z I a-h

Composto (X)	EC <sub>50</sub> /1 hora μM
Ia - Cl	19.1
Ib - H	12.8
Ic - OCH <sub>3</sub>	10.7
Id - NO <sub>2</sub>	5.7
Ie - CH <sub>3</sub>	4.4
If - Br	24.0
Ig - I	28.0
Ih- SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	110.0
Nifurtimox	35.0

Pela **tabela 6** pode-se observar que o composto 3 - [4'- bromo- (1,1' - bifenil) - 4 - il] - 3- (4 - metilsulfonilfenil) - N,N - dimetil-2-propeno-1-amina **Ih** apresentou-se consideravelmente menos tóxico (110 μM) que os outros derivados de 3-amino propeno, seguido dos halogênios derivados iôdo, bromo e cloro e os derivados metila **Ie**, e nitro **Id** sendo os mais tóxicos da série estudada. Os derivados de 3-aminopropeno mostraram maior toxicidade que nifurtimox, com exceção do derivado metilsulfonil **Ih**.

Estes testes de toxicidade aguda foram bastante úteis para uma avaliação prévia da faixa de concentração que deveria ser inicialmente utilizada nos estudos de citotoxicidade, uma vez que estes testes são mais laboriosos e demorados.

Os resultados aqui apresentados (**Tabela 6**) serão posteriormente discutidos nos estudos de correlações entre estrutura química e atividade biológica (**item 3.5**).

### 3.3.3 Citotoxicidade

- **Análise da proliferação celular pelo método do conteúdo total de proteínas**

Os testes de citotoxicidade foram feitos no Laboratório de Cultura de Células, Instituto de Biologia, UNICAMP, sob a orientação da Professora Marcela Haun.

A avaliação da citotoxicidade dos compostos **I a-h** foi feita pelo método de proliferação relativa ou conteúdo total de proteínas descrito na literatura (Haun *et alii*, 1992).

Células do tipo fibroblástico, da linhagem estabelecida em cultura V79, oriunda de pulmão de Hamster Chinês e cedidas pelo Professor Rogério Meneghini, Instituto de Química, USP, S.P, foram utilizadas.

As células foram expostas a diferentes concentrações dos compostos **I a-h**. O conteúdo de DNA foi medido pela absorvância a 260 nm onde 50 µg/mL possui uma absorvância em 260 nm de 1.0.

O crescimento relativo das amostras tratadas com os compostos **I a-h** foram expressas em porcentagem com relação ao controle sem tratamento com as drogas nas mesmas condições experimentais.

Os valores de ID<sub>50</sub> (dose que inibe em 50% o crescimento celular), foram obtidos graficando-se os valores de proliferação relativa das células versus concentração das drogas e encontram-se relacionados na **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Citotoxicidade de E/Z I a-h pelo método do conteúdo total de proteínas

Composto I	ID <sub>50</sub> / 24 horas μM
Ia - Cl	10.0
Ib - H	8.6
Ic - OCH <sub>3</sub>	7.0
Id - NO <sub>2</sub>	9.2
Ie - CH <sub>3</sub>	7.1
If - Br	10.8
Ig - I	11.3
Ih - SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	48.0
Nifurtimox	300.0

O composto metilsulfonil derivado de 3-amino propeno **Ih** apresentou menor toxicidade da série estudada sobre proliferação celular. O valor de ID<sub>50</sub> = 48 μM encontrado para este derivado difere consideravelmente dos outros derivados com ID<sub>50</sub> entre 7.0 e 11.3 μM. Estes resultados são concordantes com os testes de toxicidade aguda em *E. coli* (item 3.3.2) onde o composto **Ih** (ID<sub>50</sub> = 110 μM) também se apresentou bem menos tóxico que os outros derivados.

De acordo com a **Tabela 7** observa-se que nifurtimox a droga utilizada para o tratamento da doença de Chagas, apresentou uma toxicidade muito menor ID<sub>50</sub> (300 μM) (Melo, 1996) que os derivados de 3-amino propeno, nas mesmas condições experimentais.

É conhecido entretanto que nifurtimox é altamente tóxico, apresentando severos efeitos colaterais. Os efeitos citotóxicos de nifurtimox em *T. cruzi* são mediados pela formação de produtos de redução do oxigênio através do chamado ciclo-redox. A redução do nifurtimox ao nitroânion seguida pela autooxidação deste radical com a geração de espécies ativas de oxigênio tais como ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) são também responsáveis pelos efeitos tóxicos causados por esta droga (Do Campo, 1990).

Em cultura de células estão ausentes os processos de distribuição e metabolização de drogas. Portanto para se avaliar adequadamente a citotoxicidade do nifurtimox sobre células V79 deve-se fazer uma pré-incubação com microsomas, NADPH (nicotinamida adenina difosfato reduzida) e o nifurtimox ou então utilizar cultura de hepatócitos (culturas primária). Os metabolitos gerados nesta incubação devem então ser testados sobre células V79 e poderão então apresentar uma toxicidade maior, confirmando assim dados da literatura que declaram que o nifurtimox é uma droga mutagênica e apresenta alta toxicidade "in vivo"(Melo, 1996).

#### • **Investigação do mecanismo de toxicidade celular**

A citotoxicidade dos compostos não substituído **Ib**, nitro **Id** e metilsulfonil **Ih**, foi também avaliada pelo método de incorporação do corante vermelho neutro (VN) e pelo método da inibição da redução do sal de tetrazólio (MTT) em adição ao método da dosagem do conteúdo total de proteínas ou proliferação relativa (PR) discutido acima.

Estes métodos são bastante úteis na avaliação da integridade celular e fornecem informações sobre as funções metabólicas celulares. O método da avaliação do conteúdo total de proteínas ou da determinação do DNA avalia a capacidade proliferativa das células (PR)(Knox *et alii* , 1986). O método da redução do MTT avalia o funcionamento correto da mitocôndria através da redução enzimática do sal de tetrazólio (MTT) pela desidrogenase mitocondrial de células vivas (Denizot e Lang, 1986). No método da incorporação do corante vermelho neutro (VN) a integridade lisossomal é avaliada uma vez que mede a capacidade das células vivas `a incorporar o corante vermelho neutro em seus lisossomas (Forsby *et alii* , 1991).

Em estudos toxicológicos de novos compostos com mecanismos de ação desconhecido recomenda-se que os três métodos sejam utilizados devido a grande importância de se investigar os efeitos tóxicos em diferentes organelas celulares (Renzi *et alii* , 1993).

Nos estudos de investigação do mecanismo de toxicidade celular pelos tres diferentes métodos, o composto **Ih** (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) foi utilizado pois este derivado apresentou menor toxicidade pelo método de proliferação relativa (PR) em células V79 fibroblásticas de Hamster Chinês e em bactérias *E. coli*. O composto não substituído **Ib** (H), foi um dos que apresentaram maior

atividade tripanocida da série estudada e portanto nos pareceu interessante estudar mais detalhadamente este derivado. O derivado nitro **Id** por diferir em seu mecanismo de ação tripanocida dos outros derivados estudados, decidimos investigar o mecanismo de toxicidade celular deste composto. O estudo do mecanismo de ação tripanocida do composto nitro (**Id**) será apresentado no **item 3.4**.

Nos testes de incorporação do corante vermelho neutro (VN) a citotoxicidade foi determinada pela medida do VN captado pelos lisossomas das células, detectada através da medida de absorbância a 540 nm. A captação relativa de VN pelas células tratadas com os compostos **Ib**, **Id** e **Ih** a várias concentrações em relação ao controle (sem tratamento com as drogas), foram graficados em função das concentrações. Os valores de ID<sub>50</sub> foram obtidos das curvas dose-resposta e indicam a concentração do material teste que induz uma redução de 50% na incorporação do corante vermelho neutro.

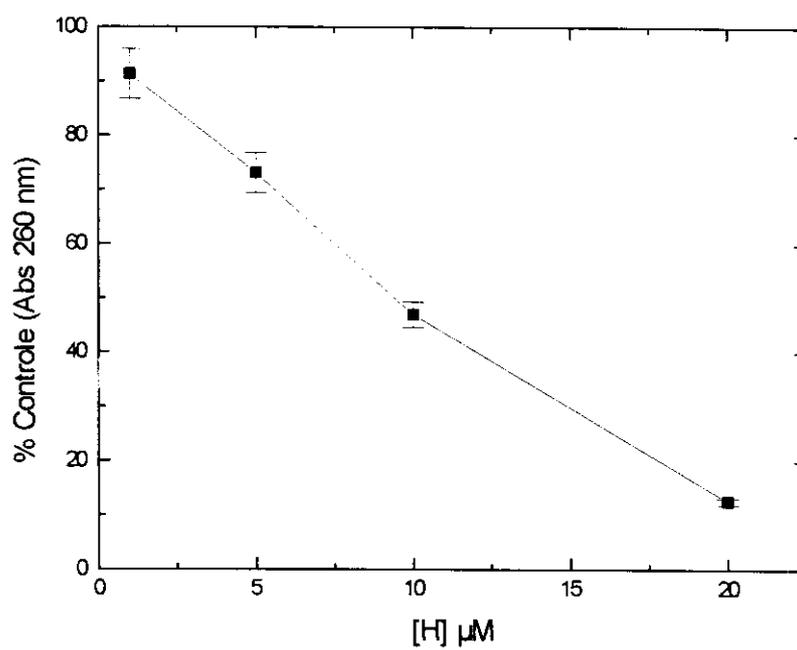
A citotoxicidade pelo método do MTT foi avaliada pela inibição da redução do sal de tetrazólio pelas células, detectada pela medida da absorbância em 570 nm, após solubilização do formazan. Os valores obtidos expressam a inibição da redução do MTT pelas amostras contendo os compostos **Ib**, **Id** e **Ih** a várias concentrações em relação ao controle sem tratamento com os compostos. Os valores de ID<sub>50</sub> obtidos dos gráficos tipo dose-resposta, expressam a concentração do material teste que inibe em 50% a redução do MTT.

Células V79 fibroblásticas de Hamster Chinês foram utilizadas nos experimentos.

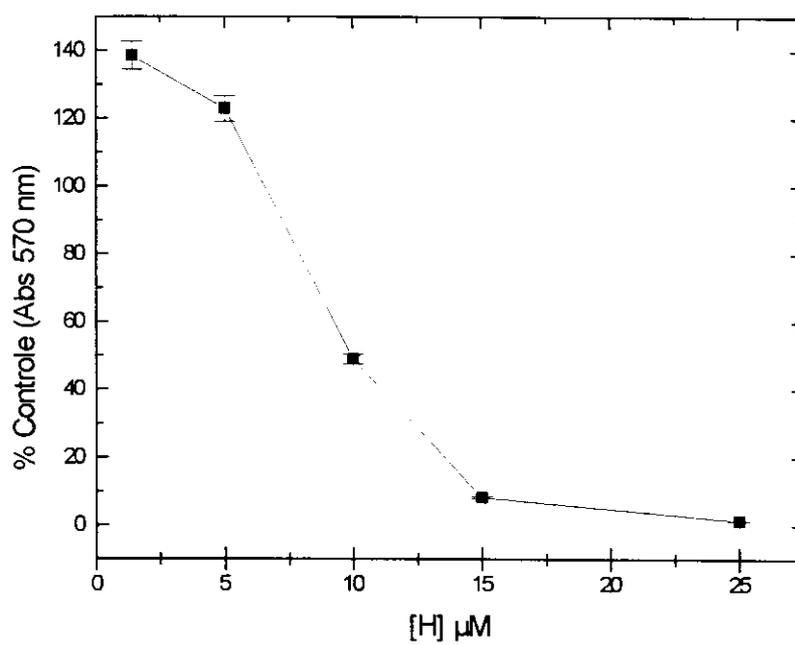
A seguir serão apresentadas as curvas dose-resposta obtidas pelos três diferentes métodos de avaliação de citotoxicidade dos compostos não substituídos, nitro e metilsulfonil derivado de 3-aminopropeno.

As Figuras 13, 14 e 15 mostram que para o composto **Ib** não substituído os valores de ID<sub>50</sub> foram 8.6, 10 e 4.9  $\mu$ M pelos métodos de proliferação relativa, redução do sal de tetrazólio e captação dos corantes vermelho neutro, respectivamente.

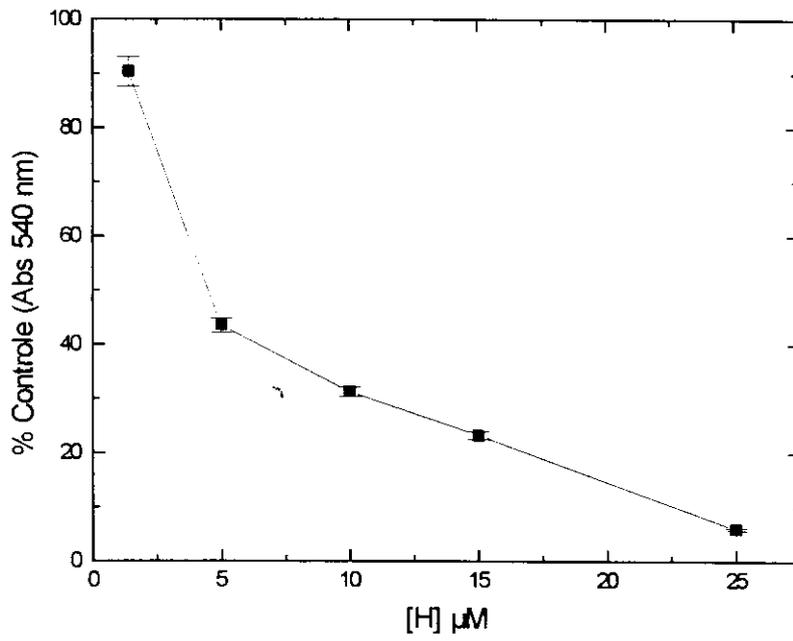
Foram observados valores de ID<sub>50</sub> semelhantes para os dois primeiros métodos porém um valor mais baixo ( $\cong$  2 vezes) de ID<sub>50</sub> foi obtido pelo método da captação do corante vermelho neutro.



**Figura 13:** Citotoxicidade de Ib: Proliferação Celular Relativa (PR)



**Figura 14:** Citotoxicidade de Ib: Redução do Sal de Tetrazólio (MTT)



**Figura 15:** Citotoxicidade de Ib: Incorporação do Vermelho Neutro (VN)

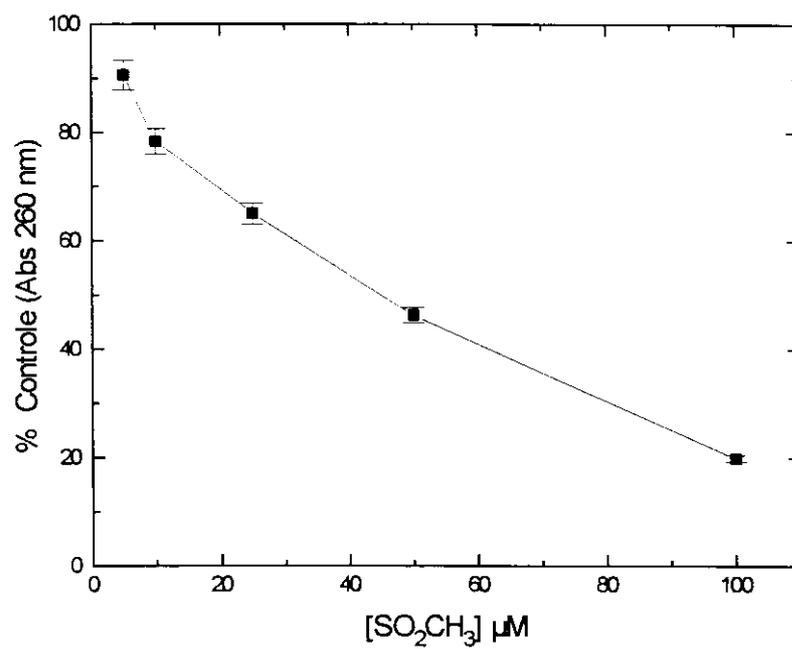
Na **Figura 16** pelo método de proliferação relativa foi encontrado para o derivado metilsulfonil **If** um valor de  $ID_{50}$  de 48  $\mu\text{M}$  e no método da redução do sal de tetrazólio um valor de  $ID_{50}$  de 40  $\mu\text{M}$  (**Figura 17**). Novamente um valor inferior de  $ID_{50} = 20$  ( $\mu\text{M}$ ) foi obtido quando a citotoxicidade foi avaliada pelo método da captação do corante vermelho neutro pelos lisossomas de células viáveis (**Figura 18**).

As curvas dose-resposta (**Figuras 19, 20 e 21**) obtidas na avaliação da citotoxicidade do derivado nitro de 3-aminopropeno (**Id**) mostram valores de  $ID_{50}$  de 9.2, 7.5 e 5.8  $\mu\text{M}$  pelos métodos de proliferação relativa, redução do sal de tetrazólio e captação do corante vermelho neutro, respectivamente. Novamente o método do VN foi o que apresentou menor valor de  $ID_{50}$ .

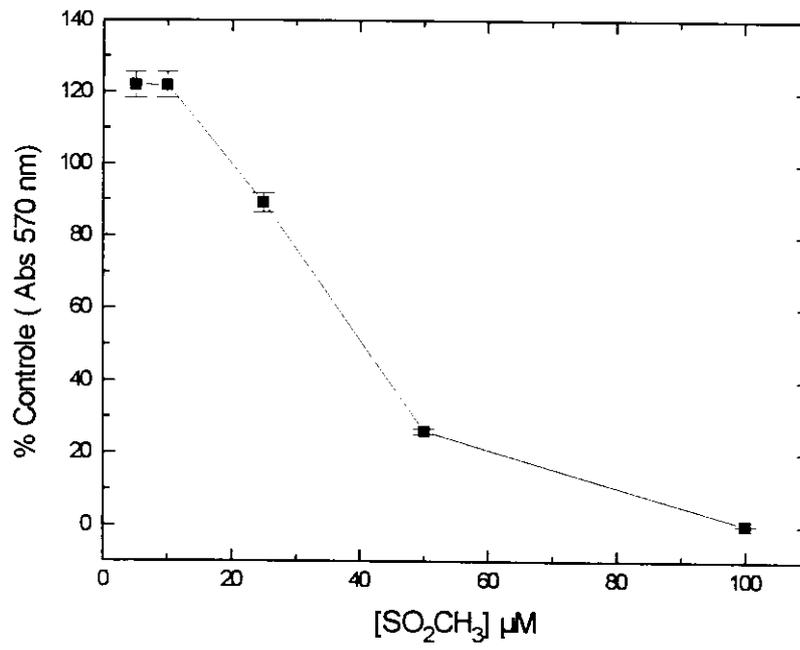
Compostos anfífilos os quais possuem uma região hidrofóbica e um grupamento amino primário ou substituído podem induzir lipidose, provavelmente como consequência da interação com fosfolípidos, desestabilizando estruturas de membrana e se acumulando no lisossomas. Estes compostos são denominados lisossomatrópicos (Doyle e Weinbach, 1989).

Compostos químicos se acumulam em diferentes organelas celulares em graus variados. Um grande acúmulo da droga dentro das células indica que o composto em questão pode penetrar facilmente nas células tendo acesso às superfícies de membranas intracelulares. Em compostos anfífilos a velocidade de penetração depende principalmente do  $pK_a$  do grupo amino e do grau de hidrofobicidade da molécula como um todo. Quando o grupamento amino não está protonado a interiorização da molécula é bastante pronunciada. Se a apolaridade da molécula é bastante pronunciada, mesmo a forma protonada não impedirá a entrada da molécula através da plasmalema (Lüllmann *et alii*, 1976).

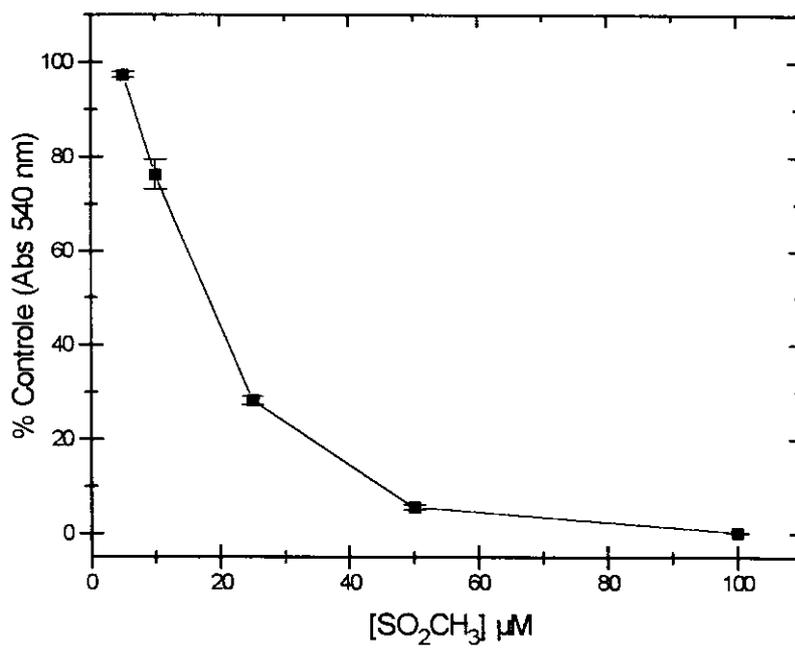
Intracelularmente compostos anfífilos não se distribuem igualmente nos diferentes compartimentos celulares devido a diferenças de afinidade destes compostos por diferentes organelas. Nestes casos, particular atenção se dá aos lisossomas que são vesículas de membranas limitadas que se distinguem pela concentração elevada não usual de prótons intravesiculares ( $pH \cong 4.5$ ). As aminas anfífilas quando entram nos lisossomas são protonadas devido ao seu ambiente ácido. Dentro dos lisossomas estes compostos formam complexos com lípidos polares e isto favorece um influxo de água devido à pressão osmótica e conseqüentemente podem levar a um aumento dos lisossomas das células (Lüllmann *et alii*, 1978).



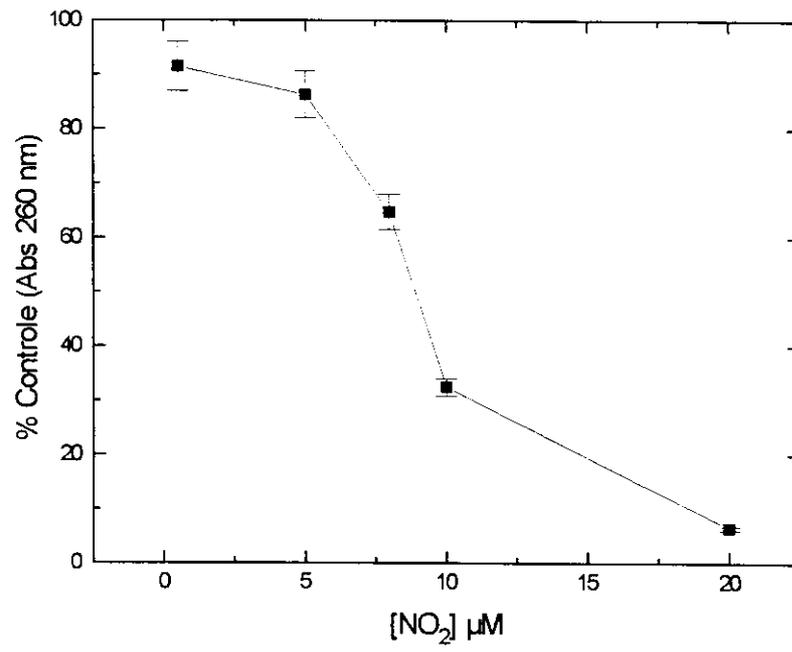
**Figura 16:** Citotoxicidade de Ih: Proliferação Celular Relativa (PR)



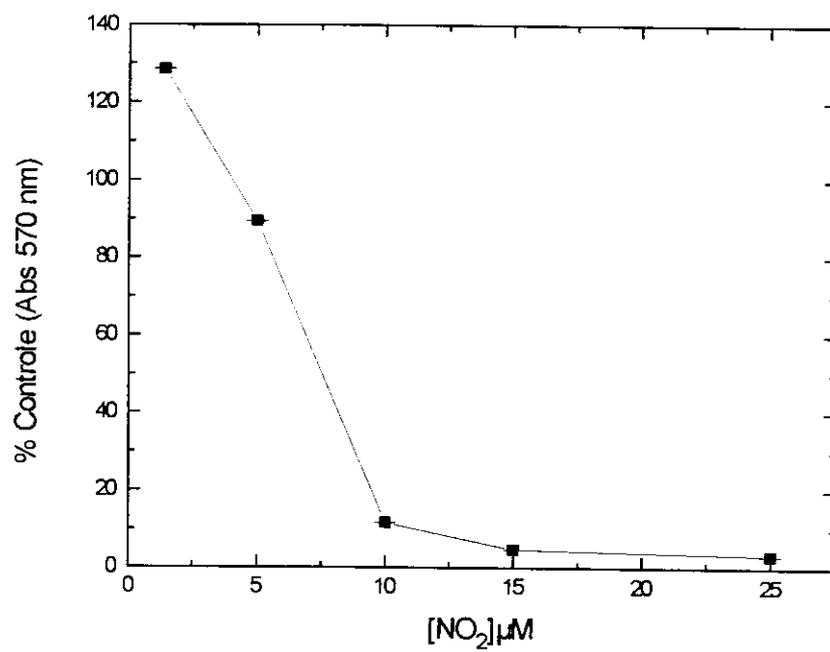
**Figura 17:** Citotoxicidade de 1h: Redução do Sal de Tetrazólio (MTT)



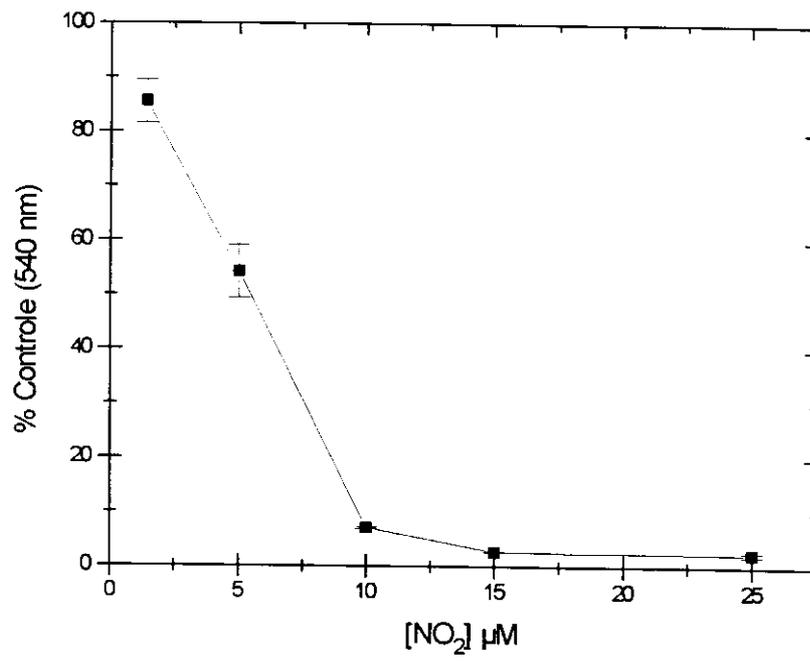
**Figura 18:** Citotoxicidade de 1h: Incorporação do Vermelho Neutro (VN)



**Figura 19:** Citotoxicidade de Id: Proliferação Celular Relativa (PR)



**Figura 20:** Citotoxicidade de Id: Redução do Sal de Tetrazólio (MTT)



**Figura 21:** Citotoxicidade de Id: Incorporação do Vermelho Neutro (VN)

Nos lisossomas um segundo evento acontece. A complexação entre drogas anfífilas e lipídeos polares resultam num acúmulo de lipídeos dentro dos lisossomas por dois mecanismos diferentes: a) um gradiente de lipídeos polares é mantido do citosol para os lisossomas e b) o complexo droga-lipídeo não pode mais ser degradado enzimaticamente por fosfolipases.

Compostos lisossomatrópicos podem agir de três formas diferentes. Os compostos permanecem nos lisossomas e agem alterando o meio intralisossomal, podem também modificar as propriedades da membrana lisossomal ou ainda apresentar uma variedade de efeitos extralisossomais, por interação com outras organelas celulares (Duve *et alii*, 1974).

A principal função dos lisossomas nas células é a digestão intracelular, mas também apresenta importante função fisiológica de processos regulatórios, mecanismo de defesa celular, acúmulo e sequestro de xenobióticos etc... (Repetto e Ganz, 1993).

O acúmulo intralisossomal foi demonstrado para várias aminas anfífilas e entre elas estão principalmente os antidepressivos tricíclicos tais como clomipramina e imipramina, a cloroquina com atividade antimalárica, zimelidina (um antidepressivo que foi retirado do mercado por apresentar efeitos colaterais severos), induzindo lipidose e apresentando neurotoxicidade. Também outras drogas as quais apresentam pronunciado efeito de acúmulo intralisossomal em cultura de células porém apresentam baixa indução de lipidosis em humanos tais como clorpromazina, amitriptilina e outros (Lüllmann, 1978).

O método da captação do corante vermelho neutro, avalia a atividade lisossomal das células viáveis e a maior seletividade deste método encontrada nos testes de citotoxicidade aqui apresentados pode estar associada ao caráter anfílico dos compostos derivados de 3-aminopropeno em estudo.

A capacidade destes compostos se ligarem a mucopolissacarídeos ácidos que são transportados dentro dos lisossomas das células pode estar alterando o funcionamento normal desta organela celular, levando a maior toxicidade destes compostos apresentado pelo método do VN, o que não é avaliado nos métodos MTT e PR.

Os três diferentes métodos de avaliação de citotoxicidade utilizados neste trabalho apresentam informações sobre o funcionamento correto de diferentes organelas celulares. Os resultados obtidos, mostraram a

importância de se utilizar os três diferentes métodos afim de se obter informações sobre o mecanismo de ação tóxica de novos compostos químicos.

Estes estudos mostraram também que devido ao seu caráter anfifílico existe a possibilidade de que estas drogas possam induzir lipidose e portanto a investigação do mecanismo de ação tóxica destes compostos devem ser continuados

. Também sistemas *in vitro* nos quais os processos de metabolismo estão presentes devem ser utilizados.

### 3.4 Investigação do mecanismo de ação de 3-[4'-bromo-(1,1'-bifenil)-4il-3-(4-nitrofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Id

Desde os estudos de Hoppe-Seyler em 1883 sabe-se que em organismos vivos as substâncias nitradas são reduzidas em seu grupo nitro. Os produtos resultantes destas reduções são facilmente oxidados pelo oxigênio com a formação de radicais livres, alguns deles sendo bastante tóxicos (Stoppani, 1983).

Os principais mecanismos de defesa contra espécies ativas de oxigênio em organismos superiores são as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase e o chamado glutaciona ciclo-redox que envolve as enzimas glutaciona redutase (GR) e glutaciona peroxidase (GP)(Schimer *et alii* , 1995; Do Campo, 1990).

Um dos aspectos nos quais *T. cruzi* difere do hospedeiro mamífero é na deficiência do mecanismo de defesa contra espécies ativas de oxigênio. As enzimas de defesa SOD, catalase e glutaciona peroxidase tem ampla ocorrência nos tecidos de mamíferos mas parecem ausentes nos protozoários. No *T. cruzi* o mecanismo de defesa contra espécies ativas de oxigênio incluem a SOD e tripanotiona redutase. Entretanto a atividade SOD é baixa em comparação com células de mamíferos.

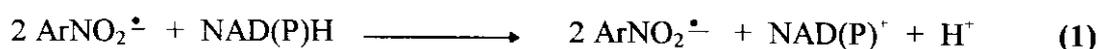
Nifurtimox (**1**) a droga mais efetiva no tratamento da doença de Chagas apresenta mecanismo de ação tripanocida através da formação de espécies ativas de oxigênio (Do Campo, 1990).

No *T. cruzi* , concentrações farmacológicas de nifurtimox (**1**) são capazes de gerar produtos de redução parcial do oxigênio tais como ânion superóxido  $O_2^{\cdot -}$  e água oxigenada  $H_2O_2$ . O primeiro passo desta série de reações é a transferência de um elétron do redutor NADPH ao grupo nitro

**(reação 1).** O segundo passo consiste na transferência do elétron livre ao oxigênio regenerando o nifurtimox e formando o ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$  **(reação 2)**. O  $O_2^{\cdot-}$  dismuta a água oxigenada  $H_2O_2$  espontaneamente ou pela ação da superóxido dismutase (SOD) **(reação 3)**. Por último a **reação 4** catalisada por ferro, produz o radical hidroxila  $OH^{\cdot}$  que é muito tóxico. **(esquema 2)**(Stoppanni, 1983).

Estas reações são comuns tanto no *T. cruzi* como no hospedeiro mamífero (Do Campo, 1990).

Esquema 2: Mecanismo de redução cíclica e autooxidação de nifurtimox (1)



Neste trabalho foi feito um estudo comparativo de nifurtimox e 3-[4'bromo-(1,1'-bifenil)-4il-3-(4-nitrofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina **Id**, de geração de espécies ativas de oxigênio, pelos métodos de consumo de  $O_2$  e quimioluminescência por microsomas de fígado de camundongo, descritos na literatura (Do Campo *et alii*, 1981).

#### • Consumo de $O_2$

Os compostos nifurtimox e nitro derivado de 3-amino propeno foram adicionados em várias concentrações no tempo zero à mistura contendo microsomas (15 mg proteína/ml) e tampão fosfato 20 mM, pH = 7.4 e NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) 0.5 mM.

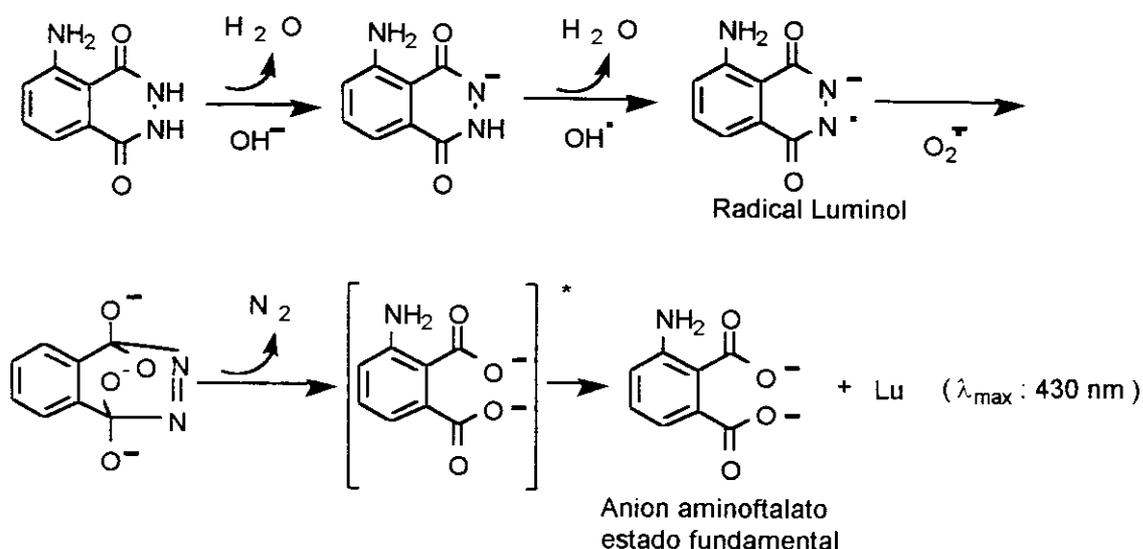
O consumo de  $O_2$  foi medido em um monitor de oxigênio usando eletrodo Clark, em um meio contendo tampão fosfato 20 mM pH = 7.4 e cloreto de potássio 130 mM à 25°C. O consumo de  $O_2$  versus o tempo foi então graficado.

Através das **figuras 22 e 23** observa-se um aumento no consumo de  $O_2$  induzido pelos compostos nifurtimox e nitro derivado de 3-amino propeno **Id**.

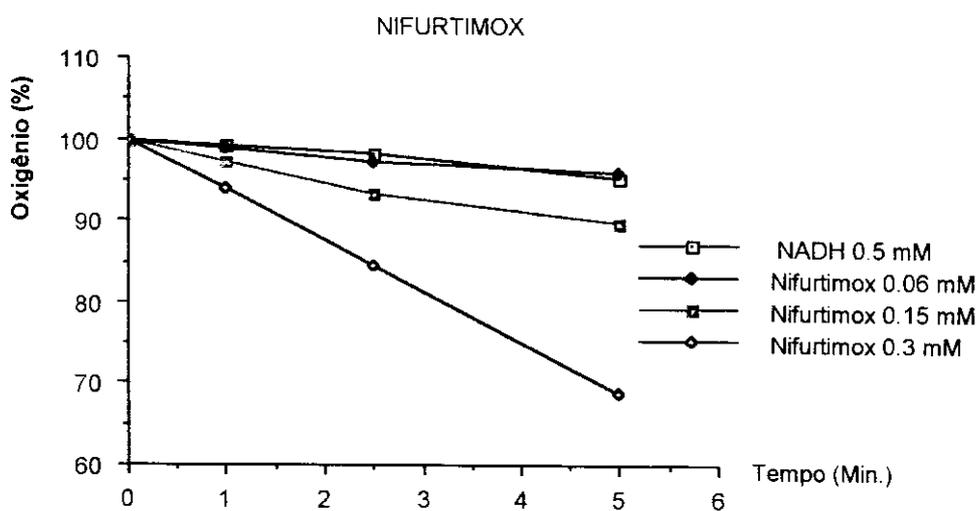
### • Quimioluminescência

O método de quimioluminescência com luminol no sistema contendo microsossoma e NADH foi utilizado na avaliação da geração das espécies ativas de oxigênio pelos compostos nifurtimox e nitro derivado de 3-amino propeno **Id**. No **esquema 3**, está apresentado o mecanismo da quimioluminescência na presença de luminol (Adam e Cilento, 1982).

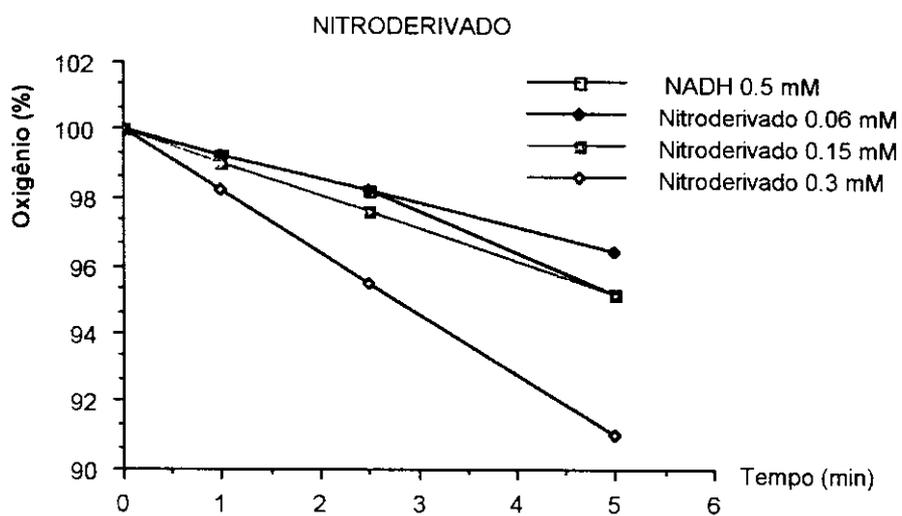
**Esquema 3:** Mecanismo de quimioluminescência com luminol



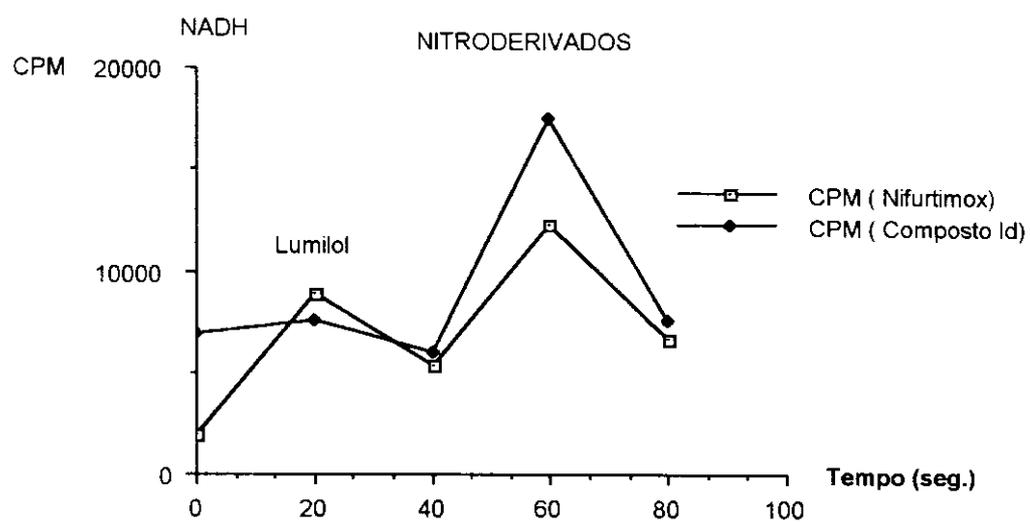
A mistura contendo microsossoma de fígado de camundongos (15 mg proteína/ml) e tampão fosfato 20 mM, pH = 7.4 foi adicionado NADH (0.5 mM) no tempo zero seguido da adição de luminol e dos compostos nifurtimox (0.3 mM em dimetilsulfóxido) e nitro derivado **Id** (0.3 mM em dimetilsulfóxido) (**ver figura 24**).



**Figura 22:** Consumo de O<sub>2</sub> em presença de microsossoma nifurtimox



**Figura 23:** Consumo de O<sub>2</sub> em presença de microsossoma - composto nitroderivado Id

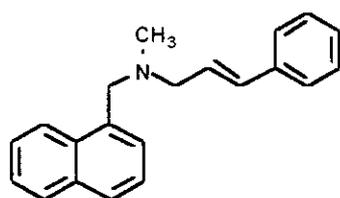


**Figura 24:** Quimioluminescência na presença de luminol (sistema microssoma/NADH/ nitrocompostos)

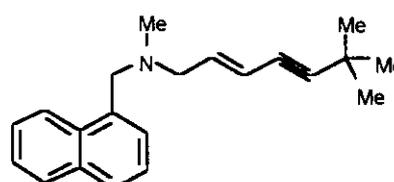
O método da quimioluminescência mostrou que estas espécies radical hidroxila e ânion superóxido realmente estão envolvidas no processo de redução biológica.

Através destes estudos pelos métodos do consumo de  $O_2$  e quimioluminescência pode-se observar um aumento no fluxo de elétrons de NADH a oxigênio molecular e geração de ânion superóxido pelo composto **Id** e nifurtimox. Isto sugere que o derivado nitro de 3-amino propeno **Id** apresenta mecanismo de ação tripanocida similar ao do nifurtimox, envolvendo geração de ânion superóxido,  $H_2O_2$  e espécies relacionadas, via mecanismo de redução cíclica e auto-oxidação. Quando estudado o composto não substituído **Ib** não foram observados estes intermediários.

Agentes antimicóticos derivados de alilaminas tais como naftina (**6**) e terbinafina (**7**)



naftina (**6**)  
(Exoderil)



terbinafina (**7**)  
(Lamisil)

inibem a proliferação de fungos e protozoários pela interferência na biosíntese do ergosterol, um esteróide essencial presente nas células deste tipo de organismo. Estes compostos inibem a biosíntese do ergosterol, pela inibição da enzima esqualeno epoxidase acarretando um acúmulo de esqualeno intracelular. O mecanismo de ação tripanocida destes compostos também se dá através da inibição da biosíntese do ergosterol. Estudos de estrutura química e atividade biológica com estas alilaminas e derivados indicaram que o átomo de nitrogênio terciário, a dupla ligação e o anel naftalênico-1-substituído são de grande importância na atividade biológica destes compostos. ( Stutz *et alii* , 1986; Stutz, 1987; Abe *et alii* , 1994; Adamns *et alii*. 1993).

Uma vez que os derivados de 3-aminopropeno estudados apresentam similaridades estruturais a naftina e terbinafina, a hipótese de que estes

compostos possam apresentar mecanismo de ação tripanocida pela inibição da biosíntese do ergosterol, deve ser investigada. Estudos neste sentido estão em andamento no nosso grupo e indicam preliminarmente que este seria o possível mecanismo de ação tripanocida destes compostos.

### 3.5 Estudos preliminares de correlações entre estrutura química e atividade biológica

O método de Hansch foi utilizado nos estudos de correlações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica (QSAR) para a série de congêneros estudada neste trabalho.

Correlações lineares foram feitas utilizando-se como parâmetros estruturais as constantes de efeitos eletrônicos ( $\sigma_p$ , F e R), estéricos (MR e L) e hidrofóbicos ( $\pi$ ) dos substituintes. Os parâmetros biológicos analisados foram a atividade tripanocida, toxicidade aguda em *E. coli* e citotoxicidade em culturas de células V79.

Relações entre estrutura química e uma atividade biológica específica são causadas por várias interações físico-químicas diferentes. Interrelações entre os parâmetros físico-químicos analisados em estudos de QSAR podem dificultar a análise final dos resultados. Na existência de colinearidade entre os parâmetros testados, é difícil de se distinguir quais propriedades físico-químicas são responsáveis pela atividade biológica estudada. Para resolver este problema, Hansch propôs o uso de matrizes de correlações para se avaliar colinearidades entre os parâmetros testados em estágios preliminares dos estudos de QSAR (Hansch e Unger, 1973).

A matriz de correlação entre os parâmetros físico-químicos estudados ( $\sigma_p$ , F, R, MR, L e  $\pi$ ) para os substituintes cloro, hidrogênio, metoxila, nitro, metila, bromo, iodo e metilsulfonil foi elaborada (**Tabela 9**).

**Tabela 9:** Matriz de Correlações

	$\sigma_p$	F	R	MR	L	$\pi$
$\sigma_p$	1	0.82	0.82	0.42	0.33	0.52
F		1	0.36	0.61	0.67	0.28
R			1	0.54	0.13	0.58
MR				1	0.92	0.16
L					1	0.14
$\pi$						1

A matriz de correlações mostra que somente os parâmetros físico-químicos dos substituintes que contam com o mesmo tipo de efeito eletrônico (F, R e  $\sigma_p$ ) e estéricos (MR, L) são colineares, e portanto para esta série de congêneros estudadas os substituintes fornecem boa discriminação entre os parâmetros eletrônicos, estéricos e hidrofóbicos.

Utilizando-se os dados da **tabela 5**, foram inicialmente correlacionados os parâmetros biológicos de atividade tripanocida (ID<sub>50</sub>) - formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* - dos compostos **I a-h**, com as constantes  $\sigma_p$ , F, R, MR, L e  $\pi$  dos substituintes.

As equações de correlações obtidas não foram estatisticamente significativas pois apresentaram coeficientes de correlação muito pequenos variando entre  $r \cong 0.1-0.5$ . A melhor equação de correlação encontrada nestes estudos conta com o efeito indutivo de campo F do substituinte na atividade tripanocida em formas amastigotas de *T. cruzi* **Equação 8**.

$$\log 1 / \text{ID}_{50} = -2.10 + 0.46 F \quad (\text{Eq. 8})$$

$$r = 0.51 \quad \text{sd} = 0.23 \quad n = 8 \quad p = 0.20$$

Uma das condições mais importantes nos estudos de QSAR é se trabalhar com compostos congêneros os quais apresentam o mesmo mecanismo de ação.

O composto **Id** foi excluído das análises de correlação pois compostos nitro derivados são facilmente reduzidos em sistemas biológicos. O composto nitro derivado de 3-amino propeno atua diferentemente dos outros derivados em seu mecanismo de ação, através da formação de espécies ativas de oxigênio (**Ver item 3.4**).

Eliminando o grupo nitro das correlações, as equações apresentaram melhores coeficientes porém equações não significativas foram novamente encontradas. A equação que conta com o efeito indutivo de campo F do substituinte para a forma AMA de *T. cruzi* foi também a melhor correlação obtida **Equação 9**.

$$\log 1 / ID_{50} = -2.11 + 0.46 F \quad (\text{Eq. 9})$$

$$r = -0.60 \quad sd = 0.19 \quad n = 7 \quad p = 0.15$$

Informações sobre as propriedades físico-químicas que estão associadas com a atividade tripanocida desta série de congêneros não foram obtidas com estes estudos de QSAR.

O método de Hansch por análise de regressão linear entre toxicidade aguda em *E. coli* (**Tabela 6**) e os parâmetros eletrônicos (F, R e  $\sigma_p$ ), estéricos (MR e L) e hidrofóbicos ( $\pi$ ) dos substituintes foi empregado. Dentre os parâmetros estruturais analisados somente o parâmetro de efeito eletrônico de Hammett  $\sigma_p$  apresentou equação de correlação significativa ao se excluir o derivado nitro das correlações (**Eqs. 10 e 11**).

$$\log 1 / ID_{50} = 1.96 - 0.36 \sigma_p \quad \text{com NO}_2 \quad (\text{Eq. 10})$$

$$r = -0.42 \quad sd = 0.37 \quad n = 8 \quad p = 0.29$$

$$\log 1 / ID_{50} = 3.42 - 0.69 \sigma_p \quad \text{sem NO}_2 \quad (\text{Eq. 11})$$

$$r = -0.93 \quad sd = 0.14 \quad n = 7 \quad p = 0.003$$

A **equação 11** indica que grupos substituintes doadores de elétrons levam a um aumento na toxicidade aguda em *E. coli* desta série de compostos estudados.

Os valores de citotoxicidade  $ID_{50}$  (**Tabela 7**) foram também correlacionados com os parâmetros estruturais do substituinte  $\sigma_p$ , F, R, MR, L e  $\pi$  e a única equação de correlação estatisticamente significativa foi a que conta com o efeito eletrônico  $\sigma_p$  do substituinte quando o grupo nitro é excluído das correlações: **equação 13**.

$$\log 1 / ID_{50} = 4.44 - 0.85 \sigma_p \quad \text{com NO}_2 \quad (\text{Eq. 12})$$

$$r = -0.61 \quad sd = 0.33 \quad n = 8 \quad p = 0.11$$

$$\log 1 / ID_{50} = 5.35 - 1.10 \sigma_p \quad \text{sem NO}_2 \quad (\text{Eq. 13})$$

$$r = -0.92 \quad sd = 0.13 \quad n = 7 \quad p = 0.003$$

A **equação 13** mostra que grupos substituintes doadores de elétrons aumentam a citotoxicidade em culturas de células V<sub>79</sub> na série de congêneros.

Os estudos de QSAR mostraram que somente os efeitos eletrônicos do substituinte estão envolvidos na atividade biológica de citotoxicidade e toxicidade aguda em *E. coli* para esta série de congêneros estudada.

Os resultados dos estudos de QSAR foram bastante concordantes no que se refere aos dados toxicológicos analisados. Correlações lineares entre os parâmetros biológicos de toxicidade aguda em *E. coli* e citotoxicidade em culturas de células V<sub>79</sub> forneceram também equação de correlação altamente colineares **equações 14 e 15**.

$$\log 1/ID_{50} V_{79} = -2.42 + 1.46 \log 1/ID_{50} E. coli \quad \text{com NO}_2 \quad (\text{Eq. 14})$$

$$r = 0.89 \quad sd = 0.21 \quad n = 8 \quad p = 0.003$$

$$\log 1/ID_{50} V_{79} = -2.10 + 1.37 \log 1/ID_{50} E. coli \quad \text{sem NO}_2 \quad (\text{Eq. 15})$$

$$r = 0.91 \quad sd = 0.21 \quad n = 7 \quad p = 0.003$$

Apesar deste tipo de correlação interespecies não ser estritamente uma área de QSAR uma vez que a atividade biológica não está sendo correlacionada com aspectos físico-químicos da estrutura molecular mas sim com outra atividade

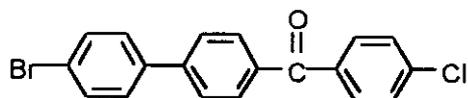
biológica, é bastante interessante. Em todas as áreas de toxicologia os dados não devem ser analisados isoladamente e portanto isto se aplica também na interpretação dos estudos de QSAR. Este tipo de correlações interespecies permitem se obter máxima informação dos resultados disponíveis e podem levar a predição da toxicidade para outras espécies biológicas ou ainda levar à redução do uso de organismos superiores para o estudo toxicológico de novos compostos químicos (Cronin e Dearden, 1995).

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

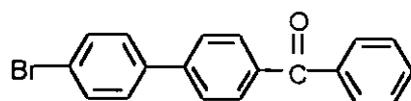
### 4.1 Procedimento geral para a preparação das cetonas II a-g

A uma solução contendo cloreto de ácido p-bromobenzóico (2.0 mmol), cloreto de alumínio (3 mmol) dissulfeto de carbono (4 mL), foi adicionado 4-bromobifenila (1.72 mmol). A solução foi refluxada por 8 horas e em seguida resfriada a 0 °C pela adição de gelo. O solvente foi evaporado e a mistura foi extraída com diclorometano (40 mL) e água (10 mL). A fase orgânica foi separada, lavada com solução de hidróxido de sódio 10% (20 mL), água (2 x 40 ml) e seca sob sulfato de magnésio. Após filtração, o solvente foi destilado sob pressão reduzida e um produto sólido obtido (**cetonas II a-g**) o qual foi subsequentemente recristalizado.

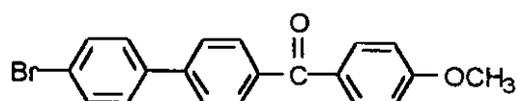
#### 4'-bromo-4-bifenil-p-clorofenil cetona (IIa)



- Tempo de reação: 7 horas
- Solvente de recristalização: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / hexano
- Rendimento: 79%
- Ponto de Fusão: 204 °C - Lit. 194 °C (Barret, 1976)
- U.V :  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 294 nm
- I.V (pastilha KBr): 3452 (estiramento C=O, overtone), 1643 (estiramento C=O) e 1558 (C=C aromático) cm<sup>-1</sup>
- M.S (m/z): 372 (M<sup>+</sup>, 85), 259 (60), 152 (100), 11 (28), 18 (28).
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.9 (d, 2H, aromático), 7.8 (d, 2H, aromático), 7.7 (d, 2H, aromático), 7.6 (d, 2H, aromático), 7.55 e 7.45 (2d, 4H, aromático) ppm.

4'-bromo-4-bifenil-fenil cetona (IIb)

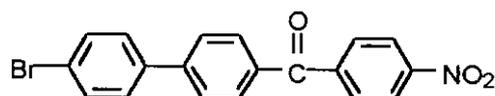
- Tempo de reação: 5 horas
- Solvente de recristalização: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / hexano
- Rendimento: 72%
- Ponto de Fusão: 156-57 °C - Lit. 155 °C (Bolton e Buley, 1977)
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 292 nm
- I.V (pastilha KBr): 3418 (estiramento C=O, overtone), 1644 (estiramento C=O) e 1596 (C=C aromático) cm<sup>-1</sup>
- M.S (m/z): 337 (M<sup>+</sup>, 100), 262 (72), 152 (39), 77 (29), 18 (21).
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.90-7.80 (2d, 4H, aromático), 7.70-7.60 (m, 5H, aromático) e 7.55-7.45 (m, 4H, aromático) ppm.

4'-bromo-4-bifenil-p-metóxfenil cetona (IIc)

- Tempo de reação: 8 horas
- Solvente de recristalização: benzeno
- Rendimento: 62%
- Ponto de Fusão: 219-20 °C
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 258 nm
- I.V (pastilha KBr): 3628 (estiramento C=O, overtone), 1638 (estiramento C=O), 1577 (C=C aromático) e 1261 (estiramento C-O) cm<sup>-1</sup>
- M.S (m/z): 368 (M<sup>+</sup>,12), 259(6), 152(32), 135(100),43(31).

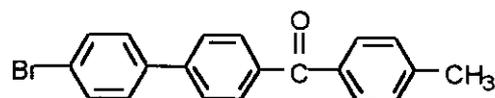
- $^1\text{H}$  RMN (80 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  8.10–7.10 (m, 7H, aromático), 6.90-7.00 (2d, 5H, aromático) 3.90 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) ppm.

4'-bromo-4-bifenil-p-nitrofenil cetona (II d)



- Tempo de reação: 7 horas
- Solvente de recristalização:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / hexano
- Rendimento: 75%
- Ponto de Fusão: 182-3  $^\circ\text{C}$
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 272 nm
- I.V (pastilha KBr): 3452 (estiramento C=O, overtone), 1646 (estiramento C=O), 1586 (C=C aromático), 1348 (estiramento N-O) e 850 (estiramento C-N)  $\text{cm}^{-1}$
- M.S (m/z): 383 ( $\text{M}^+$ , 99), 381 (100), 259 (88), 76 (17), 18 (96).
- $^1\text{H}$  RMN (80 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  8.40-8.20 (2d, 2H, aromático), 8.00-7.85 (m, 6H, aromático) 7.60-7.40 (m, 4H, aromático) ppm

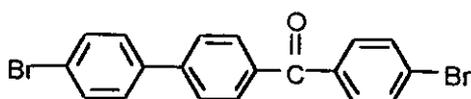
4'-bromo-4-bifenil-p-metilfenil cetona (II e)



- Tempo de reação: 7 horas
- Solvente de recristalização:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / hexano
- Rendimento: 82%
- Ponto de Fusão: 195  $^\circ\text{C}$
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 290 nm

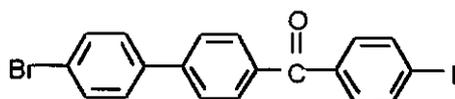
- I.V (pastilha KBr): 3429 (estiramento C=O, overtone), 1643 (estiramento C=O) e 1604 (C=C aromático)  $\text{cm}^{-1}$
- M.S (m/z): 352 ( $\text{M}^+$ , 98), 351 (20), 350 (100), 152 (36), 199 (38), 43 (18), 18 (81).
- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  7.90 (d, 2H, aromático), (7.75 (d, 2H, aromático), 7.70-7.60 (2d, 4H, aromático), 7.50 (d, 2H, aromático), 7.30 (d, 2H, aromático), 2.50 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

#### 4'-bromo-4-bifenil-p-bromofenil cetona (IIf)



- Tempo de reação: 5 horas
- Solvente de recristalização:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / hexano
- Rendimento: 68%
- Ponto de Fusão: 215  $^{\circ}\text{C}$
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 294 nm
- I.V (pastilha KBr): 3449 (estiramento C=O, overtone), 1643 (estiramento C=O) e 1581 (C=C aromático)  $\text{cm}^{-1}$
- M.S (m/z): 416 ( $\text{M}^+$ , 19), 414 (33), 260 (13), 149 (13), 58 (26), 43 (100).
- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  7.90 (d, 2H, aromático), 7.70-7.60 (m, 8H, aromático), 7.55 (d, 2H, aromático).

#### 4'-bromo-4-bifenil-p-iodofenil cetona (IIg)



- Tempo de reação: 7 horas

- Solvente de recristalização:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / hexano
- Rendimento: 80%
- Ponto de Fusão: 239 °C
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 290 nm
- I.V (pastilha KBr): 3418 (estiramento C=O, overtone), 1643 (estiramento C=O) e 1577 (C=C aromático)  $\text{cm}^{-1}$
- M.S (m/z): 310 ( $\text{M}^+$ , 11), 231 (7), 152 (13), 58 (22), 43 (100), 18 (29).
- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  7.90 (2d, 4H, aromático), 7.70-7.50 (m, 8H, aromático) ppm.

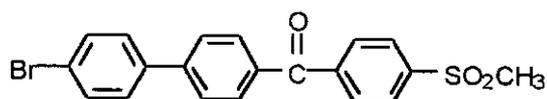
## 4.2 Preparação do cloreto de ácido p-nitrobenzóico

Cloreto de tionila (1 mL; 13.7 mmoles) foi adicionado ao ácido p-nitrobenzóico (0.5 g; 0.30 mmoles) e a mistura refluxada por 2 horas. O excesso de cloreto de tionila foi destilado a pressão reduzida. O produto bruto obtido foi recristalizado em hexano para fornecer um sólido cristalino amarelo, o qual foi identificado como cloreto de ácido p-nitrobenzóico, p.f = 74 °C (Lit. 72-4 °C - Aldrich).

## 4.3 Síntese de 4'-Bromo-4-bifenil-p-metil sulfonil cetona (IIh)

Ácido p-metil sulfonil benzóico (0.4 g; 1.98 mmol) e cloreto de tionila (2 ml) foram refluxados por 30 minutos. O excesso de cloreto de tionila foi destilado sob pressão reduzida e o produto sólido obtido (0.43 g; 1.98 mmol) foi dissolvido em nitrobenzeno (2 mL). A solução obtida foram adicionados cloreto de alumínio (0.27g; 2 mmol) e 4-bromo bifenila (0.39g; 1.70 mmol), sob agitação a temperatura ambiente. A solução foi refluxada por 7 horas e em seguida resfriada a 0 °C pela adição de gelo. A mistura foi extraída com diclorometano (20 mL), a fase orgânica separada, lavada com hidróxido de sódio 10% (5 mL), água (10 mL), purificada com carvão ativo e seca sob sulfato de magnésio. Após filtração, o solvente foi destilado sob

pressão reduzida. O óleo obtido foi cristalizado com etanol, obtendo-se 4'-bromo-4-bifenil-p-metilsulfonyl cetona (**IIIh**) como um sólido branco (0.25 g; 0.61mmol, R = 36% ), P.fusão 201.5-202 °C.



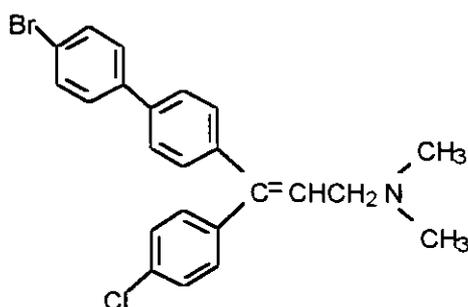
- U.V:  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 246 nm
- I.V (pastilha KBr): 3422 (estiramento C=O, overtone), 1648 (estiramento C=O), 1602 (C=C aromático), 1289 (estiramento S=O) e 1151 (estiramento C=S) cm<sup>-1</sup>
- M.S (m/z): 416 (M<sup>+</sup>, 19), 414 (33), 260 (13), 149 (13), 58 (26), 43 (100).
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  8.10 (d, 2H, aromático), 8.00 (d, 2H, aromático), 7.70 (d, 2H, aromático), 7.60 (d, 2H, aromático), 7.50 (d, 2H, aromático), 3.1 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

#### 4.4 Procedimento geral para a preparação dos derivados de 3-amino propeno Ia-h

A uma solução contendo brometo de  $\beta$ -dimetilamino etil trifetilfosfônio (2.15 mmol) em tetraidrofurano (12 mL), foi adicionado lentamente, sob atmosfera de argônio, uma solução 2.5 mM de n-butil lítio em hexano (2.21 mmol), mantendo-se a agitação e a temperatura a 0 °C. A mistura reacional foi agitada a temperatura de 0 °C, sob atmosfera inerte, por um período adicional de 30 minutos. Em seguida, adicionou-se lentamente a mistura reacional, a cetona intermediária (**II a-h**)(1.07 mmol). A solução foi agitada a temperatura ambiente por uma noite e a mistura extraída com diclorometano (20 mL) e água (2 x10 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 e

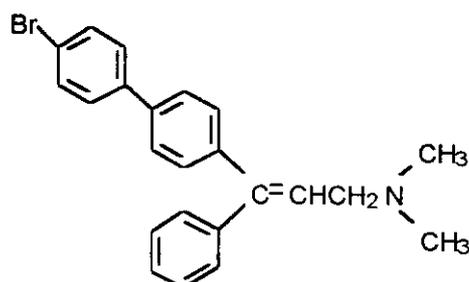
três frações principais foram obtidas e identificadas como cetona não reagida, óxido de trifenilfôsfina e o derivado de 3-amino propeno (compostos **I a-h**).

3-(4'bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (Ia)



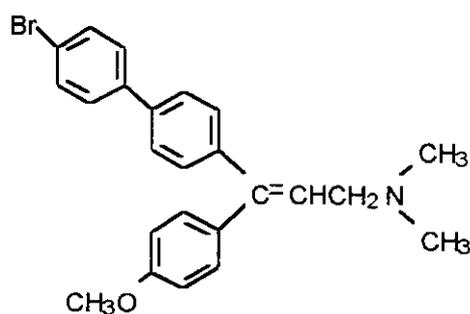
- Eluente de cromatografia: Hexano / éter / Et<sub>3</sub>N (8 : 2 : 1)
- Rendimento: 50%
- Ponto de Fusão: 115-20 °C
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 272 nm
- I.V (pastilha KBr): 1654 e 1634 (estiramento C=C olefina trissubstituída), 1168 (estiramento C-N) e 1487 (C=C estiramento aromático) cm<sup>-1</sup>
- M.S (m/z): 427 (M<sup>+</sup>, 47), 383 (13), 302 (49), 265 (36), 194 (76), 165 (40), 70 (100), 58 (91), 42 (55).
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.60 (m, 7H, aromático), 7.30-7.10 (m, 5H, aromático) 6.30 e 6.20 (2t, 1H, CH-trans e cis, J = 6.7 Hz), 3.10 e 3.00 (2d, 2H, CH<sub>2</sub>-cis e trans, J = 6.7 Hz), 2.35 (2s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

3-(4'bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (Ib)



- Eluente de cromatografia: Hexano / éter / Et<sub>3</sub>N (9 : 1 : 1)
- Rendimento: 60%
- Ponto de Fusão: 100-2 °C
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 276 nm
- I.V (pastilha KBr): 1654 e 1636 (estiramento C=C olefina), 1167 (estiramento C-N) e 1487 (C=C estiramento aromático) cm<sup>-1</sup>
- M.S (m/z): 392 (M<sup>+</sup>, 34), 314 (20), 268 (32), 252 (27), 160 (52), 91(59), 70(100), 58(93), 42(52)
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.55-7.35 (m, 8H, aromático), 7.25-7.55 (m, 5H, aromático), 6.25 e 6.15 (2t, 1H, CH-trans e cis, J = 6.7 Hz), 3.10-3.05 (2d, 2H, CH<sub>2</sub>-cis e trans, J = 6.7 Hz), 2.25 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

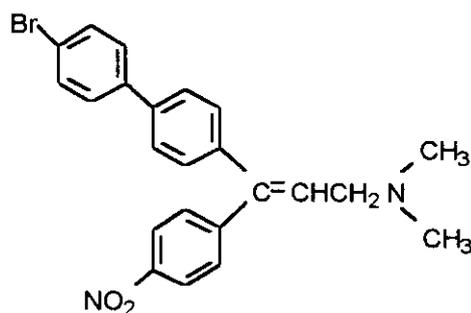
3-(4'bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-metóxfenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (Ic)



- Eluente de cromatografia: Hexano / éter / Et<sub>3</sub>N (9 : 1 : 1)
- Rendimento: 45%
- Ponto de Fusão: óleo

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 268 nm
- I.V (pastilha KBr): 1654 (estiramento C=C olefina), 1509 e 1480 (estiramento C=C aromático) e 1167 (estiramento C-N) cm<sup>-1</sup>
- M.S (m/z): 423 (M<sup>+</sup>, 34), 377 (32), 298 (16), 239 (18), 190 (73), 145 (34), 121 (100), 70 (54), 58 (52), 42 (32).
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.60–7.40 (m, 6H, aromático), 7.35 (d, 1H, aromático), 7.30 (m, 2H, aromático), 7.20 (d, 1H, aromático), 7.00 (d, 1H, aromático, trans), 6.90 (d, 1H, aromático, cis), 6.25 e 6.15 (2t, 1H, CH-trans e cis, J = 6.7 Hz), 3.90 e 3.80 (2s, 3H, OCH<sub>3</sub>-trans e cis), 3.15 (2d, 2H, CH<sub>2</sub>, J = 6.7 Hz), 2.30 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

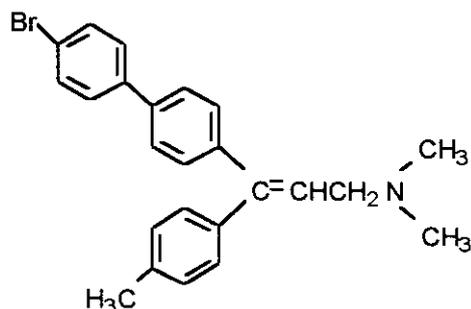
3-(4'bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-nitrofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (Id)



- Eluente de cromatografia: Acetato de etila / metanol 1%
- Rendimento: 58%
- Ponto de Fusão: 120-25 °C
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 280 nm
- I.V (pastilha KBr): 1174 (estiramento C-N), 1343 (estiramento N-O) e 853 (estiramento C-N) cm<sup>-1</sup>
- M.S (m/z): 436 (M<sup>+</sup>, 33), 346 (9), 314 (27), 265 (33), 205 (58), 165 (24), 131 (16), 70 (100), 58 (93), 42 (50).
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  8.30 e 8.15 (2d, 2H, aromático, trans e cis), 7.60-7.30 (m, 8H, aromático), 7.25 e 7.20

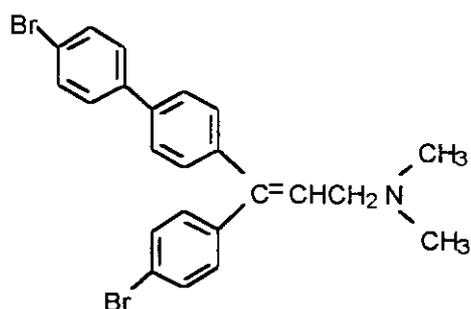
(2d, 2H, aromático), 6.40 (2t, 1H, CH), 3.10 e 3.00 (2d, 2H, CH<sub>2</sub>-cis e trans, J = 6.7 Hz), 2.30 (2s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm

3-(4'bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-metil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (Ie)



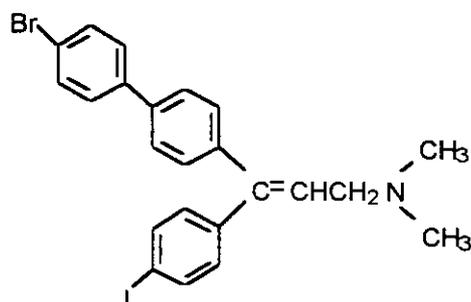
- Eluente de cromatografia: Hexano / éter / Et<sub>3</sub>N (8 : 2 : 1)
- Rendimento: 58%
- Ponto de Fusão: 85-7 °C
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 272 nm
- I.V (pastilha KBr): 1654 (estiramento C=C olefina), 1508 e 1488 (estiramento C=C aromático) e 1168 (estiramento C=N) cm<sup>-1</sup>
- M.S (m/z): 405 (M<sup>+</sup>, 36), 361 (16), 314 (18), 256 (27), 189 (20), 174 (66), 105 (75), 70 (100), 58 (88), 43 (95).
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.60–7.40 (m, 6H, aromático), 7.45 (d, 1H, aromático), 7.40-7.20 (m, 3H, aromático), 7.15-7.05 (m, 2H, aromático), 6.30 e 6.20 (2t, 1H, CH-trans e cis, J = 6.7 Hz), 3.10 (d, 2H, CH<sub>2</sub>, J = 6.7 Hz), 2.40 e 2.25 (2s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> cis e trans) ppm.

3-(4'bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (If)



- Eluente de cromatografia: Acetato de etila / metanol 1-5%
- Rendimento: 50%
- Ponto de Fusão: 101 °C
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 268 nm
- I.V (pastilha KBr): 1654 (estiramento C=C olefina), 1460 e 1450 (estiramento C=C) e 1171 (estiramento C-N) e cm<sup>-1</sup>
- M.S (m/z): 441 (M<sup>+</sup>, 29), 392 (2), 346 (27), 265 (32), 238 (45), 154 (93), 125 (46), 70 (100), 58 (68), 42 (59).
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.65-7.40 (m, 9H, aromático), 7.30 (d, 1H, aromático), 7.10 (d, 1H, aromático), 6.30 e 6.20 (2t, 1H, CH, trans e cis J = 6.7 Hz), 3.10 e 3.00 (2d, 2H, CH<sub>2</sub> - cis e trans, J = 6.7 Hz) 2.25 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

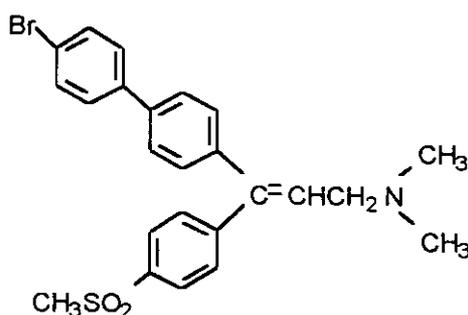
3-(4'bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-iodofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (Ig)



- Eluente de cromatografia: Acetato de etila / metanol 1-5%
- Rendimento: 56%
- Ponto de Fusão: 142 °C

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 268 nm
- I.V (pastilha KBr): 1654 e (estiramento C=C olefina), 1450 e 1480 (estiramento C=C aromático) e 1172 (estiramento C-N) cm.
- M.S (m/z): 517 ( $\text{M}^+$ , 20), 439 (4), 348 (29), 286 (27), 265 (36), 165 (33), 115 (35), 70 (100), 58 (80), 42 (52).
- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  7.80 (d, 1H, aromático), 7.60-7.40 (m, 7H, aromático), 7.30 (d, 1H, aromático), 7.20 (d, 1H, aromático), 7.05 (d, 1H, aromático), 6.90 (d, 1H, aromático), 6.30 e 6.20 (2t, 1H, CH-trans e cis,  $J = 6.7$  Hz), 3.10 e 3.00 (2d, 2H,  $\text{CH}_2$ -cis e trans,  $J = 6.7$  Hz), 2.25 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm

3-(4'bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-metilsulfonilfenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina (Ih)



- Eluente de cromatografia: Acetato de etila / metanol 5-15%
- Rendimento: 62%
- Ponto de Fusão: óleo
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 272 nm
- I.V (pastilha KBr): 1654 (estiramento C=C olefina), 1481 e 1438 (estiramento C-N amina), 1264 (estiramento S=O), 1147 (estiramento C=N) e 1116 (C=C estiramento C=S)  $\text{cm}^{-1}$
- M.S (m/z): 470 ( $\text{M}^+$ , 7), 256 (28), 239 (10), 227 (9), 213 (11), 185 (14), 167 (28), 149 (100), 83 (70), 47 (59).
- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  8.00 e 7.90 (2d, 2H, aromático, trans e cis), 7.70 e 7.40 (m, 8H, aromático), 7.30 e 7.20 (2d, 2H, aromático, trans e cis), 6.40 (2t, 1H, CH), 3.20 e 3.10 (2

(d + s), 5H, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>, d-cis, s-trans, d-trans, s-cis, J = 6.7 Hz), 2.35 e 2.30 (2s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-trans e cis) ppm.

#### 4.5 Separação dos isômeros geométricos dos compostos I a-b por cristalização fracionada

A mistura isomérica **cis/trans (compostos I a,b)** foi adicionado diclorometano em quantidade suficiente para a solubilização total e hexano foi então adicionado lentamente até turvação permanente. A solução foi em seguida deixada durante uma noite em repouso à temperatura de 5 °C. O sólido branco cristalino obtido nestas condições, foi filtrado e identificado como sendo o isômero puro **trans (Ia e Ib)**. O filtrado contendo uma mistura enriquecida no isômero **cis (Ia e Ib)** foi evaporado a pressão reduzida e um óleo amarelo foi então obtido. O filtrado contendo uma mistura enriquecida no isômero **cis (Ia e Ib)** foi evaporado sob pressão reduzida e um óleo amarelo foi então obtido.

##### Trans Ia

- Ponto de Fusão: 122-23 °C
- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 286 nm
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.75 (d, 2H, aromático), 7.30-7.50 (m, 8H, aromático), 7.10 (d, 2H, aromático), 6.30 (t, 1H, CH), 3.00 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.20 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

##### Mistura enriquecida cis Ia

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 264 nm
- <sup>1</sup>H RMN (80 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.00-7.80 (m, 12H, aromático), 6.00-6.40 (2t, 1H, aromático), 2.80-3.20 (2d, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.20 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

##### Trans Ib

- Ponto de Fusão: 123-25 °C

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 286 nm
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.75 (d, 2H, aromático), 7.30-7.50 (m, 9H, aromático), 7.10 (d, 2H, aromático), 6.30 (t, 1H, CH), 3.00 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.25 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

#### Mistura enriquecida cis Ib

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 264 nm
- <sup>1</sup>H RMN (80 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.10-7.60 (m, 13H, aromático), 6.2-6.3 (2 t, 1H, CH<sub>3</sub>), 3.05-3.20 (2 d, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.30 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

#### 4.6 Separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-fenil-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Ib por placa preparativa

O composto **Ib** (30 mg) foi aplicado em placa preparativa (20 x 20 cm) preparadas com sílica-gel (2-25  $\mu$ )(Aldrich), utilizando-se como fase móvel hexano/éter/hidróxido de amônio 50:50:1.5. O solvente foi eluído cinco vezes e a revelação feita com lâmpada de ultra-violeta (254 nm). Os isômeros separados foram coletados da placa e extraído com clorofórmio (30 ml), metanol (10 ml). Após filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e os isômeros foram obtidos puros: isômero **Ib-trans** (14 mg - óleo) e o isômero **Ib-cis** (12 mg - óleo).

#### Trans Ib

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 286 nm
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.75 (d, 2H, aromático), 7.30-7.50 (m, 9H, aromático), 7.10 (d, 2H, aromático), 6.30 (t, 1H, CH), 3.00 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.25 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

#### Cis Ib

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 264 nm

- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  7.50-7.60 (m, 5H, aromático), 7.20-7.30 (m, 8H, aromático), 6.20 (t, 1H, CH), 3.10 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.30 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

#### 4.7 Separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1- amina **Ia** por placa preparativa

O composto **Ia** foi separado de acordo com o procedimento descrito acima.

##### Trans **Ia**

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 286 nm
- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  7.75 (d, 2H, aromático), 7.30-7.50 (m, 8H, aromático), 7.10 (d, 2H, aromático), 6.30 (t, 1H, CH), 3.00 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.20 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

##### Cis **Ia**

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 264 nm
- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  7.50-7.60 (m, 5H, aromático), 7.20-7.30 (m, 8H, aromático), 6.20 (t, 1H, CH), 3.10 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.30 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

#### 4.8 Separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-metoxifenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina **Ic** por placa preparativa

O composto **Ic** (50 mg) foi aplicado em placa preparativa (20 x 20 cm) preparadas com sílica-gel (2-25  $\mu$ )(Aldrich), utilizando-se como fase móvel hexano/clorofórmio saturado com hidróxido de amônio (1:1 v/v). O solvente foi eluído cinco vezes e a revelação feita com lâmpada de ultra-violeta (254 nm). Os isômeros separados foram coletados da placa e extraído com clorofórmio (40 mL), metanol (10 mL). Após filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e os isômeros foram obtidos puros: isômero **Ic-trans** (20 mg - óleo) e o isômero **Ic-cis** (17 mg - óleo).

### Trans Ic

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 284 nm
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.60 (d, 2H, aromático), 7.50 (m, 4H, aromático), 7.45 (d, 2H, aromático), 7.10 (d, 2H, aromático), 6.95 (d, 2H, aromático), 6.20 (t, 1H, CH), 3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.15 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.25 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

### Cis Ic

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 262 nm
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  7.60 (d, 2H, aromático), 7.50 (d, 2H, aromático), 7.15-7.30 (m, 6H, aromático), 6.85 (d, 2H, aromático), 6.10 (t, 1H, CH), 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.15 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.25 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

## 4.9 Separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-nitrofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1- amina Id por placa preparativa

Os isômeros geométricos do composto **Id** foram separados pelo mesmo procedimento descrito acima (**composto Ic**).

### Trans Id

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 284 nm
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub> / TMS):  $\delta$  8.25 (d, 2H, aromático), 7.40-7.60 (m, 8H, aromático), 7.30 (d, 2H, aromático), 6.49 (t, 1H, aromático), 6.49 (t, 1H, CH), 3.00 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.25 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

### Cis Id

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 262 nm

- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  8.20 (d, 2H, aromático), 7.40-7.60 (m, 8H, aromático), 7.20 (d, 2H, aromático), 6.45 (t, 1H, CH), 3.10 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.25 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

#### 4.10 Separação dos isômeros geométricos de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-metilsulfonilfenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina **Ih** por placa preparativa

O composto **Ih** (50 mg) foi aplicado em placa preparativa (20 x20 cm) preparadas com sílica-gel (2-25 $\mu$ )(Aldrich), utilizando-se como fase móvel hexano/éter/hidróxido de amônio 90:10:5. O solvente foi eluído quatro vezes e a revelação feita com lâmpada de ultra-violeta (254 nm). Os isômeros separados foram coletados da placa e extraído com clorofórmio (50 mL), metanol (20 mL). Após filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e os isômeros foram obtidos puros: isômero **If-trans** (19 mg, óleo) e o isômero **If-cis** (17 mg, óleo).

##### **Trans Ih**

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 286 nm
- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  8.00 (d, 2H, aromático), 7.40-7.60 (m, 8H, aromático), 7.25 (d, 2H, aromático), 6.40 (t, 1H, CH), 3.15 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{SO}_2$ ), 3.00 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.30 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -cis) ppm.

##### **Cis Ih**

- U.V:  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 266 nm
- $^1\text{H}$  RMN (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$  / TMS):  $\delta$  7.85 (d, 2H, aromático), 7.60 (m, 4H, aromático), 7.50-7.40 (m, 4H, aromático), 7.20 (d, 2H, aromático), 6.35 (t, 1H, CH), 3.15 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.05 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{SO}_2$ ), 2.25 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

#### 4.11 Atividade Tripanocida

*T. cruzi* cepa Y foi utilizado. As formas tripomastigotas foram obtidas de camundongos infectados e as formas amastigotas obtidas do sobrenadante de macrófagos infectados J 7746-8 pelo método descrito na literatura (De Castro *et alii*, 1987). As formas epimastigotas foram mantidas em meio Liver Infusion Triptose (LIT) e coletadas na fase exponencial de crescimento. Soluções estoques das drogas foram preparadas em dimetilsulfóxido com a concentração final nunca excedendo a 0.1%. Experimentos mostraram que em concentrações de até 5% de dimetilsulfóxido não apresenta efeitos deletérios no parasita. Nos experimentos com a forma tripomastigotas o sangue fresco infectado com o parasita foi diluído quando necessário em meio modificado Dubelcco's (DME) a uma concentração final do parasita de  $2-5 \times 10^6$  células/ml. Esta suspensão (100  $\mu$ M) foi adicionada a droga também diluída em DME numa razão de 1:1 e a mistura foi então incubada a 4 °C. As drogas foram utilizadas em concentrações de 1 a 500  $\mu$ M.

Os experimentos com formas amastigotas em meio DMES e epimastigotas em meio LIT foram conduzidas a 28 °C. A contagem das células foram feitas após 24 horas de incubação com a droga usando câmara Neubauer. A concentração das drogas que corresponde a eliminação de 50% do parasita é expressa como ID<sub>50</sub>.

#### 4.12 Toxicidade Aguda (*E. coli*)

##### • Meio de cultura

Foram dissolvidos em água (1litro), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3.0 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7.0 g), citrato de sódio (0.5 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.0 g), MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0.2 g). A concentração de glicose utilizada foi de 2% (p/v). O pH foi ajustado a 7.2 utilizando-se uma solução de hidróxido de potássio. A esterilização do meio foi feita em forno de microondas.

### • Procedimento do teste

O meio de cultura líquido (1 litro) foi enoculado com *E. coli* (organismo teste) e a concentração de CO<sub>2</sub> produzida pela respiração microbiana e presente no meio líquido, foi monitorada até atingir 0.5 mmol.litro<sup>-1</sup>.

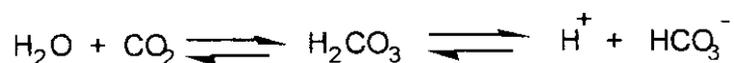
O frasco foi mantido em meio termostatizado a 37 °C. Alíquotas de 50 ml do meio foram transferidas para erlenmeyer de 125 ml e os compostos **I a-h** (a várias concentrações) foram adicionados. O frasco que não recebeu nenhuma adição atuou como controle.

A concentração de CO<sub>2</sub> nos diversos frascos foi obtida por interpolação na curva de calibração.

O monitoramento de CO<sub>2</sub> foi feito a cada 10 minutos (tempo total do experimento de 90 minutos) na seguinte ordem de análise: controle, cultura contendo os compostos **I a-h**, e o branco.

### • Monitoramento de CO<sub>2</sub> no Sistema Fia Condutométrico

Um volume determinado da amostra (300 mL) contendo as espécies carbônicas (CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) é injetada num fluxo carregador (água deionizada) o qual conflui com outro fluxo de ácido sulfúrico diluído (0.2 M). O meio favorece o equilíbrio no sentido da formação do CO<sub>2</sub>. O gás formado (CO<sub>2</sub>), no meio ácido, ao passar pela cela de difusão, permeia por uma membrana de teflon e atinge o fluxo de água deionizada, deslocando o equilíbrio para a formação dos íons HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e H<sup>+</sup>. A condutividade deste fluido que vinha sendo monitorado constantemente, é então alterada devido ao CO<sub>2</sub> presente na amostra. A mudança na condutância é proporcional à concentração total de CO<sub>2</sub> presente na amostra.



### 4.13 Citotoxicidade

#### • **Manutenção da cultura**

As células nos experimentos foram do tipo fibroblástico, da linhagem estabelecida em cultura V79, oriunda de pulmão de hamster chinês pelo laboratório do Professor Rogério Meneghini, USP, SP. Os fibroblastos foram mantidos em cultura continuamente, através de repiques periódicos quando atingem a densidade de confluência. As células foram descoladas usando solução de tripsina a 0.1%, homogenizando-se uma alíquota desta suspensão celular com uma quantidade equivalente de solução de Trypan Blue a 0.1%. O número de células para os cultivos e plaqueamentos foram estimados contando-as em câmara de Neubauer, excluindo-se as células coradas. O cultivo foi realizado em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µM de sulfato de estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em estufa a 37 °C sob atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub> (Melo, 1996).

#### • **Tratamento com as drogas**

As drogas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em PBS antes de suas utilizações nos tratamentos celulares. A porcentagem de dimetilsulfóxido utilizada não excedeu 0.1% nos diversos tratamentos.

#### • **Proliferação celular (PR)**

O plaqueamento foi realizado obtendo-se uma densidade de  $3 \times 10^4$  células/ml em cada poço da placa (24 pocinhos), incubando a 37 °C por 48 horas e então, as células foram tratadas durante 24 horas nas doses especificadas em triplicatas a cada figura. Após a incubação e remoção do meio com a droga, as células foram lavadas com PBS-Ca<sup>2+</sup>, fixadas com ácido tricloroacético a 5%, lavadas com etanol (2 vezes), secadas ao ar e lisadas com NaOH 0.5M (1 mL/poço, 1 hora a 37 °C). Controles com solventes/PBS foram utilizados para expressar a porcentagem de proliferação relativa dos efeitos da droga, determinada pela absorbância a 260 nm (Cingi *et alii*, 1991).

### **. Captação do corante vermelho neutro (VN)**

Células V<sub>79</sub> ( $3.0 \times 10^4$  / poço) foram incubadas por 48 horas. O meio foi removido e trocado por meio (sem soro) contendo várias concentrações das drogas utilizadas. As células foram incubadas por mais 24 horas e após este período o meio foi removido e trocado por outro contendo o corante vermelho neutro [(Neutral Red - NR (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenanzina)], 50 µg/mL, pré-incubado durante uma noite à 37 °C e filtrado antes do uso, em membrana filtrante 0.22 µM. As células foram incubadas durante 3 horas e o meio contendo VN removido, lavadas com PBS à 37 °C para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomas e a cada pocinho foi adicionado 1 mL da solução contendo 1% de ácido acético glacial, 49% de água destilada e 50% de etanol para fixar as células e solubilizar o VN. As placas foram agitadas por 20 minutos e as absorbâncias das soluções lidas no espectrofotômetro à 540 nm (Riddell *et alii*, 1988).

### **• Redução do Sal de Tetrazólio (MTT)**

MTT é um corante amarelo, que é reduzido por células viáveis para um composto azul (formazan), insolúvel em solução aquosa. A quantidade de formazan pode ser espectroscopicamente determinada uma vez solubilizado em etanol absoluto.

Células V<sub>79</sub> ( $3.0 \times 10^4$  / pocinho) foram incubadas por 48 horas. O meio foi removido e trocado por meio sem soro contendo diversas concentrações das drogas utilizadas. As células foram incubadas por mais 24 horas e então o meio foi removido e trocado por outro contendo o corante (1mg / mL), e incubadas durante 5 horas, tempo necessário para a redução acontecer. O meio foi retirado cuidadosamente e adicionou-se 1 mL de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância de cada poço foi lida no espectrofotômetro a 570 nm. Poços contendo a mesma porcentagem de solvente foram considerados como 100% (Denizot e Lang, 1986).

#### 4.14 Investigação do Mecanismo de Ação de 3-[4'-bromo-(1,1'-bifenil)-4-il-3-(4-nitrofenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina Id

##### • Preparação dos Microssomas

Camundongos machos (190-250 g) foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado foi rapidamente removido, triturado em solução 0.2 M de tampão fosfato contendo 0.15 M de cloreto de potássio pH = 7.3 e homogenizado. Todas as manipulações foram feitas a 0-4 °C.

O homogenizado foi centrifugado a 2.000 rpm por 20 minutos para remover núcleo e mitocôndria. O sobrenadante foi então fracionado e centrifugado a 32.500 rpm por 60 minutos para a obtenção da fração microssomal.

Os microssomas foram lavados com o tampão fosfato pH = 7.3 e recedimentado por ultracentrifugação a 32.500 rpm por mais 60 minutos. A fração microssomal foi novamente lavada com tampão fosfato, ressuspensa em tampão fosfato pH = 7.3 e congelada a - 80 °C (Mc Manus *et alii*, 1982).

##### • Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina bovina como padrão e CCB (Coomassie Brilliant Blue) G-250 como corante.

##### • Consumo de O<sub>2</sub>

O consumo de O<sub>2</sub> foi medido em um oxígrafo usando eletrôdo Clarck. Avaliação do consumo de O<sub>2</sub> foi feito a 25 °C em meio contendo tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 20 mM pH = 7.4 e cloreto de potássio 130 mM, microssomas (15 mg proteína / mL) e NADH (0.5 mM) (Do Campo *et alii*, 1981).

O composto nitro derivados de 3-amino propeno foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionado ao meio a concentração de 0.3 mM.

### • Quimioluminescência

O equipamento utilizado foi o contador de cintilação LS-100C Beckman com o circuito de coincidência fechado.

A mistura contendo microssoma (15 mg proteína/mL) e tampão fosfato 20 mM pH = 7.4 foram adicionados NADH (0.5 mM) no tempo zero seguido da adição de luminol, nifurtimox (0.3 mM/DMSO) e o composto **Id** (0.3 mM/DMSO) foram então adicionados.

## **5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Os compostos derivados de 3-aminopropeno foram sintetizados por um processo modificado do publicado anteriormente. Variações nas condições de reação tais como solvente, temperatura, tempo de reação e isolamento do produto levaram a rendimentos otimizados.

Os compostos foram obtidos em proporções de 1:1 dos respectivos isômeros **E/Z** e a mistura foi utilizada na avaliação da atividade biológica destes compostos.

A separação dos isômeros geométricos de alguns dos compostos sintetizados possibilitou a caracterização espectroscópica de cada um dos isômeros **E** e **Z** separadamente bem como da mistura isomérica **E/Z**.

Os compostos sintetizados apresentaram atividade tripanocida sobre as três formas de *T. cruzi*. Estes compostos se mostraram tripanocidas mais efetivos que nifurtimox a droga utilizada no tratamento da fase aguda da doença de Chagas e mais efetivo que violeta genciana que é utilizada no tratamento profilático da doença de Chagas em bancos de sangue.

A especificidade dos isômeros **E** e **Z** na atividade tripanocida foi também avaliada para o composto não substituído derivado de 3-aminopropeno. O isômero geométrico **Z** apresentou maior atividade tripanocida que o isômero **E**. O isômero **Z** deve portanto apresentar especificidade frente a um receptor específico do *T. cruzi*.

Os estudos toxicológicos dos compostos sintetizados utilizando-se dois sistemas diferentes "in vitro" (bactérias *E. coli* e cultura de células V79) foram bastante concordantes e mostraram que o derivado metilsulfonil derivado de 3-aminopropeno é consideravelmente menos tóxico que os outros derivados estudados.

A investigação do mecanismo de toxicidade celular utilizando-se três diferentes métodos de avaliação de citotoxicidade mostrou que o caráter anfílico destes compostos é relevante na toxicidade e os lisossomos são organelas afetadas no mecanismo de ação tóxica destes compostos.

Ao se comparar a toxicidade dos compostos sintetizados com nifurtimox em cultura de células, observou-se que estes compostos são bem mais tóxicos. Entretanto, sugere-se que para a avaliação da toxicidade "in vitro" de nifurtimox sistemas nos quais processos de metabolização estão presentes, devem ser utilizados.

Também, ensaios de citotoxicidade dos compostos derivados de 3-aminopropeno afim de se verificar a toxicidade destes compostos após metabolização devem ser realizados utilizando-se cultura primária de hepatócitos.

Dos estudos de correlações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica QSAR para a série de congenéricos analisados, conclui-se que somente os efeitos eletrônicos do substituinte são relevantes na atividade biológica de toxicidade aguda em *E. coli* e citotoxicidade em cultura de células V79. Não foram obtidas correlações significativas entre os parâmetros estruturais que contam com os efeitos eletrônicos, estéricos e hidrofóbicos do substituinte na atividade tripanocida dos compostos estudados.

Os estudos de QSAR apesar de preliminares apresentaram resultados interessantes no que se refere aos estudos toxicológicos, pois foram bastante consistentes nos dois sistemas biológicos avaliados.

As várias equações de correlação analisadas nos estudos de QSAR indicaram que o composto nitro derivado de 3-aminopropeno atua diferentemente dos outros derivados em seu mecanismo de ação e esta hipótese foi confirmada através da avaliação do transporte de elétrons microsossomal de geração de espécies ativas de oxigênio.

O mecanismo de ação tripanocida dos compostos estudados não é conhecido e portanto estudos neste sentido devem ser realizados. O mecanismo de ação através da inibição da biosíntese do ergosterol do composto não substituído derivado de 3-aminopropeno está atualmente sendo investigado pelo grupo de pesquisa.

Para a continuidade dos estudos de QSAR novos derivados deverão ser sintetizados e assim os efeitos hidrofóbicos e estéricos do substituinte que contam com a atividade biológica poderão ser melhor avaliados. Ao se trabalhar com um número maior de compostos, análise de regressão multilinear, método de Hansch poderá ser utilizada e assim os estudos de QSAR poderão ser aprimorados.

Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que estes compostos podem ser considerados estruturas líderes no planejamento de novas drogas para tratamento da doença de Chagas.

Ênfase deverá ser dado aos compostos hidrogênio e bromo derivados os quais se mostraram mais ativos e o derivado metilsulfonil que se mostrou

menos tóxico. Também os estudos deverão ser continuados com os isômeros separados uma vez que o isômero *cis* é o mais ativo.

A continuidade dos estudos de QSAR ou SAR em que novos compostos serão sintetizados e a atividade biológica avaliada, bem como um melhor entendimento do mecanismo de ação tripanocida e ação tóxica destes compostos poderão levar a obtenção de compostos mais efetivos e menos tóxicos.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abe J.; Tomesh J.C.; Wattananin S. e Prestwich G.D. (1994), *Natural Prod. Rep.* , 11, 279.
- Adam W. e Cilento G. (1982), "Chemical and Biological Generation of Excited States", Academic Press Ed., N. Y.
- Adams J.; e Metcalf L. (1990), "Comprehensive Medicinal Chemistry", Pergamon Press Ed., N. Y., Vol. 2.
- Agabian N. (1990), *Cell* , **61**, 1157.
- Andrews N.W. (1995), *Trends Cell Biol.*, **5**, 133.
- Avila J.L.; Avila A. e Munoz E. (1981), *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **30**, 769.
- Avila J.L.; Royas T.; Avila A.; Pologre M.A. e Robins R.V. (1987), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**, 447.
- Babich H. e Borenfreund J.A. (1990), *ATLA* , **18**, 129.
- Barret P.A. (1976), U. S. Patent., 1.434.714.
- Barret P.A.; Beveridge E.; Bul. D.; Caldwell I.C.; Islip P.J.; Neal R.A. e Woods N.C. (1982), *Experientia* , **38**, 338.
- Bolton R. e Burley R. E. M. (1977), *J. C. S. Perkin II* , 426.
- Bradford M.M. (1976), *Anal. Biochem.* , **72**, 248.
- Brener Z. (1973), *Am. Rev. Microbiol.*, **27**, 347.
- Brener Z. (1984), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , R.J., ( Suppl.) 79, p. 149.
- Brener Z. (1994), *Ciência e Cultura* , **46**, 328.
- Brower H. (1991), *J. Chem. Ed.*, **68**, 695.
- Brown D.W.; Floyd A.J. e Sainsbury M. (1988), "Organic Spectroscopy", John Wiley & Sons Eds. N. Y.
- Bryan R.T.; Balderrama F.; Tonn R.J e Dias J.C.P. (1994), *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **50**, 61.

- Cançado J.R.; Salgado A.; Marra V.D.; Alvarez J.M. e Machado J.R. (1975), *Rev. Inst. Med. Trop. S.P.*, **17**, 111.
- Cazzulo J.J. (1994), *J. Bioenerg. Biomembranes*, **26**, 157.
- Chabala C.B.; Waits V.B.; Ikeler T.; Patchett A.A.; Wyvratt M.; Hanson W.L. e Fischer M.H. (1991), *Experientia*, **47**, 51.
- Cingi M.R.; De Angeles I.; Fortunati E.; Reggiani D.; Bianchi V.; Tiozzo R. e Zucco F. (1991), *Toxicol. In Vitro*, **5**, 119.
- Craig P.N.; (1971), *J. Med. Chem.*, **14**, 680.
- Cronin M.T.D. e Dearden J.C. (1995), *Quant. Struct-Act. Relat.*, **14**, 117.
- De-Castro S.L.; Meirelles M.N.L. e Oliveira M.M. (1987), *Exp. Parasitol.*, **64**, 368.
- De-Castro S.L. (1993), *Acta Tropica*, **53**, 83.
- De-Castro S.L.; Pinto M.C.F.R e Pinto A.V. (1994), *Microbios*, **78**, 83.
- Denizot F. e Lang R. (1986), *J. Immunol. Methods*, **89**, 271.
- Dias J.C.P. (1987), *Parasitology Today*, **3**, 336.
- Do Campo R., Moreno S.N.J. e Stoppani A.O.M. (1981), *Arch. Bioch. Biophys.*, **207**, 316.
- Do Campo R. (1990), *Chem. Biol. Interactions*, **73**, 1.
- Doyle P.S. e Weinbach C. (1989), *Parasitology*, **68**, 230.
- Durán N. e Haun M. (1991), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, R. J.*, ( Supl ), 86, 29.
- Durán N.; Campos V.; Riveros R.; Joyas A.; Pereira M.F. e Haun M. (1989), *An. Acad. Brasil. Cien.*, **61**, 31.
- Duve C.; Barsy T.; Poole B.; Trovet A.; Tulkens P. e Van Hoof F. (1974), *Pharmacol.*, **23**, 2495.
- Fairlamb A.H.; Henderson G.B e Cerami A. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **86**, 2607.
- Fairlamb A.H. (1990), *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 717.

- Fairlamb A.H. e Cerami A. (1992), *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 695.
- Ferreira R. C. C. e Ferreira L. C. S. (1986), *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **19**, 19.
- Forsby A.; Anderson M.; Lewan L. e Sterner O. (1991), *Toxicol. in Vitro*, **5**, 9.
- Freshney R.I. (1994), "In Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique", 3<sup>rd</sup> Ed., Wiley-Liss, N. Y.
- Fujita T. e Iwamura H. (1983), *Topics in Cur. Chem.*, **114**, 120.
- Gallerano R.H.; Marr J.J. e Sosa R.R. (1990), *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **43**, 159.
- Ganellin C.R. e Roberts S.M. (1993), "Medicinal Chemistry: The Role of Organic Chemistry in Drug Research", N. Y., p. 84.
- Goldberg A.M. e Frazier J.M. (1989), *Sci. Amer.*, **261**, 16.
- Goldenberg S.; Kruger M.A.; Lafaille J.T.; Almeida E. e Oelemann W. (1991), *Mem. Inst. Butantan*, **53**, 71.
- Goldenberg S. (1993), *Ciência e Cultura*, **45**, 206.
- Gorla N.B.; Ledisma O.S.; Barbieri G.P. e Lampa I.B. (1989), *Mutation Res.*, **224**, 263.
- Guimarães J.R. e Jardim W. (1993), *Química Nova*, **16**, 28.
- Gutteridge W.E. (1987), *Int. J. Parasitol*, **17**, 121.
- Halle W. e Spielmann H. (1992), *ATLA*, **20**, 40.
- Hansch C. e Fujita T. (1964), *J. Am. Chem Soc.*, **86**, 1616.
- Hansch C.; Unger S.A. (1973), *J. Med. Chem.*, **16**, 1217.
- Hansch C. e Leo A.J. (1979), "Substituents Constants for Correlations Analysis in Chemistry and Biology, Wiley-Interscience Publication, N.Y.
- Hansch C. e Klein T.E. (1991), *Methods Enzymol.*, **220**, 512.
- Hansch C.; Leo A. e Taff W. (1991), *Chem. Rev.*, **91**, 165.
- Hansch C. (1993), *Acc. Chem. Res.*, **26**, 147.

- Haun M.; Pereira M.F.; Hoffmann M.E.; Joyas A.; Campos V.; Filardi L.D.; Castro S.L. e Durán N. (1992), *Biol. Res.*, **25**, 21.
- Henderson G.B.; Ulrich P.; Fairlamb B.A.; Rosemberg J.; Pereira M.; Sela M.e Cerami A. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **85**, 5374.
- Hunter K.J.; Stobos C.A.M. e Fairlamb A. (1990), *Biochem. Soc.Trans.*,**18**, 1094.
- Hunter K.J.; Le Quesne S.A. e Fairlamb A.H. (1994), *Eur. J. Biochem.*, **226**, 1019.
- Jardim W.F.; Pasquini C. e Guimarães J.R. (1989), *Wat. Res*, **24**, 351.
- Jockers-Scherüol M.C.; Schimer R.H. e Krauth-Siegel R.L. (1989), *Eur. J. Biochem.*, **180**, 267.
- Johnson P.J.; Kooter J.M. e Brost P. (1987), *Cell* , **51**, 273.
- Kerzmann G. (1993), *ATLA* , **21**, 233.
- King F.D. (1994), "Medicinal Chemistry: Principles and Practice", The Royal Soc. Chem. Publ. Cambridge, England.
- Knox K.; Uphill P.F.; Fry J.R.; Benford J. e Balls M. (1986),*Food. Chem.Toxicol.*, **24**, 457.
- Krauth-Siegel R.L.; Enders B.; Henderson G.B.; Fairlamb A. e Schimer R.H. (1987), *Eur. J. Biochem.*, **164**, 123.
- Kubinyi H. (1993), "QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches", UCH mbH, Weinheim, Germany.
- Langowski J. (1993), *Manufact. Intern.*, 77.
- Laplume H.; Barousse A.P. e Cabrera H. (1985), *Medicina* , **42**, 223.
- Lovelland B.E.; Johns T.G.; Mackay I.R.; Vaillant F.; Wang Z.X. e Hertzog P. (1992), *Biochem Int.*, **27**, 501.
- Lüllmann H.; Lüllmann-Rauch R. e Wassermann O. (1978), *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 1103.

- MacCabe R.E.; Remington J.S. e Araujo F.G. (1986), *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**, 280.
- Mc Manus M.E.; Lang M.A.; Stuart K. e Strong J. (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 547.
- Melo P.S. (1996), "Tese de Mestrado", I.B., UNICAMP.
- Moraes-Souza H.; Wanderley D. M. V.; Brener S.; Nascimento R. D.; Antunes C. M. F. e Dias J. C. P. (1994), *Bol. Oficina Sanit. Panam.*, **116**, 406.
- Naeff H.S.D.; Franssen M.C.R. e Van der Plas H.C. (1991), *Re. Trav. Chimi. Pays-Bas* , **110**, 139.
- Nagel R. e Nepomnaschy I. (1983), *Mutation Res.*, **117**, 237.
- Nagel R. (1987), *Mutation Res.*, **191**, 17.  
*Panam.*, **116**, 406.
- Neal R.A. e Bulren J. (1988), *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **82**, 709.
- Neves D.P. (1988), "Parasitologia Humana", 7<sup>a</sup> ed., Livraria Ateneu, R.J, S.P.
- Nilsen T.W. (1994), *Science* , **264**, 1868.
- Norrington F.R.; Hyde R.M. e Williams S.G. (1975), *J. Med. Chem.*, **18**, 604.
- Ohnishi T.; Ohashi Y.; Nozu K. e Inoki S. (1980), *Mutation. Res.*, **77**, 241.
- Petranyi G. (1984), *Science* , **224**, 1239.
- Redl G.; Craner D. e Berkoff E. (1974), *Chem. Soc. Rev.*, **3**, 273.
- Renzi D.; Valtolina M. e Forster R. (1993), *ATLA* , **21**, 89.
- Repetto G. e Sanz P. (1993), *ATLA*, **21**, 501.
- Riddell, R. J.; Panacer, D. S.; Wilde S. M.; Clothier R. H. e Balls B.(1986),  
*ATLA*, **14**, 86.
- Roguet R.; Colovio J.; Galtani Q.; Dossou K.G. e Rougier A. (1993), *ATLA*,  
**21**, 216.
- Rosenkraz H.S.; Matthews E.J. e Klopman G. (1992), *ATLA* , **20**, 549.
- Rosenkraz H.S.; Pangrekar J. e Klopmann G. (1993), *ATLA* , **21**, 589.

- Schimer R.H.; Müller J.G. e Krauth-Siegel R.L. (1995), *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 141.
- Shames S.L.; Fairlamb A.H.; Cerami A. e Walsh C.T. (1986), *Biochemistry*, **25**, 3519.
- Shusterman A.; Johnson S.J. e Hansch C. (1989), *J. Comput. Chem.*, **33**, 18.
- Shusterman A.(1991), *Chemtech*, , 624.
- Silva L.H.P. e Nussenszweig V. (1953), *Folia Clin. Biol.*, **20**, 191.
- Simpson L. e Shaw J. (1989), *Cell* , **57**, 355.
- Siqueira-Batista R.; Storino R.B. e Chiga A.L.V. (1993), *ARS Rev. Clin. Méd.*, **26**, 79.
- Stoppani A.O.M. (1983), *Interciencia* , **8**, 396.
- Stütz A.; Georgopoulos A.; Graniter W.; Petranyi G. e Berney D. (1986), *J. Med. Chem.*, **29**, 112.
- Stütz A. (1987), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **26**, 320.
- Swain C.G. e Lupton E.C. (1968 ), *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 4328.
- Topliss J.G. (1972), *J. Med. Chem.*, **15**, 1006.
- Trost B.M. e Fleming I. (1991), "Comprehensive Organic Synthesis", 2<sup>a</sup> Ed.
- Urbina J.A.; Lazard K.; Aguirre T.; Piras M.M. e Piras R. (1988), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 730.
- Urbina J.A., Lazard K., Aguirre T., Piras M.M. e Piras R., *Antimicrob. Agents Chemother.*, (1991), **26**, 320.
- Walsh C.; Bradley M. e Nadeu K. (1991), *TIBS* , **16**, 305.
- Wanderley D. M. V.; Gozales T. T.; Pereira M. S. C. A.; Nascimento R. D.; Moraes-Souza H. (1993), *Rev. Saude Publica*, **27**, 430

## **7. ATIVIDADES ACADÊMICAS RELACIONADAS COM A TESE**

### **• Cursos Extra Curriculares**

Fundamentos de Cromatografia Líquida - Edisa Informática S/A - 24 a 26 de Março de 1993 - Campinas - São Paulo

Curso de Atualização em Doença de Chagas - 5 a 9 de Novembro de 1992 - Caxambu - Minas Gerais

### **• Apresentações de Trabalhos em Congressos**

1. L.M. Fagundes, M. Haun, R.De Conti, R.A. Pilli, Durán N. e De Castro, S.L. "Activity of 3-dimethylaminopropene-1-ene derivatives against *Trypanosoma cruzi*", XVIII Reunião Anual da Doença de Chagas, Novembro, Caxambú, M.G. Mem.Inst. Oswaldo Cruz (R.J). 87, 198 (1992).

2. R.De Conti, R.A. Pilli, M. Haun, S.L. De Castro, L.M. Fagundes e N. Durán "Activity of 3-dimethylaminopropene-1-ene derivatives. Evaluation of cytotoxicity and trypanocidal Activities", 5th Braz. Meet. Org. Synthesis, Campinas, S.P., Resumo 163 (1992).

3. S.L. De Castro, R.M. Santa Rita, M. Haun, R. De Conti, R.A. Pilli, S.M.N. Gimenez, A. Faljoni-Alario e N. Durán, "Synthesis, trypanocidal activities and toxicity of propene-1-amine derivatives" XX Reunião Anual da Doença de Chagas, Novembro, Caxambú, M.G. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (RJ). 88, 241 (1993).

4. R. De Conti, R.A. Pilli, M. Haun, L.M. Fagundes, A. Faljoni-Alario e N. Durán, "Mechanism of action of nitro-dimethylpropene-1-amine derivatives on epimastigote of *T. cruzi*", XXII Reunião Anual da SBBq, Caxambu, M.G. Resumo 170 (1993).

5. S.L. De Castro, R.M. Santa Rita, E.M. De Souza, M. Haun, R. De Conti, R.A. Pilli, S.M.N. Gimenez, W.F. Jardim e N. Durán, "Structural variation and their role in the trypanocidal activity of 3-aminopropene derivatives" XXI

Reunião Anual da Doença de Chagas, Novembro, Caxambú, M.G. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (RJ). 89, 185 (1994).

6. P.S. Melo, M. Haun, R. De Conti e N. Durán, "Biosynthesis versus synthesis of polypyrroles" 6th. Meet. Organic Synthesis, São Paulo, S.P., Abstr. 83 (1994).

7. R. De Conti, S.L. De Castro, M. Haun, R.A. Pilli, A. Faljoni-Alario e N. Durán, "Attempt to understand the antichagasic activities of 3-dimethylaminopropen-1-ene derivatives" XXIII Reunião Anual da SBBq, Caxambú, M.G. Resumo O-1 (1994).

8. De Conti, Haun, M., De Castro, S.L. e Durán, N. "Biological properties of 3-dimethylaminopropene derivatives: Acute toxicity and trypanocidal activity," XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, M.G. Abstract O-23, p.186 (1995).

9. De Conti R., Melo, P.S., De Castro, S.L., Haun, M. e Durán, N. "Citotoxicity evaluation of 3-aminopropene derivatives with trypanocide activity", XXII Reunião Anual de Pesquisa em Doença de Chagas, Caxambú, M.G., Abstract QT-6 (1995).

10. D.A. De Oliveira, A.M.A.P. Fernandes, R. De Conti, S.G. Moraes, M. Haun e N. Durán, "Antichagasicos: Síntese, separação de isômeros e avaliação de atividade biológica de N,N-dimetil-2-propen-1-amina" 19<sup>o</sup> Reunião Anual da SBQ, Aguas de São Pedro, M.G. (1996).

11. De Oliveira, D. A., Fernandes, A.M.A.P., De Conti, R., Haun, M., De Castro, S.L. e Durán, N. "Propriedades biológicas dos isômeros de N,N-dimetil-2-propen-1-amina" XI Reunião Anual FESBE, Caxambú, M.G. (1996).

12. Pereira, D.G., De Conti, R., Souza-Brito, A.M., Haun, M. e Durán, N. "Toxicidade aguda e determinação da DL50 de antichagasicos N,N-dimetil-2-propen-1-amina", XI Reunião Anual FESBE, Caxambú, M.G. (1996).

**• Publicações**

1. R. De Conti, Santa-Rita, R.M, De Souza, E.M., Melo, P.S., Haun, M., De Castro S.L. and Durán, N. "In Vitro Trypanocidal Activities of a Novel Series of N,N-Dimethyl-2-propen-1-amine Derivatives". *Microbios*, 85, 83,(1996).
2. R. De Conti, S.M. Gimenez, M.Haun, R.A. Pilli, S.L. De Castro and N. Durán, "Synthesis and biological activities of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives" *Eur. J. Med. Chem.*, no prelo (1996).
3. N. Durán, R. De Conti e R.A. Pilli, "Processo de obtenção de derivados de 3-aminopropenos e separação de seus isômeros geométricos" Pedido de Privilégio PIBr. Aprovado (1996).