

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE DE DIARILPROPENAMINAS E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE O *Trypanosoma cruzi* E
MICOBACTÉRIAS**

Ana Olívia de Souza

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Campinas-SP

Setembro de 1999

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

So89s Souza, Ana Olívia de
Síntese de diarilpropenaminas e avaliação da atividade
biológica sobre o *trypanosoma cruzi* e micobactérias /
Ana Olívia de Souza. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

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

1. Doença de chagas. 2. Tuberculose. 3. *IN VITRO*.
4. Diarilpropenaminas. I. Durán Caballero, Nelson Eduardo.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

UNIDADE	IA
N.º CHAMADA:	TI/UNICAMP
	So89s
V.	Ex.
TOMBO BC/	40928
PROC.	278/00
C	☐
D	☒
PREÇO	311,00
DATA	13/04/00
N.º CPD	

CM-00142004-4

**"Olha, descobre este segredo: uma coisa são duas;
ela mesma e sua imagem."**

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

**"À papai e mamãe: Waltuir e Sebastiana
Meus irmãos: Roberto, Wanderley e Donizete
Minhas sobrinhas: Nathalia e Maria Giulia"**

**Que sempre compreenderam minhas
manias e pensamentos**

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Nelson Durán pela orientação, sugestões e apoio sempre constante.

À Daisy Nakamura Sato e Rubinho do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, pela realização dos ensaios de atividade antimicobacteriana, sugestões e principalmente pela amizade e cooperação.

À Profa. Dra. Solange de Castro da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, pela realização dos testes de atividade tripanossomicida.

Ao Dr. Jaime Rodrigues e Profa. Dra. Marcela Haun, do Instituto de Biologia da Unicamp, pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Ao Dr. Scott G. Franzblau do GWL Hansen's Disease Center, Baton Rouge, Louisiana, EUA, pelo fornecimento do corante Alamar Blue e acolhida em seu laboratório.

Ao Dr. Robert C. Cooksey do Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, EUA, pela doação das cepas de micobactérias.

À Silvana Rocco e Dr. José Eduardo Barbarini pelo auxílio na interpretação dos espectros de RMN.

Aos alunos de iniciação científica: Fernanda Cristina, Tatiani, Janaina, Fernando e João Fernando pela colaboração e dedicação.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradecimentos

À FAPESP pelo apoio financeiro e à Assessoria pelas sugestões pertinentes.

Aos colegas de Laboratórios: Anna Maria, Buba, Chico, Daniel, Dárcio, Denise, Euler, Joel, Josy, Livia, Mariângela Santiago, Natália, Patrícia, Patrício, Pedro, Raquel, Renato, Rinaldo, Ronaldo, Rosana, Sandrinha, Skin, Teresa e Valéria pela agradável convivência. Particularmente à Dra. Roseli de Conti, Dra. de Burgos e Dra. Giselle Zenker Justus pelas sugestões e críticas.

RESUMO

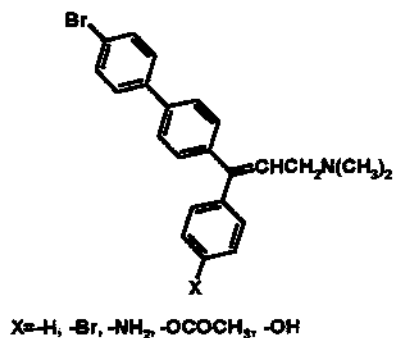
**Síntese de diarilpropenaminas e avaliação da atividade biológica sobre o
Trypanosoma cruzi e micobactérias**

Ana Olívia de Souza

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Palavras chaves - Doença de Chagas, tuberculose, *in vitro*, diarilpropenaminas

Neste estudo, os compostos derivados de diarilpropenaminas 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (X=H, -Br, -NH₂, -OCOCH₃ e -OH) foram sintetizados através de uma acilação de Friedel-Crafts seguida por reação de Wittig. Os compostos onde X=OH e -NH₂ foram avaliados sobre as formas tripomastigotas e epimastigota de *T. cruzi* e apresentaram ID₅₀, respectivamente de 29,1 ± 2,1 e 121,7 ± 12,0 µmol L⁻¹ para tripomastigota e 16,5 ± 1,7 e 71,7 ± 6,2 µmol L⁻¹ para epimastigota. A atividade antimicobacteriana dos derivados de diarilpropenaminas (X=H, -Br, -OH e -NH₂) também foi determinada frente à diferentes cepas padrões (ATCC) de *Mycobacterium* e cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes portadores de tuberculose e verificou-se potencial atividade bacteriostática e bactericida para estes compostos.



Estrutura das diarilpropenaminas

ABSTRACT

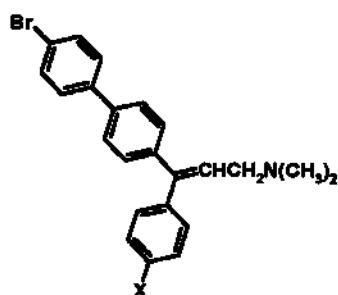
**Diarylpropenamines synthesis and its evaluation of the biologic activity on
Trypanosoma cruzi and *Mycobacteria***

Ana Olívia de Souza

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Key-Words - Chagas disease, tuberculosis, *in vitro*, diarylpropenamines

In this study, the diarylpropenamines derivatives of 3-(4'-bromine-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-3-(4-X-phenyl)-N,N-dimethyl-2-propen-1-amine (X=H, -Br, -NH₂, -OCOCH₃ or -OH), were synthesized through an Friedel-Crafts acilation followed by Wittig reaction. The effects of the diarylpropenamines, X=OH and -NH₂ were evaluated on the forms trypomastigote and epimastigote of *T. cruzi*. The ID₅₀ values were $29,1 \pm 2,1$ and $121,7 \pm 12,0$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ for tripomastigote, respectively, and $16,5 \pm 1,7$ and $71,7 \pm 6,2$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ for epimastigote, respectively. The antimycobacterial activity of the diarylpropenamines derivatives (X=H, -Br, -OH or -NH₂) was also determined. Potential antimycobacterial activity was found to standard strains of *Mycobacterium* (ATCC) and *M. tuberculosis* from clinical specimens.



X=H, -Br, -NH₂, -OCOCH₃, -OH

Structure of diarylpropenamines

Atividades acadêmicas desenvolvidas no período

1). Trabalhos Publicados

1. De Souza, A.O., Sato, D.N., Aily, D.C.G.; Durán, N. *In Vitro* Activity of N,N-Dimethyl-2-propen-1-amines against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42:407-408. 1998.
2. De Souza, A.O.; Aily, D.C.G. Aily, Sato, D.N.; Durán, N. Atividade da Violaceína *in vitro* sobre *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 59:59-62. 1999.
3. De Souza, A.O. Alderete, J.B. Sato, D.N.; Durán, N. Structure activity relationship analysis of 4'-Bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl 4-X-phenylmetanone derivatives and activities against *Mycobacterium tuberculosis*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 49: 00-00. No Prelo. 1999.
4. Martins de Azevedo, M.B.; Alderete, J.; Rodrigues, J.A.; De Souza, A.O.; Faljoni-Alario, A., Durán, N. Biological activities of new antitumoral of Indole derivatives in a inclusion complex with Cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* No prelo. 1999.

2). Patentes (Brasil)

- 1- De Souza, A.O.; Durán, N. Processo de formulação de N,N-Dimetil-2-propen-1-amina anti *Mycobacterium tuberculosis*. PI Br 9802755. 1998.
- 2- De Souza, A.O.; Durán, N. Atividade antimicobacteriana dos derivados de 4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il 4-X-fenilmetanona e toxicidade aguda em *Escherichia coli*. PI Br 9805831-2. 1998.
- 3- Durán, M.A.; Haun, M.; De Conti, R.L.; De Souza, A.O.; Durán, N Síntese, propriedades tripanossomicidas e toxicidade de *p*-bromobifenil X-metanonas (X=N-metil-3-indolila e furanila) e 3-4'-bromo[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-X)-N,N-dimetil-2-propen-1-aminas (X=N-metil-3-indolila, furanila). PI Br 9805381-7. 1998.
- 4- De Souza, A.O.; Durán, N. Síntese e atividade antileishmaniasse de derivados de N,N-dimetil-2-propen-1-amina. PI Br 9902748-8. 1999.

3). Participações em reuniões científicas nacionais e internacionais

- 1- Sato, D.N.; Aily, D.C.G.; Cândido, R.H.; De Souza, A.O.; Durán, N. Determinação da atividade *in vitro* da violaceína e 1-(4'bromo-4-bifenil)-1-fenil-3-dimetilaminopropeno frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. IX Congresso Brasileiro de Infectologia. 1996.
- 2- De Souza, A.O.; De Conti, R.; Durán, N. Synthesis of two new antichagasic leader compounds: 3-(4'bromo[1,1'-biphenyl]-4-yl)-3-(4-X-phenyl)-N,N-

- dimethyl-2-propen-1-amine (X=p-NH₂, OH). VII Brazilian Meeting on Organic Synthesis. 1996.
- 3- Durán, N.; Haun, M.; Pilli, R. A.; Faljoni-Alario, A.; De Castro, S. L.; Souza-Brito, A. R.; Sato, D.N.; Aily, D.C.G.; De Conti, R.; Pereira, D.G.; De Souza, A.O.; De Oliveira, D.A.; Fernandes, A.M.P.A.; Souza, E.M.; Santa-Rita, R.M. Síntese e atividades biológicas de derivados de N,N-dimetil-2-propen-1-aminas. Seminário de avaliação do subprograma PADCT-QEQ - Rio de Janeiro. 1996.
 - 4- Durán, N.; Haun, M.; Pilli, R. A.; Faljoni-Alario, A.; De Castro, S.; Sato, D. N.; Aily, D. C. G.; Pereira, M. F.; Antônio, R. V.; De Souza, A.O.; Rettori, D.; Melo, P. S.; Sato, L. M.; Jardim, L. Estudos de atividade tripanocida, antibacteriana e antitumoral da violaceína e de derivados. Seminário de avaliação do subprograma PADCT-QEQ - Rio de Janeiro. 1996.
 - 5- Durán, N.; Haun, M.; Pilli, R.A.; Faljoni-Alario, A.; De Castro, S.L.; Souza-Brito, A.R.; De Conti, R.; Pereira, D.G.; De Oliveira, D.A.; Fernandes, A.M.P.A.; De Souza, A.O.; De Souza, E.M.; Santa-Rita, R.M. Synthesis and biological activity of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives. Ist Congress of Pharmaceutical Sciences. *Boll. chin. Farmaceutico* 136:159. 1997.
 - 6- Sato, D.N.; Aily, D.C.G.; Cândido, R.H.; De Oliveira, D.A.; Pereira, D.G.; De Souza, A.O.; Durán, N. Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (CBM) of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. Ist Congress of Pharmaceutical Sciences. *Boll. Chin. Farmaceutico* 136: 160. 1997.
 - 7- Oliveira, D.A., De Souza, A.O., Fernandes, A.M.P., Durán, M., Pereira, D.G., Rodriguez, J.A., Melo, P.S., de Castro, S.L., Souza-Brito, A.R.M., Haun, M., De Conti, R., Esposito, E., Durán, N. Synthesis of new 2-propen-1-amine derivatives, trypanocide activities and their squalene epoxidase activity inhibition. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92 (suppl. I): 329. 1997.
 - 8- De Souza, A.O.; Souza, C.A.; Sato, D.N.; Durán, N. *In vitro* Antimycobacterial activities of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives. 98TH ASM - General Meeting. Atlanta-GE/EUA. 1998.
 - 9- De Azevedo, M.B.M.; Souza, C.A.; Sato, D.N.; De Souza, A.O.; Durán, N. Activity *in vitro* of Violacein and derivatives from *Chromobacterium violaceum* against *Mycobacterium tuberculosis*. 98TH ASM General Meeting. Atlanta-GE/EUA. 1998.
 - 10- Martins de Azevedo, M.B.; Jardim, L.S.A.; De Conti, R.; De Souza, A.O.; Durán, N. Synthesis and biological activities of indole and violacein glycosides. XXVII Reunião Anual da SBBq. p. 68. Caxambú-MG. 05/1998.
 - 11- De Souza, A.O. Sato, D.N., Mironi, T., Durán, N. Synthesis of antimycobacterial compounds: Diarylketone and 2-propen-1-amine. XXIII Congreso Latinoamericano de Quimica & 57^{MA} Conferencia de Quimica Y Exhibicion & 6^{TA} Conferencia de Quimica Ambiental del Caribe. QPN-K-4. San Juan - Puerto Rico. 1998.
 - 12- De Souza, A.O.; Alderete, J.B.; Sato D.N.; Durán, N. Structure activity relationship by principal component analysis of 4'-Bromo[1,1'-biphenyl]-4-Il-4-X-

- phenyl metanone (BPM) derivatives. 14th International Conference on Physical Organic Chemistry. p.103. Florianópolis-SC. 1998.
- 13- De Souza, A.O., Polaquevitch, P.F.C.; Alderete, J.B.; De Castro, S.L.; Durán, N. Trypanocidal activity of hydroxylated derivative of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine. XXV Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas e XIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93:315. 1998.
- 14- Rodríguez, J.A., Haun, M., De Souza, A.O., Martins de Azevedo, M. B.; Durán, N. La importancia del Sistema utilizado para la evaluacion de toxicidad *In vitro*. El caso de la violaceina. The importance of the system used in the in vitro toxicity assessment. The case of violacein. IV Congreso Nacional de Biotecnologia. p. 113. Talca-Chile. 1998.
- 15- De Souza, A.O.; Sato, D.N.; Santos Jr. R.R. and Durán, N. *In vitro* antimycobacterial activities of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives against drug-sensitive and resistant *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v strains. 2nd Congress of Pharmaceutical Sciences. *Boll. Chin. Farmaceutico* 138: CXV. 1999.
- 16- De Souza, A.O.; Sato, D.N.; Santos Jr, R.R. and Durán, N. Atividade antimicobacteriana dos derivados hidroxilados de N,N-dimetil-2-Propen-1-amina. XXXV Cong. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 32 (suppl. 1):411. 1999.
- 17- De Azevedo, M.B.M.; Sato, D.N.; De Souza, A.O.; and Durán, N. Atividade do complexo de violaceína/ β -ciclodextrina *in vitro* sobre o *Mycobacterium tuberculosis*. XXXV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 32 (suppl. 1):401. 1999.
- 18- De Souza, A.O.; Sato, D.N.; Santos Jr, R.R. and Durán, N. 4'-Bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl 4-X-phenyl metanone derivatives: Antimycobacterial activity and acute toxicity against *Escherichia coli*. XXVIII Reunião Anual da SBBq, p. 150. 1999.
- 19- De Souza, A.O.; Julio, J.F.F. and Durán, N. Synthesis of 3-(4'-bromo[1,1'-biphenyl]-4-yl)-3-(4-aminophenyl)-N,N-dimethyl-2-propen-1-amine derivative and antimycobacterial activity. 22^a- Reunião Anual da SBQ. MD039. 1999.
- 20- De Souza, A.O.; Gomes Cardoso, L.; Leon, L. and Durán, N. Study on the activity of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives against *Leishmania amazonensis* Promastigotes. Symposium - Drugs against Parasitic Diseases. Montpellier-França. 1999.
- 21- Rodrigues, A. P. O.; De Souza, A. O.; Hemerly, F. P.; Durán, N.; Queiroz, M. L. S. Crescimento e diferenciação de células hematopoiéticas de medula óssea em camundongos portadores de listeriose tratados com o derivado bromo de N,N-Dimetil-2-propen-1-amina. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. MB001. 1999.
- 22- De Souza, A.O.; Julio, J.F.; Hemerly, F.P; Rodrigues, J.A.; Haun, M.; Durán, N. N,N-Dimetil-2-propen-1-amina derivados: Toxicidade aguda em *Escherichia coli* e citotoxicidade em células fibroblásticas V-79. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. MH039. 1999.

4). Apresentações orais

- 1- N,N-Dimethyl-2-Propen-1-amine against Chagas Disease and Mycobacteria. Departamento de Farmacologia. G. W. L. Hansen's Disease Center. Louisiana - EUA. (06/06/98).
- 2- De Souza, A.O. Sato, D.N., Mironi, T., Durán, N. Synthesis of Antimycobacterium Compounds: Diarylketone and 2-propen-1-amine. XXIII Congreso Latinoamericano de Química & 57^{MA} Conferencia de Química Y Exhibicion & 6^{TA} Conferencia de Química Ambiental del Caribe. QPN-K-4. San Juan - Puerto Rico. 29/08/1998.
- 3- Strategies in Pharmaceutical Development: Antituberculosis. Universidad Metropolitana de San Juan. Puerto Rico. 31/08/1998.

5). Estágios

- 1- G. W. L. Hansen's Disease Center – Laboratório do Dr. Scott G. Franzblau 22/05 à 06/06/98 – Baton Rouge - LA - USA.
- 2- Centro de Controle de Doenças em Atlanta (CDC). 08 e 09/06/98. Laboratório do Dr. Robert Cooksey. Atlanta-GA. USA.

6). Cursos, Simpósios e Workshop

- 1- Microinformática - Introdução ao Unix - 05/1996. Centro de Computação da UNICAMP.
- 2- 3º Minisimpósio de Novas Tecnologias em Química e Biotecnologia de Materiais Renováveis. Instituto de Química - UNICAMP - Campinas - SP. 30/08/1997.
- 3- Tuberculose: Caminhos e Possibilidades. Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto-SP. 19-20/11/1998.

Índice

Lista de abreviaturas	i
Lista de Tabelas	ii
Lista de Figuras	iv
1) Introdução	1
1.1) Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2) Quimioterapia da Doença de Chagas	3
1.3) Tuberculose e <i>Mycobacterium</i>	9
1.4) Quimioterapia da Tuberculose	14
1.5) Testes de Citotoxicidade	21
2) Objetivos Gerais	24
2.1) - Objetivos específicos	24
3) Experimental	25
3.1) Síntese do derivado 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-aminofenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (5i, X=NH ₂)	26
a). Síntese do cloreto de ácido <i>p</i> -aminobenzóico a partir do SOCl ₂	26
b). Proteção do grupo amina do PABA com cloreto de <i>p</i> -toluenossulfonil e síntese do cloreto de ácido <i>p</i> -toluenossulfonilaminobenzóico	27
c). Síntese do cloreto de ácido <i>p</i> -toluenossulfonilaminobenzóico a partir do PCl ₃	28
d). Proteção do PABA com o grupo acetil e formação do cloreto de ácido <i>p</i> -acetamidobenzóico	29
3.2) Síntese dos compostos 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (5a, 5c, 5l, 5j, 5l e 5i)	30
a). Síntese do ácido 4-acetoxibenzóico e cloreto de ácido 4-acetoxibenzóico	31
b). Síntese das 4'-bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-X-fenil metanona (3a, 3c, 3e, 3g e 3j)	32
c). Desmetilação da 4'-bromo [1,1'-bifenil]-4-il 4-metoxifenil metanona (3g) e síntese da da 1,1'-[bifenil]-4-il 4-hidroxifenil metanona (20)	36
d). Reação de Wittig para síntese dos derivados de diarilpropenaminas	37
e). Hidrólise do composto 5j para síntese do derivado 5l	42

f). Redução do composto 5e para obtenção do derivado 5i	43
g). Síntese do composto 21	46
h). Separação dos isômeros geométricos dos compostos 5a e 5c	47
3.3) Ensaio Biológicos <i>In Vitro</i>	50
3.3.1) Determinação da Atividade tripanossomicida	50
3.3.2) Avaliação da Atividade Antimicobacteriana	51
a). Determinação do perfil de sensibilidade do <i>M. tuberculosis</i>	51
b). Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pela macrodiluição em tubos	53
c). Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas pela microdiluição em placa	54
3.3.3) Avaliação da citotoxicidade em Células Fibroblásticas	55
a). Manutenção da cultura celular	56
b). Quantificação de DNA (DNA)	57
c). Incorporação do corante vermelho neutro (VN)	57
d). Redução do sal de tetrazólio MTT (MTT)	58
4) Resultados e Discussão	59
4.1) Síntese do derivado 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-aminofenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (5i)	59
a). Síntese do cloreto de ácido <i>p</i> -aminobenzóico a partir do SOCl ₂	59
b). Proteção do grupo amina do PABA com cloreto de <i>p</i> -toluenossulfonil e síntese do cloreto de ácido <i>p</i> -toluenossulfonilaminobenzóico	59
c). Síntese do cloreto de ácido <i>p</i> -toluenossulfonilaminobenzóico a partir do PCl ₅	60
d). Proteção do grupo amina do PABA (6) com o grupo acetil e formação do cloreto de ácido <i>p</i> -acetamidobenzóico	60
4.2) Síntese dos compostos 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (5a, 5c, 5e, 5j, 5l e 5i)	61
a). Síntese do Ácido 4-acetoxibenzóico e Cloreto de ácido 4-acetoxibenzóico ...	61
b). Síntese das 4'-bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-X-fenil metanona (3a, 3c, 3e, 3g e 3j)	62
c). Desmetilação da 4'-Bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-metoxifenil metanona (3g) e	

síntese da 1,1'-[bifenil]-4-il 4-hidroxifenil metanona (20)	63
d). Reação de Wittig para síntese dos derivados de diarilpropenaminas	63
e). Hidrólise do composto 5j para síntese do composto 5l	65
f). Redução do composto 5e para obtenção do derivado 5i	65
g). Síntese do composto 2l	66
h). Separação dos Isômeros geométricos dos derivados 5a e 5c	67
4.3) Ensaios Biológicos <i>In Vitro</i>	68
4.3.1). Atividade tripanossomicida	68
4.3.2) Atividade Antimicobacteriana	69
a). Perfil de Sensibilidade das cepas de <i>M. tuberculosis</i> isoladas de pacientes	70
b). Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pela macrodiluição em tubos	71
c). Concentração Inibitória Mínima pela microdiluição em placa	73
4.3.3) Citotoxicidade em Células Fibroblásticas	78
5) Conclusões	83
6) Referências Bibliográficas	84
7). Anexo	96

Lista de Abreviaturas

ATCC - American Type Culture Collection

CBMs – Concentrações bactericidas mínimas

CCD – Cromatografia em camada delgada

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa

CIMs – Concentrações inibitórias mínimas

DMEM - Dullbeco Modified Eagle's Medium

MABA – Microplate Alamar Blue Assay

MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

SFB – Soro fetal bovino

VN – Vermelho neutro

SFM - Sistema fagocitário mononuclear

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Rendimentos de reação e propriedades físicas das metanonas **3a**, **3c**, **3e**, **3g**, **3j** e **20**.

Tabela 2 - Análise Qualitativa de Bromo (EDXRF) do composto **20**.

Tabela 3 - Rendimentos de reação e propriedades físicas dos derivados de diarilpropenaminas **5a**, **5c**, **5e**, **5i**, **5j**, **5l** e **21**.

Tabela 4 - Propriedades físicas dos isômeros geométricos *E* e *Z* dos compostos **5a** e **5c**.

Tabela 5 - Critérios de resistência do *M. tuberculosis* H₃₇Rv aos antimicrobianos.

Tabela 6 - Atividade tripanossomicida dos derivados de diarilpropenaminas, Nifurtimox e Cristal Violeta.

Tabela 7 - Perfil de sensibilidade das cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes.

Tabela 8 - CIMs frente as cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. malmoense* e cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes (identificadas por números).

Tabela 9 - CBM frente as cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. malmoense* e cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes (identificadas por números).

Tabela 10 - CIM em $\mu\text{mol L}^{-1}$, frente as cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Ra, *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. kansasii* (Mk), *M. avium* (Ma), *M. malmoense* (Mm), *M. cellatum* (Mc), *M. intracellulare* (Mi) e cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes (identificadas por números).

Tabela 11 - CIM de drogas utilizadas na quimioterapia da tuberculose para cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. tuberculosis* H₃₇Ra, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. malmoense* e *M. cellatum*.

Tabela 12 - CIM de drogas utilizadas na quimioterapia da tuberculose para *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294.

Tabela 13: Citotoxicidade dos derivados de diarilpropenaminas.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estruturas dos compostos Nifurtimox e Benzonidazol.

Figura 2 - Estruturas do Alopurinol, 22,26-Azasterol, Itraconazol, D0870 e Cetoconazol.

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura de ácidos micólicos.

Figura 4 - Estrutura da Estreptomicina e Rifampicina.

Figura 5 - Estrutura da Isoniazida, Nicotinamida e Pirazinamida.

Figura 6 - Estrutura do Etambutol e Fluorquinolonas.

Figura 7 - Estrutura do (A) brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) e (B) do corante hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] vermelho neutro (VN).

Figura 8 - Estrutura das hidrazonindolonas.

Figura 9 - Determinação do conteúdo total de DNA de células V79 expostas aos derivados de diarilpropenaminas (5I, 5i e 2I).

Figura 10 - Avaliação da integridade lisossomal (VN) de células V79 expostas aos derivados de diarilpropenaminas (5I, 5i e 2I).

Figura 11 - Avaliação da integridade mitocondrial (MTT) de células V79 expostas aos derivados de diarilpropenaminas (5I, 5i e 2I).

Figura 12 – Espectroscopia no IV do composto **11** (KBr cm^{-1}).

Figura 13 – Espectroscopia no IV do composto **16** (KBr cm^{-1}).

Figura 14 – Espectroscopia no IV do composto **19** (KBr cm^{-1}).

Figura 15 – Espectro de RMN¹H do composto **19** (KBr cm^{-1}).

Figura 16 - Espectroscopia no IV do composto **1j** (filme cm^{-1}).

Figura 17 - Espectro de RMN¹H do composto **3g** (300 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

Figura 18 - Espectro de RMN¹H do composto **3j** (300 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

Figura 19 – Espectro de RMN¹H do composto **20** (300 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

Figura 20a - Espectrometria de massa do composto **20** (EI - 70 eV).

Figura 20b - Fluorescência de Raio-X do composto **20**.

Figura 21a – Espectroscopia no IV do composto **3g** (KBr cm^{-1}).

Figura 21b - Espectroscopia no IV do composto **20** (KBr cm^{-1}).

Figura 22 - Espectro de RMN¹H do composto **5a** (500 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

Figura 23 - Espectro de RMN¹H do composto **5c** (500 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

Figura 24 - Espectro de RMN¹H do composto **5e** (500 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

Figura 25 - Espectro de RMN¹³C do composto **5e** (125 MHz; CDCl₃/TMS, δ).

Figura 26 - Gráfico de Contorno COSY do composto **5e**.

Figura 27 - Expansão do gráfico de Contorno COSY do composto **5e**.

Figura 28 - Gráfico de Contorno HMQC do composto **5e**.

Figura 29 - Expansão do gráfico de Contorno HMQC do composto **5e**.

Figura 30 - Gráfico de Contorno HMBC do composto **5e**.

Figura 31 - Expansão do gráfico de Contorno HMBC do composto **5e**.

Figura 32 - Espectro de RMN¹H do composto **5j** (500 MHz; CDCl₃/TMS, δ).

Figura 33 - Espectro de RMN¹H do composto **5l** (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ).

Figura 34a - Espectrometria de massa do composto **5l** (EI - 70 eV).

Figura 34b - Espectrometria de massa do composto **5i** (EI - 70 eV).

Figura 35 - Espectro de RMN¹H do composto **5i** (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ).

Figura 36a - Espectro de RMN¹H do composto **21** (500 MHz; CDCl₃/TMS, δ).

Figura 36b - Espectrometria de massa do composto **21** (EI - 70 eV).

Figura 37 - Espectro de RMN¹H do composto **5aE** (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ).

1) Introdução

1.1) Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

Primeiramente descrito por Carlos Chagas, o *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, uma tripanossomíase de natureza endêmica que atinge grande parte do continente americano, principalmente a América do Sul. Esta enfermidade contamina 16-18 milhões de pessoas na América Latina (Dias, 1997; Schmunis e col., 1997) e está relacionada ao nível social do homem. Estima-se que no Brasil cerca de 3,5 milhões de pessoas estejam infectadas com o *T. cruzi* (Siqueira-Batista e col., 1993). Atualmente, a situação da doença de Chagas no Brasil pode ser considerada estável com relação às perspectivas de controle, mas ainda é necessário assegurar a continuidade e a qualidade mínima do controle do inseto vetor (Dias, 1997).

Originalmente a tripanossomíase era uma enzootia, acometendo exclusivamente animais silvestres; entretanto, tornou-se uma zoonose devido ao desequilíbrio causado pelo maior contato do homem com o domicílio do agente causador da doença (Dias, 1989). Embora tipicamente rural, esta doença passou por um processo de urbanização, resultante das frequentes migrações do homem do campo para a cidade e da transmissão por transfusão sanguínea (Shirmer e col., 1995; Sztajzel e col., 1996; Crovato e Reborá, 1997). A transfusão sanguínea é de grande relevância na epidemiologia da doença sendo a segunda causa mais comum de transmissão da doença (Blejer e col., 1999). Nos Estados Unidos há registros de transmissão congênita durante o período de gestação (Leiby e col., 1999; Di Pentima e col., 1999) e um aumento no número de indivíduos infectados, o que também está ocorrendo no continente europeu (Hagar e Rahimtoola, 1991; Sztajzel e col., 1996).

O ciclo biológico do *T. cruzi* compreende uma fase em insetos vetores denominados triatomíneos - gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius*, etc - e outra no hospedeiro mamífero, em cujos tecidos se aloja. O triatomíneo é um inseto hematófago e a contaminação do homem se dá através da deposição de fezes infectadas na pele ou mucosa do homem, durante ou após a picada. No momento da contaminação ocorre a penetração de formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* na corrente sanguínea. Estas formas invadem o sistema fagocitário mononuclear (SFM) e se transformam em amastigotas (intracelular). Em seguida, estas se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas infectando outras células do organismo (Neves, 1988).

O *T. cruzi* é um parasita intracelular que invade células nucleadas do hospedeiro mamífero para sobreviver e se reproduzir (Bronia e col., 1999). O protozoário promove uma modulação das funções dos macrófagos e pode sobreviver intracelularmente durante a fase aguda e crônica da infecção (Bogdan e col., 1999; Aliberti e col., 1999).

A doença de Chagas ocorre em 30% dos indivíduos infectados com o *T. cruzi* (Tarleton e Zhang, 1999) e apresenta amplo espectro de manifestações clínicas, agudas e crônicas. Os sintomas variam desde simples febre até um quadro grave de miocardite. Os principais sintomas são: febre, edema indolor, adenomegalia, hepatomegalia e problemas cardíacos. A prevalência da fase crônica leva à lesões irreversíveis no trato gastrointestinal e cardíaco (Siqueira-Batista e col., 1993; Andrade e col., 1997).

O envolvimento de componentes do sistema imune foi fundamentado na presença de anticorpos circulantes e linfócitos T específicos em pacientes ou em animais experimentalmente infectados (Kierszenbaum, 1999; Tarleton e Zhang, 1999). Estudos indicam haver uma imunossupressão durante a fase crônica da infecção experimental em ratos (Didoli e col., 1999). Nesta fase, o número de parasitas presentes no paciente é baixo, mas o potencial de lesões

cardíacas é comparável ao da fase aguda, onde há um grande número de parasitas (Anez e col., 1999).

1.2) Quimioterapia da Doença de Chagas

Na ausência de vacina para a prevenção e de uma quimioterapia segura, várias tentativas para o tratamento específico da doença de Chagas foram realizadas. Produtos de origem natural foram utilizados em triagens na busca de um antichagásico (Durán e col., 1989; De Castro e col., 1994) e um número considerável de medicamentos sintéticos já foram ensaiados. Grande parte destas substâncias foram totalmente ineficazes, porém duas, o composto nitrofurânico Nifurtimox [3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)-tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido] e o composto imidazólico Benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) (figura 1) são parcialmente efetivas no tratamento da fase aguda da doença em humanos. Desprovidas de atividade na fase crônica e altamente tóxicas (Rassi, 1982; Cançado, 1985; Ferreira, 1988; Fairlamb, 1990; De Toranzo e col., 1997), ambas produzem efeitos colaterais agudos em doses terapêuticas e o Nifurtimox causa neurotoxicidade e desordens digestivas. Há divergências com relação ao uso do Benzonidazol, cujo efeito benéfico é defendido por Andrade e col. (1996) enquanto que, uma maior precaução com relação a esta terapêutica é recomendada por Bestetti (1997).

Os efeitos adversos do Benzonidazol são similares aos do Nifurtimox, os quais são distúrbios dermatológicos, polineuropatias, distúrbios gastrointestinais, cefaléia e tontura (Ledesma, 1988; De Castro, 1993; Viotti e col., 1994). Além disso, testes de avaliação de mutagenicidade também indicaram que Nifurtimox e Benzonidazol são potencialmente genotóxicos

(Nagel, 1987; Souza e col., 1991). Coelhos tratados com ambas as drogas apresentaram alta incidência de linfomas malignos (Teixeira e col., 1990) e o tratamento de crianças chagásicas com Benzonidazol ou Nifurtimox induziu alterações genéticas em linfócitos periféricos (Gorla e col., 1989). A literatura também relata o aparecimento de neoplasmas malignos associado ao uso de Benzonidazol (Bocchi e col., 1998). O Nifurtimox teve sua produção reduzida desde o começo dos anos 90 e nos Estados Unidos somente é encontrado no Centro para Controle de Doenças. O Benzonidazol não é encontrado nos Estados Unidos, enquanto que no Brasil, é o único medicamento comercializado, específico para a Doença de Chagas. A alta prevalência de efeitos indesejados mesmo quando se utilizam baixas doses leva à interrupção do tratamento (Apt e col., 1986).

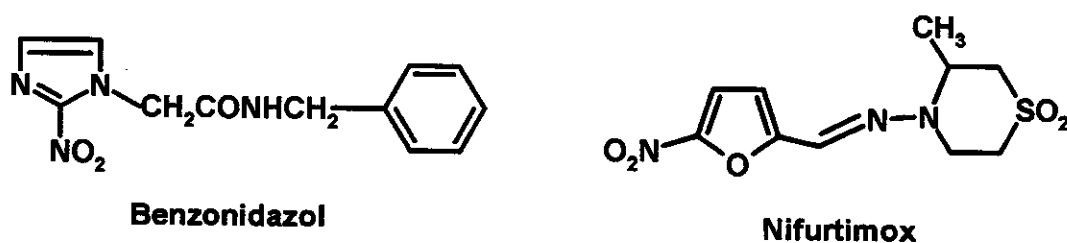


Figura 1 - Estruturas dos compostos Benzonidazol e Nifurtimox

Drogas como o Megazol, o Alopurinol, o Itraconazol e o Cetoconazol (**figura 2**), desenvolvidas e comercializadas para outros fins terapêuticos, foram avaliados para o tratamento da doença de Chagas (Filardi e Brener, 1982; Avila e col., 1987; De Castro e Meirelles, 1987; Fairlamb, 1990; Gallerano e col., 1990; Urbina e col., 1991, 1996ab).

Os derivados azólicos como Itraconazol e Cetoconazol se mostraram efetivos *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi* (Raether e Seidenath, 1984; McCabe e col., 1984; 1987; Beach e col., 1986). Estudos em modelos experimentais

(McCabe, 1988) e ensaios clínicos (Moreira e col., 1992; Brener e col., 1993) demonstraram que estes compostos são bastante eficazes em suprimir a proliferação do parasita, no entanto, são incapazes de induzir uma total cura parasitológica, particularmente na forma crônica da enfermidade. Urbina e col. (1996ab) utilizaram estes compostos para produção de complexos com íons metálicos de transição que têm maior atividade contra o *T. cruzi* e menor toxicidade às células hospedeiras *in vitro*. Por outro lado, estes complexos apresentam baixa atividade *in vivo*.

O derivado bis-triazólico, ICI 195,739 - (R,S)-2-(2,4-difluorfenil)-1-(3-[(Z)-4-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxi)stiril]-1,2,4-triazol-1-il)-3-(1,2,4-triazol-1-il)-propan-2-ol é um composto racêmico. Seu enantiômero - R(+) D0870 (figura 2) - é mais ativo que Cetoconazol *in vitro* contra o *T. cruzi*, sendo responsável pela maior parte da atividade do ICI 195,739. Em modelo experimental na fase aguda, o D0870 foi 30-50 vezes superior ao Cetoconazol ou Nifurtimox em prolongar a sobrevivência de animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Também promoveu 60-70% de cura parasitológica nos animais infectados, o que não ocorreu com as drogas atualmente empregadas mesmo em doses maiores. Resultados similares foram obtidos em um modelo crônico da doença (Maldonado e col., 1993; Urbina e col., 1991; 1995; 1996ab). Apesar da alta eficiência em testes *in vitro* e animais experimentalmente infectados, o desenvolvimento do composto D0870 foi interrompido devido à variabilidade na farmacocinética. O derivado triazólico SCH56592 tem atividade tripanossomicida comparável ou superior ao D0870 e se apresenta como bom candidato para triagem clínica em pacientes cronicamente infectados (Urbina, 1998).

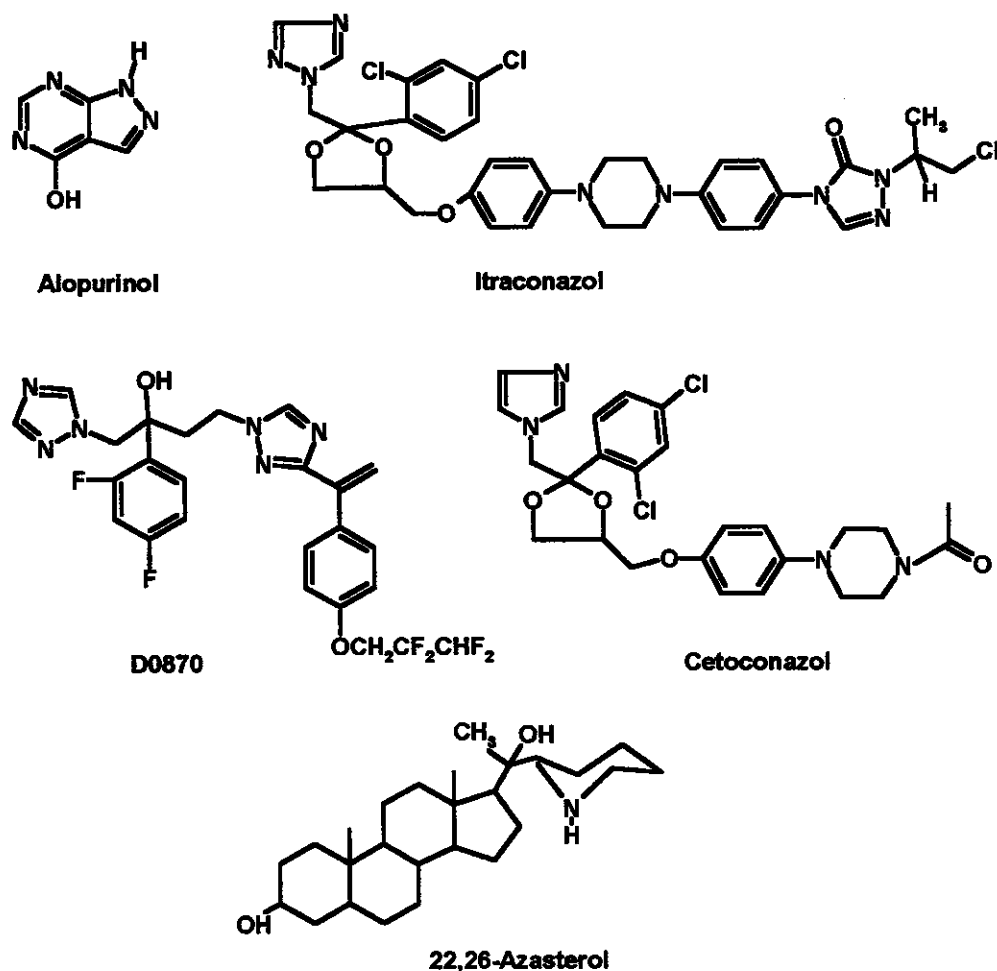


Figura 2 - Estruturas do Alopurinol, 22,26-Azasterol, Itraconazol, D0870 e Cetoconazol.

O tratamento combinado com compostos 22,26-azasterol (AZA) e Cetoconazol produziu cura parasitológica de animais infectados com *T. cruzi* (Urbina e col., 1996ab), corroborando evidências da literatura que sugerem a baixa eficiência dos azóis comercialmente disponíveis para erradicar o *T. cruzi* em humanos ou em infecção experimental quando usados isoladamente (McCabe, 1988; Moreira e col., 1992; Brener e col., 1993).

Barrett e col. (1982) iniciaram o estudo de derivados de diarilpropenaminas. O composto 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina, também designado pela sigla 353C (**5b**, **esquema 1**) foi estudado em camundongos infectados com quatro diferentes cepas do *T. cruzi*. Utilizando-se as cepas BG, peruana, MI (argentina) ou Y (brasileira), a administração crônica (30 dias) deste composto como sal de tartarato, nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg foi capaz de erradicar totalmente os parasitas em 45, 81 e 95% dos camundongos infectados, respectivamente. O composto ainda revelou-se aproximadamente 10 e 20 vezes mais ativo do que o Benzonidazol e o Nifurtimox, respectivamente (Barret e col., 1982; Neal e Bueren, 1988). 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 Benzonidazol (Neal e Bueren, 1988).

Derivados de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (**5a-h**, **esquema 1**, página 25) foram estudados em nosso laboratório (De Conti e col., 1996ab) e obtidos por uma rota sintética em duas etapas conforme o **esquema 1**. Estes derivados de diarilpropenaminas são caracterizados por uma substituição na posição *para* do anel fenila e apresentam isômeros geométricos *E* e *Z* (De Conti e col., 1996ab). Estruturalmente, apresentam propriedade catiônica anfifílica que consiste de um grupo amina básico, ligado por uma cadeia curta a grupos aromáticos hidrofóbicos (Lüllmann e col., 1978).

A atividade tripanossomicida destas diarilpropenaminas foi avaliada *in vitro* para os três estágios evolutivos do *T. cruzi*. As três formas do ciclo de vida do parasita (amastigota, epimastigota e tripomastogota) foram susceptíveis a estes compostos, sendo que os derivados **5a** e **5c** apresentaram

melhor atividade tripanossomicida dentre a série estudada. Observou-se uma eficácia de 10-15 vezes maior do que o Nifurtimox e Violeta Genciana, utilizada no tratamento profilático em bancos de sangue (De Castro e col., 1994; De Conti e col., 1996ab). Particularmente o composto 5c foi altamente eficiente quando administrado em animais experimentalmente infectados, havendo uma redução da parasitemia (Pereira e col., 1998).

Os derivados de diarilpropenaminas foram avaliados para a toxicidade aguda sobre a bactéria *Escherichia coli* e a citotoxicidade em células fibroblásticas de hamster chinês. Nas duas metodologias utilizadas os resultados foram similares sendo os compostos 5a, 5b, 5c, 5d e 5h os menos tóxicos (De conti e col., 1996ab; 1998).

Em um estudo de toxicidade em ratos e cães para o derivado 5b, Barret e col. (1982) demonstraram não haver comprometimento hematológico, bioquímico ou histopatológico nestes animais. Dados preliminares também sugerem que o composto 5a não induz alterações comportamentais ou neurológicas em ratos (Pereira, 1999).

Embora a quimioterapia da doença de Chagas compreenda uma área de pouco interesse para a indústria farmacêutica, uma vez que, qualquer programa de pesquisa nesta área envolveria custos elevados pouco justificáveis do ponto de vista econômico (Gutteridge, 1987), o desenvolvimento de novas drogas mais ativas e menos tóxicas, potencialmente úteis no tratamento etiológico da doença de Chagas ainda se faz necessário, em vista do grave problema médico-social a qual se constitui. Deve-se considerar também o alto custo financeiro no que diz respeito a gastos com drogas, marcapassos e intervenções cirúrgicas (transplante cardíaco, correção de megaesôfago e megacólon) decorrentes dessa doença, bem como a incapacitação do indivíduo para o trabalho que exige esforço físico, principalmente do homem do campo (Siqueira-Batista e col., 1993).

No estudo racional para a quimioterapia da doença de Chagas a estratégia básica consiste em explorar diferenças bioquímicas entre parasita e hospedeiro. Neste sentido, o objetivo é a identificação de aspectos bioquímicos do parasita que sejam essenciais para a sua sobrevivência e preferencialmente ausentes em mamíferos e ainda, o isolamento e caracterização de sítios-alvos no parasita. As novas drogas interferem nas etapas enzimáticas do metabolismo do parasita. Dentre estas substâncias destacam-se os inibidores da biossíntese do ergosterol, inibidores de proteases, inibidores da tripanotona redutase, fumarato redutase, topoisomerases, proteases, etc. (Cazzulo e col., 1997; De Craecker e col., 1997; DoCampo e Schmuflis, 1997; Souza e col., 1998; Bond e col., 1999; Croft, 1999; Turrens e col., 1999).

1.3) Tuberculose e *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* é representado principalmente pelo *M. tuberculosis* e outras espécies como o *M. bovis*, *M. avium*, *M. malmoense*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. cellatum*, *M. scrofulaceum*, *M. paratuberculosis*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. xenopi* e, etc. (Burnett e col., 1978). Muitas infecções micobacterianas, caracterizadas por lesões necrosantes na pele e causadas por *M. ulcerans*, *M. marinum* e *M. haemophilum* estão surgindo (Dobos e col., 1999). Outra forma de tuberculose é a hepática, denominada tuberculose hepatobiliar, cujos sintomas acometem principalmente o trato hepatobiliar (Alvarez, 1998).

O *M. avium* e o *M. intracellulare* formam o complexo *M. avium* (MAC) e estas são as micobactérias mais frequentemente encontradas em pacientes HIV infectados (Heifets, 1996). As infecções causadas por estes microrganismos não são transmitidas de uma pessoa para outra (Horsburgh e

col., 1994), embora infecções disseminadas causadas por MAC tenham ocorrido em mais de 24% de pacientes HIV-positivos nos Estados Unidos (Horsburgh, 1991; Horsburgh e col., 1991). A maior frequência de infecções pelo complexo MAC ocorre em casos avançados de AIDS devido a deficiência do sistema imunológico (Nightingale e col., 1992; Mayaud e Cadranet, 1999).

O *M. tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose, foi isolado e descrito em 1882 por Robert Koch. Nos últimos 200 anos a tuberculose foi responsável pela morte de 1 bilhão de pessoas. Nos Estados Unidos na década de 1980, já havia sido quase totalmente eliminada, mas reemergiu apresentando cepas resistentes à quimioterapia existente (Brock e col., 1994; Hart e col., 1996). Em 1993, a Organização Mundial de Saúde a declarou como uma infecção de emergência global e implementou vários programas para o seu controle. Apesar dos esforços, em 1995, o número de óbitos causados pela tuberculose foi maior do que em qualquer outro ano na história. Em 1997, houve mais de 7 milhões de novos casos, e o número de óbitos atingiu 3 milhões (World Health Organization, 1998).

O elevado número de indivíduos infectados se deve, pelo menos em parte, a alta incidência em pacientes HIV-positivos. Pacientes co-infectados com HIV e tuberculose apresentam 5-10% de probabilidade de manifestação da doença (Dolin e col., 1994; Duncan, 1997) e em países da África a tuberculose ocorre em mais da metade dos indivíduos HIV-infectados (De Cock e Chaisson, 1999). No Brasil, apesar dos esforços do Programa de Controle Nacional da Tuberculose, os dados apontam para 90 mil novos casos e mais de 5 mil mortes por ano (Brasil, 1999). Especificamente no estado de São Paulo, ocorre 18.000-19.000 novos casos/ano, totalizando 1.500 mortes/ano. Quando associada com doenças como a AIDS e/ou diabetes, o problema se agrava levando à 5.000 óbitos/ano (Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, 1998). As dificuldades encontradas

pelos programas de controle da tuberculose no Brasil e no mundo são agravados por problemas sociais como a pobreza e o uso de drogas (DeRiemer e col., 1999).

Micobactérias são organismos cuja parede celular é composta de arabinogalactanas (polissacarídeo ligado a um peptideoglicano por um trissacarídeo) e ácidos micólicos de cadeia longa ramificada (**figura 3**) (ácidos graxos esterificados, α -ramificado, β -hidroxilado) (Brennan, 1989; Daffe e col., 1990).

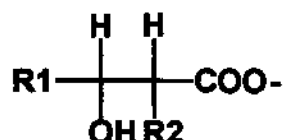


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura de ácidos micólicos. R1 e R2 são hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa.

Embora o método de Gram não seja eficiente para a classificação das micobactérias em Gram (+) ou Gram (-), estas são coradas pelo método de "Ziehl Neelsen" e podem ser consideradas Gram (+) verdadeiras (Brock e col., 1994). Há mais de 85 espécies de micobactérias e apenas poucas espécies são patogênicas para o homem. A infecção se manifesta principalmente quando o indivíduo apresenta deficiência do sistema imunológico (Bannister e col., 1996).

O *M. tuberculosis* tem um crescimento lento, que provavelmente está relacionado ao caráter hidrofóbico da parede celular que a torna fortemente impermeável aos nutrientes (Brock e col., 1994). São bacilos imóveis e curvos, não esporulam e não formam cápsula definida, contêm grânulos característicos de glicogênio e polimetáfosfato (inclusões de volutina), além de grandes mesossomas. As paredes celulares contêm até 60% de lipídeos, comparados

aos 20% e 25% presentes nas paredes celulares das bactérias Gram (-) e Gram (+), respectivamente. A perda da parede celular pode afetar substancialmente a velocidade de crescimento e a patogenicidade de micobactérias que são capazes de sobreviver sem a parede celular ou na forma protoplásmica. Consequentemente, a regeneração das micobactérias é essencial para a manifestação da infecção (Grange, 1992).

O *M. tuberculosis* é um parasita aeróbio facultativo, intracelular ou extracelular. Pode permanecer viável por longos períodos sem apresentar multiplicação (Wayne, 1976; Wayne e Lin, 1982) e este estado de latência é o resultado da adaptação à anaerobiose ou aos efeitos micobacteriostáticos dos macrófagos. A patogenicidade dos bacilos e a lesão que se desenvolve na tuberculose estão relacionados com os constituintes celulares do microrganismo: proteínas, polissacarídeos e lipídeos (Burnett e col., 1978).

A tuberculose é uma doença infecciosa e granulomatosa, cujo microrganismo causal tem predileção principalmente pelos pulmões, porém também infecta a pele, ossos, rins, meninges e nódulos linfáticos. Em contraste com estas infecções localizadas, a doença pode assumir a forma de uma infecção generalizada envolvendo um ou mais órgãos, ou ainda, pode aparecer como uma simples bronquite. No paciente com pouca resistência imunológica a tuberculose pode ser fulminante, resultando na destruição dos órgãos afetados em poucos meses (Burnett e col., 1978).

É conveniente distinguir dois tipos de tuberculose humana: primária e pós-primária (ou re-infecção). A infecção primária ocorre quando o indivíduo entra em contato pela primeira vez com o bacilo e frequentemente resulta da inalação de fluídos ou partículas contaminados com a micobactéria. Esta se estabelece no pulmão e se multiplica no interior dos macrófagos. Uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia resulta na formação de agregados de macrófagos ativados, denominados tubérculos. Em indivíduos com baixa

resistência imunológica as micobactérias não são efetivamente controladas e uma infecção pulmonar aguda se instala, causando extensiva destruição dos tecidos do pulmão, disseminação das micobactérias para outras partes do corpo e morte.

Em muitos casos a infecção aguda não se desenvolve, permanece localizada, entrando em latência. Esta infecção inicial hipersensibiliza o indivíduo à micobactéria ou aos produtos do seu metabolismo. Consequentemente, uma resposta imunológica imediata é esperada em subseqüentes infecções. No caso de re-infecção (infecção pós-primária) o processo será crônico envolvendo destruição dos tecidos do pulmão, cicatrização parcial e baixa disseminação das lesões dentro dos pulmões (Brock e col., 1994). Os bacilos ainda podem permanecer viáveis nos tecidos, apresentando baixo metabolismo e consequentemente não sendo efetivamente eliminados pelas drogas ou pelo sistema imune (Grange, 1992; 1997). A atividade do sistema imune não acompanha a velocidade de replicação da micobactéria e a tuberculose se instala.

Introduzido em 1921, o processo de imunização com a vacina BCG (Bacille Calmette-Guérin) é utilizado mundialmente na prevenção da tuberculose, mas apresenta algumas limitações. Sua efetividade é objeto de discussão e controvérsias porque o grau de eficácia varia de zero à 80% (Brasil, 1994). Uma nova vacina, com diferentes mecanismos de ação e alvos antigênicos está sendo desenvolvida com o objetivo de conferir imunidade ao indivíduo (Bonato e col., 1998; Lowrie e col., 1998, 1999; Silva e col., 1999). Ainda assim, a quimioterapia da tuberculose é o principal fator no controle da doença e a incidência de cepas multi-droga-resistentes contribui para a urgência na identificação de novos compostos (Shawar e col., 1997).

1.4) Quimioterapia da Tuberculose

O sucesso inicial da quimioterapia ocorreu em meados de 1940 com a introdução da Estreptomicina (**figura 4**), mas num período de 3 meses, os pacientes já apresentavam microrganismos Estreptomicina-resistentes (Medical Research Council Investigation, 1948 - citado em Grosset 1996).

O surgimento de resistência em muitas espécies bacterianas é conhecido. Micobactérias naturalmente são resistentes aos antibióticos mais comuns e agentes quimioterapêuticos, provavelmente devido a alta hidrofobicidade da célula que atua como uma eficiente barreira de permeabilidade (Nikaido e Jarlier, 1991). Dados da literatura mostram que em países da Europa e nos Estados Unidos há alto índice de cepas resistentes (Flament-Saillour e col., 1999; Centers for Diseases Control, 1999).

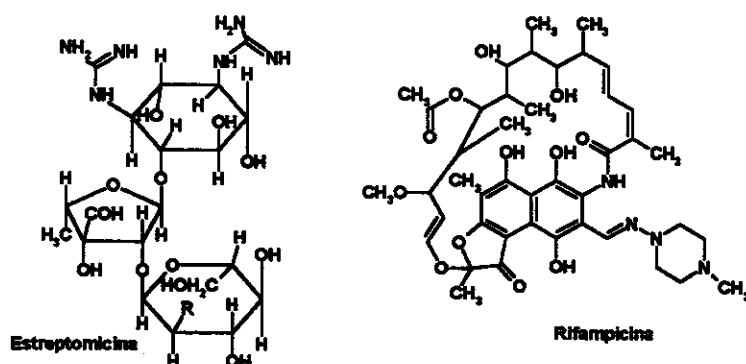


Figura 4 - Estrutura da Estreptomicina e Rifampicina

O *M. tuberculosis* se parece com outras bactérias com relação ao mecanismo de resistência desenvolvido contra antibióticos de amplo espectro como Rifampicina, aminoglicosídeos (por ex. Estreptomicina, Kanamicina) ou fluorquinolonas (Ofloxacina, Sparfloxacina). O processo geralmente envolve

mutação genética nos sítios alvo de ação das drogas. Há vários estudos sobre o desenvolvimento do mecanismo de resistência de agentes antimicobacterianos (Raynauld e col., 1999) e sobre a prevalência de cepas resistentes (Duval e col., 1999).

Considerando que pelo menos duas ou mais drogas são necessárias para evitar a emergência de resistência ao *M. tuberculosis* como resultado de uma mutação espontânea e que a resistência às drogas clássicas como a Isoniazida e rifamicinas é crítica, a identificação de novos agentes anti-tuberculose se faz necessário (Snider e Rooper, 1992; Riley, 1993; Bloch e col., 1994).

O complexo *M. avium-intracellulare* apresenta uma diversificada forma de resistência aos antimicobacterianos. Este fato está mais relacionado à impermeabilidade da célula do que às modificações genéticas, como no caso do *M. tuberculosis* (Suzuki e Inamine, 1994; Williams e col., 1994).

Há muitas explicações para a ocorrência de resistência às drogas. Estas razões incluem a prescrição de quimioterapia inadequada, não aderência dos pacientes aos esquemas de tratamentos e também a deficiência dos programas de controle da tuberculose (Mahmoudi e Iseman, 1993; Burns e col., 1994). Além disso, há o problema da grande mobilidade e migração da raça humana (Mckenna e col., 1995; Sepkowitz e col., 1995; Grange, 1997).

A emergência de resistência aos agentes antimicobacterianos, embora não seja um problema novo, se agrava em pacientes infectados com HIV que apresentam a tuberculose multi-droga-resistente (TB-MDR). Pacientes infectados com HIV apresentam 0,2% de probabilidade de desenvolver a tuberculose multi-droga-resistente e o tratamento é extremamente difícil (Iseman, 1993). Nos Estados Unidos a eficácia do tratamento da multi-droga resistência está em torno de 50% e apresenta 22% de mortalidade (Cohn, 1995).

De grande relevância no ressurgimento da tuberculose, pacientes HIV-infectados apresentam alta prevalência de tuberculose e um risco elevado de rápida progressão da infecção, manifestação da infecção primária ou re-infecção (De Cock e Chaisson, 1999). Estas infecções contribuem substancialmente para a morbidade e mortalidade e são difíceis de serem controladas com a quimioterapia atual. Sabe-se que grande número dos casos de tuberculose são o resultado de reativação de tuberculose pré existente (Barry, 1997).

A parede celular bacteriana é um alvo efetivo para agentes antibacterianos, os quais são ineficientes contra micobactérias, pois a parede celular pode atuar como uma barreira impermeável a muitos agentes (David, 1981).

O *M. tuberculosis* infecta principalmente células do sistema retículo endotelial (SRE), especificamente macrófagos. Para uma terapia efetiva, as drogas devem atingir o interior das células em concentrações bacteriostáticas ou bactericidas (Oh e col., 1995). A quimioterapia da tuberculose envolve vários compostos que são usados em associação sem haver alteração das propriedades farmacocinéticas (Gurumurthy e col., 1999). Em condições favoráveis, 6 meses de quimioterapia são suficientes para resultar na cura de mais de 98% dos pacientes. Embora grande parte dos bacilos em uma reinfecção sejam mortos em uma ou duas semanas, a terapia deve ser mantida por pelo menos 5 meses para total eliminação dos bacilos remanescentes (Grange, 1992).

Drogas de primeira linha como a Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol (figuras 5 e 6) são altamente específicas para o tratamento da tuberculose e são utilizadas em associação com antibióticos de amplo espectro como, Rifampicina, Estreptomicina e fluorquinolonas (figuras 4 e 6). A supressão de mutantes resistentes só é possível pela associação das drogas disponíveis para a

quimioterapia, sendo cada droga ativa contra um tipo de mutante resistente (Grosset 1996; Heym e Cole, 1997).

A Estreptomicina foi o primeiro antibiótico usado para o tratamento da tuberculose, pertence à família de aminoglicosídeos. Amplamente usada na monoterapia é uma das principais drogas pela qual o *M. tuberculosis* desenvolveu resistência (Canetti e col., 1964).

A Rifampicina (figura 4) derivado semi-sintético das rifamicinas tem caráter lipofílico e é de grande importância na quimioterapia da tuberculose porque reduz o tempo de tratamento da doença. Um outro aspecto importante é a sua contribuição aos estudos de afinidade de drogas pelo sítio alvo em tuberculose (Barry, 1997). Análogos sintéticos tem sido preparados, como a Rifabutina, SPA-S-565, Rifapentina e mais recentemente o KRM-1648; no entanto tais compostos não apresentaram grande impacto sobre o tratamento da tuberculose (Grosset, 1989).

Um número limitado de drogas de segunda linha estão disponíveis para o tratamento da tuberculose multi-droga-resistente, dentre elas a Amikacina, Capreomicina, Cicloserina, Etionamida, Kanamicina, Clofazimina e fluorquinolonas. Com exceção das fluorquinolonas, a maioria destes compostos tem eficácia limitada e a administração prolongada é freqüentemente acompanhada por severos efeitos colaterais (Heym e Cole, 1997).

A Isoniazida (hidrazida do ácido nicotínico) (figura 5) é altamente específica para o *M. tuberculosis* e apresenta pouca ou nenhuma atividade sobre as outras micobactérias ou bactérias. É uma pró-droga que requer ativação por uma enzima micobacteriana endógena, antes de exercer seu efeito bactericida sobre o alvo celular (Zhang e col., 1992). Desta forma, ela apresenta um perfil terapêutico relativamente seguro. É bactericida e atua por inibição da síntese de ácidos micólicos na parede celular (Inderlied, 1991). É

efetiva, livre de toxicidade, de baixo custo e facilmente absorvida quando administrada por via oral. Entretanto, a resistência à Isoniazida e outras drogas está aumentando em uma proporção alarmante, especialmente em pacientes HIV-positivos (Hart e col., 1996). Em associação com a Rifampicina contribui para a redução do tempo de tratamento da tuberculose.



Figura 5 - Estrutura da Isoniazida, Nicotinamida e Pirazinamida.

A Pirazinamida e o Etambutol (**figuras 5 e 6**) são efetivos contra o *M. tuberculosis*, mas são menos ativos contra as outras espécies de micobactérias (Takayama e Kilburn, 1989). A Pirazinamida, análogo de Nicotinamida (**figura 5**), é uma pró-droga que requer desamidação por enzima micobacteriana endógena, para formar ácido pirazóico (Butler e Kilburn, 1983). Introduzida em 1952, seu mecanismo de ação é desconhecido e sabe-se que há necessidade de pH ácido para sua atividade no interior de vesículas citoplasmáticas ou lisossomas (Heym e Cole, 1997).

O Etambutol é uma droga efetiva e específica com atividade bacteriostática. Não apresenta nenhum efeito sobre a viabilidade e metabolismo de células que não estejam em crescimento. Suspeita-se que o mecanismo de ação atue sobre o metabolismo de ácidos nucleicos, síntese de ácidos micólicos, metabolismo de fosfolípidos e síntese de arabinogalactanas (Forbes e col., 1965; Kilburn e Greenberg, 1977; Takayama e Kilburn, 1989).

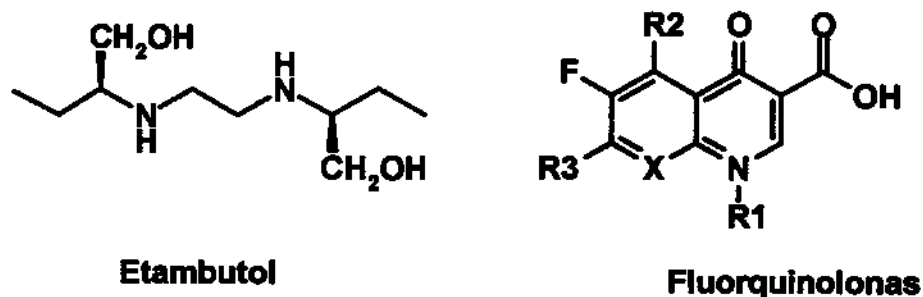


Figura 6 - Estrutura do Etambutol e fluorquinolonas (X=CH, -CF, -N; -R1, -R2 e -R3 podem ser qualquer átomo ou grupo).

Outras drogas como Oxazolidinonas, Gangamicina, Acridinonas e quinolonas também são usadas na quimioterapia (Duncan, 1997). Um grande número de quinolonas será avaliado nos próximos anos. Muitos aminoglicosídeos efetivos contra *M. tuberculosis*, como Kanamicina, Viomicina e Paromomicina deverão ser usados em infecção multi-droga-resistente (Bates, 1995) e análogos de Clofazimine parecem ter substancial atividade contra *M. tuberculosis* (Jagannath e col., 1995). Há pesquisas na busca de novas quinolonas (Artico e col., 1999) e as fluorquinolonas (**figura 6**) apresentam amplo espectro de atividade contra bactérias Gram (-), Gram (+) e micobactérias (Domagala, 1994; Klopman e col. 1995). Entretanto, recentes estudos mostram que fluorquinolonas podem inibir topoisomerasas de eucariontes, levando a danos no DNA ou toxicidade celular ao hospedeiro (Wentland e col., 1993).

A inibição da síntese de lipídeos em micobactérias é considerada como uma das alternativas para prevenir o crescimento micobacteriano pelas drogas antituberculose (Ratnakar e col., 1995). Fluorquinolonas são drogas relativamente lipofílicas, cuja via de penetração é principalmente através dos resíduos lipídicos da parede celular da micobactéria (Kocagoz e col., 1996).

Dentre as novas fluorquinolonas, Ofloxacina e Ciprofloxacina parecem ser as mais ativas. Ofloxacina é uma das drogas de segunda linha mais potentes em bacilos de *M. tuberculosis* intracelular e extracelular (Heifets, 1987; Rastogi e Goh, 1991), entretanto, deve ser usada em associação com outras drogas antituberculose pois sua eficácia é reduzida quando empregada isoladamente no tratamento da tuberculose pulmonar humana (Tsukamura e col., 1985). A sua melhor absorção e prolongado tempo de meia vida favorecem sua utilização em estudos clínicos. Sparfloxacina é duas ou três vezes mais potente que Ciprofloxacina ou Ofloxacina e apresenta excelente atividade *in vivo*. Entretanto, tem ocorrido resistência clínica à Ciprofloxacina e Ofloxacina (Leysen e col., 1989; Witzig e Franzblau, 1993; Alangaden e col., 1995).

Atualmente há muitas drogas com excelente potencial para a luta contra a tuberculose (Hart e col., 1996). Embora os produtos de origem natural possuam grande potencial terapêutico, estes estão sendo explorados gradativamente com relação a atividade antimicobacteriana (Cantrell e col., 1998; McCutcheon e col., 1997; Shawar e col., 1997; De Souza e col., 1999).

A toxicidade de drogas como Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida, foi determinada há duas décadas (Girling, 1978) e embora altamente tóxicas, estas são as utilizadas atualmente para o tratamento da infecção. Novas drogas têm sido ensaiadas com o objetivo de se estabelecer uma quimioterapia mais efetiva, com menos efeitos colaterais e com um período de tratamento mais curto (Barry, 1997). Estes são os principais desafios de uma nova quimioterapia para a tuberculose e muitas outras infecções (Hart e col., 1996, Yew e Chau, 1996).

Recentes avanços na biologia molecular e bioquímica das micobactérias definirão melhor a compreensão do mecanismo de ação das drogas atuais e

contribuirão para a descoberta de novos agentes antimicobacterianos (Barry, 1997; Duncan, 1997).

Na identificação de um novo composto com atividade farmacológica, o desenho racional e as triagens aleatórias são duas considerações importantes. O desenho racional deve ser utilizado quando há um conhecimento específico do alvo, como as características de uma enzima-substrato ou seu mecanismo de ação, ou quando a estrutura tridimensional da proteína é conhecida. Por outro lado, a triagem aleatória é uma ferramenta muito efetiva em situações nas quais não há uma via bioquímica racional óbvia como alvo. O descobrimento de um inibidor fornecerá subsídios para a elucidação das características do sítio alvo. Este tipo de triagem, ainda permite que uma ampla variedade de drogas com diferentes propriedades estruturais seja avaliada quanto às propriedades farmacológicas. Quanto maior o número de amostras ensaiadas, maior a probabilidade de descoberta de um novo agente terapêutico (Duncan, 1997; Mata, 1997).

1.5) Testes de Citotoxicidade

Além da avaliação da atividade terapêutica de um composto, é imprescindível a determinação da toxicidade, pois nenhuma substância química de origem sintética ou natural pode ser considerada totalmente segura (livre de riscos). Qualquer agente químico é tóxico em algum nível de dosagem e o risco de exposição a esses agentes pode ser estimado, sob condições específicas (Berkovitz e Katzung, 1994).

Novas drogas devem ser submetidas a testes de toxicidade antes de serem introduzidas na terapêutica (Freshney, 1994). Este procedimento, consome grande número de experimentos em animais, os quais acarretam alto

custo financeiro e envolvimento com aspectos éticos, questionados por entidades protetoras de animais. As pressões são de ordem econômica e social, estimulando a realização dos testes de toxicidade *in vitro* (citotoxicidade) (Seibert e col., 1996). Os testes de toxicidade *in vitro* permitem a seleção dos testes a serem realizados *in vivo*, uma vez que podem fornecer informações sobre os órgãos ou organelas mais afetados (Stark e col., 1986). A utilização de diferentes testes *in vitro* são fundamentais para a seleção racional de testes a serem usados *in vivo* (Seibert e col., 1994).

Os testes de citotoxicidade aplicados à diferentes organelas celulares são de utilidade considerável (Renzi e col., 1993). Dentre estes, destacam-se o da redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) (figura 7), que avalia a atividade da enzima succinato desidrogenase (Denizot e Lang, 1986), o da incorporação do corante hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] vermelho neutro (VN) (figura 7), que avalia a função dos lisossomas (Riddell e col., 1986) e a quantificação do conteúdo de DNA (Cingi e col., 1991).

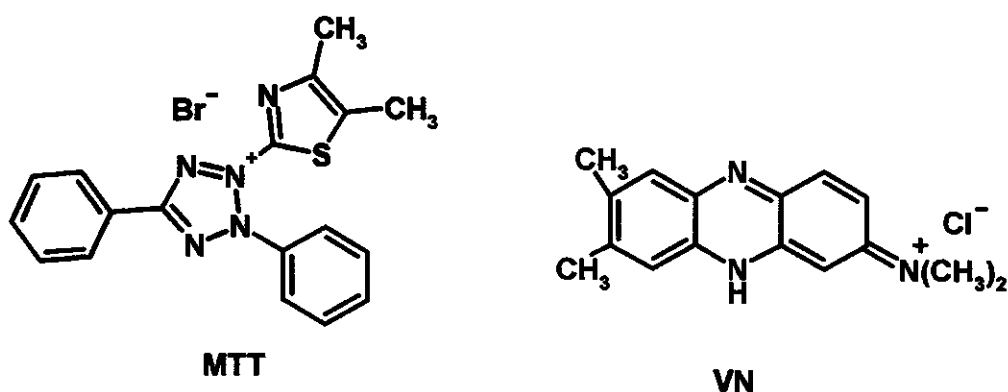


Figura 7 - Estrutura do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) e do corante hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] vermelho neutro (VN).

O ensaio da redução do sal hidrossolúvel MTT pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase, origina como produto o formazan, de cor azul e solúvel em solventes orgânicos. Desenvolvido por Mosmann (1983), estima o número de células viáveis e avalia os efeitos citotóxicos apropriadamente. A incorporação do corante vermelho neutro avalia a quantidade de células viáveis (Borenfreund e Puerner, 1984). Fracamente catiônico e hidrossolúvel, este corante permeia pelas membranas celulares por difusão ou micropinocitose e se concentra nos lisossomas funcionais, onde estabelece ligações com grupos carboxílicos ou fosfóricos da matriz lisossomal (Repetto e Sánz, 1993). A quantificação do conteúdo de DNA (ácido desorribonucléico) na cultura de células, possibilita a estimativa da capacidade proliferativa das células (Cingi e col., 1991).

2) Objetivos Gerais

O objetivo geral deste estudo se subdivide em 2 aspectos :

- a). Síntese de derivados de diarilpropenaminas.
- b). Determinação da atividade antimicobacteriana e tripanossomicida dos derivados de diarilpropenaminas.

2.1) Objetivos específicos

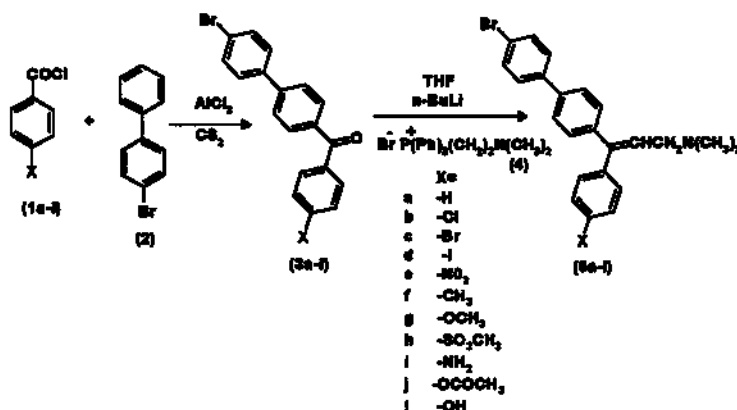
- a). Síntese e caracterização dos derivados de diarilpropenaminas (5a e 5c) e separação dos respectivos isômeros geométricos *E* e *Z*.
- b). Síntese e caracterização de dois novos derivados de diarilpropenaminas (5l e 5i).
- c). Determinação da atividade tripanossomicida dos derivados de diarilpropenaminas (5l e 5i) em formas amastigota, epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*.
- d). Avaliação da citotoxicidade dos derivados de diarilpropenaminas (5l e 5i) em células fibroblásticas de mamíferos.
- e). Determinação da atividade antimicobacteriana dos derivados de diarilpropenaminas (5a, 5c, 5l e 5i).

3) Experimental

Na parte experimental descrevemos a:

- Síntese dos compostos 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (**5a**, **5c**, **5j**, **5l** e **5i**) e 3-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-hidroxifenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (**21**, página 47).
- Ensaio biológicos *in vitro* para determinação das atividades tripanossomicida dos compostos **5l**, **5i** e **21** e antimicobacteriana dos compostos **5a**, **5aE**, **5aZ**, **5c**, **5cE**, **5cZ**, **5j**, **5l**, **5i** e **21**.
- Avaliação da citotoxicidade dos compostos **5l**, **5i** e **21** em células fibroblásticas de mamíferos.

De maneira generalizada, a síntese das diarilpropenaminas compreende basicamente uma acilação de Friedel-Crafts entre os respectivos cloretos de ácidos (**1**) e 4-bromobifenila (**2**), seguida por reação de Wittig como mostra o esquema 1.



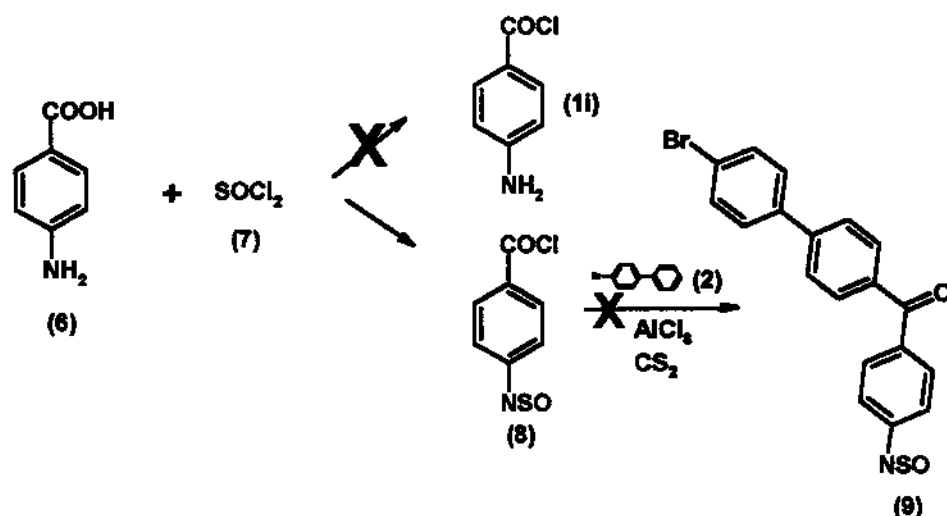
Esquema 1 - Esquema de síntese das cetonas (**3a**, **3c**, **3e**, **3g** e **3j**) e dos derivados de diarilpropenaminas (**5a**, **5c**, **5e**, **5g** e **5j**).

O processo se iniciou com a tentativa de síntese do derivado amina **5i**. A partir do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) (**6**) tentamos sintetizar o cloreto de ácido *p*-aminobenzóico (**1i**) e a cetona 4'-bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-aminofenil metanona (**3i**). Vários procedimentos foram utilizados, mas a obtenção do composto 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-aminofenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (**5i**) só ocorreu a partir da redução do derivado nitro (**esquema 9**, página 45), como será relatado a seguir.

3.1) Síntese do derivado 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-aminofenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (**5i**, X=NH₂)

a). Síntese do cloreto de ácido *p*-aminobenzóico a partir do SOCl₂

Para a formação do cloreto de ácido *p*-aminobenzóico (**1i**) uma solução contendo 2 mmoles (0,27 g) de PABA (**6**) e 27,5 mmoles de SOCl₂ (**7**) (2 mL) foi refluxada por 4-5 horas (**esquema 2**). Em seguida, o excesso de SOCl₂ (**7**) foi destilado obtendo-se um sólido amarelo e pastoso identificado como cloreto de *p*-sulfinilaminobenzoila (**8**) (IV KBr, ν 1654 cm⁻¹, C=O RCOCl). Ao composto (**8**) adicionamos AlCl₃ (3,84 mmoles), 4-bromobifenila (**2**) (2,20 mmoles) e CS₂ para obtenção da 4'-bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-sulfinil metanona (**9**), mas a identificação do produto de reação não foi possível.



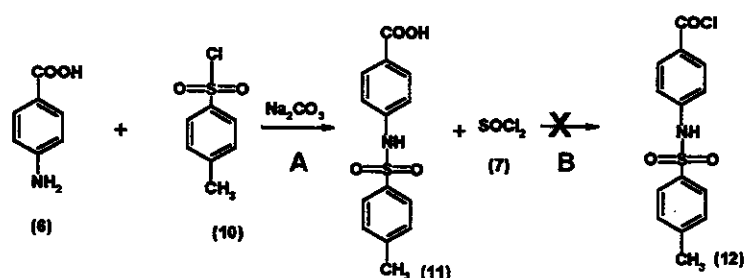
Esquema 2 - A) Tentativa de síntese do cloreto de ácido *p*-aminobenzóico (11) a partir do PABA (6) e SOCl₂ (7). B) Tentativa de síntese do composto (9).

Nas próximas tentativas o grupo amina do PABA (6) será protegido, respectivamente, pelo cloreto de *p*-toluenossulfonil (tosila) e acetila.

b). Proteção do grupo amina do PABA com cloreto de *p*-toluenossulfonil e síntese do cloreto de ácido *p*-toluenossulfonilaminobenzóico

De acordo com procedimento descrito por Scheifele e DeTar, (1967), 2 mmoles (0,27 g) de 6 foram adicionados à 3 mL de Na₂CO₃ (1,64 mol L⁻¹) à 70°C. Após completa solubilização, a solução foi resfriada para 60°C e 2,4 mmoles (0,46 g) de cloreto de *p*-toluenossulfonila (10) foram lentamente adicionados à mistura reacional. Após 40 minutos, aumentou-se a temperatura para cerca de 85°C e 0,02 g de carvão ativado foi adicionado cuidadosamente. A solução foi filtrada e em seguida acidificada com HCl concentrado para precipitação do ácido *p*-toluenossulfonilaminobenzóico (11, esquema 3). Após

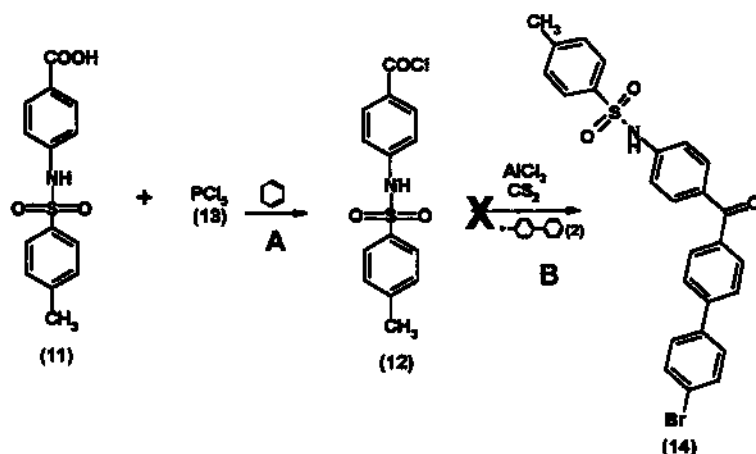
caracterização por espectroscopia no IV (**figura 12**) (KBr, bandas cm^{-1} : 3215 ν -OH ArCOOH; 1708 ν C=O ArCOOH; 1606 ν C=C anel aromático; 1336,1 ν assimétrico SO_2 1152,3 ν simétrico SO_2) o composto **11** (0,10 g - 0,34 mmoles) foi refluxado com SOCl_2 (**7**) (0,7 mL - 9,62 mmoles) por 5 horas (**esquema 3**) e o excesso de SOCl_2 foi destilado obtendo-se um sólido amarelo não identificado.



Esquema 3 - A)- Proteção do PABA (**6**) com o cloreto de *p*-toluenossulfonil (**10**). B)- Reação do ácido *p*-toluenossulfonilaminobenzóico (**11**) com o SOCl_2 (**7**).

c). Síntese do cloreto de ácido *p*-toluenossulfonilaminobenzóico a partir do PCl_5

O composto **11** (0,16g - 0,55 mmoles) foi refluxado com 2,5 mL de benzeno e PCl_5 (**13**) (0,15g - 0,63 mmoles) por 50 minutos à 50°C (Scheifele e DeTar, 1967) (**esquema 4**). O solvente foi destilado à vácuo sob pressão reduzida e o produto de reação, obtido com rendimento quantitativo, foi identificado como cloreto de ácido *p*-toluenossulfonilaminobenzóico (**12**) (IV, ν 1681,1 cm^{-1} -C=O, RCOCl). Em seguida adicionamos AlCl_3 , CS_2 e 4-bromobifenila (**2**) para síntese da 4'-bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-tosilfenil metanona (**14**), mas o produto desejado não foi obtido.

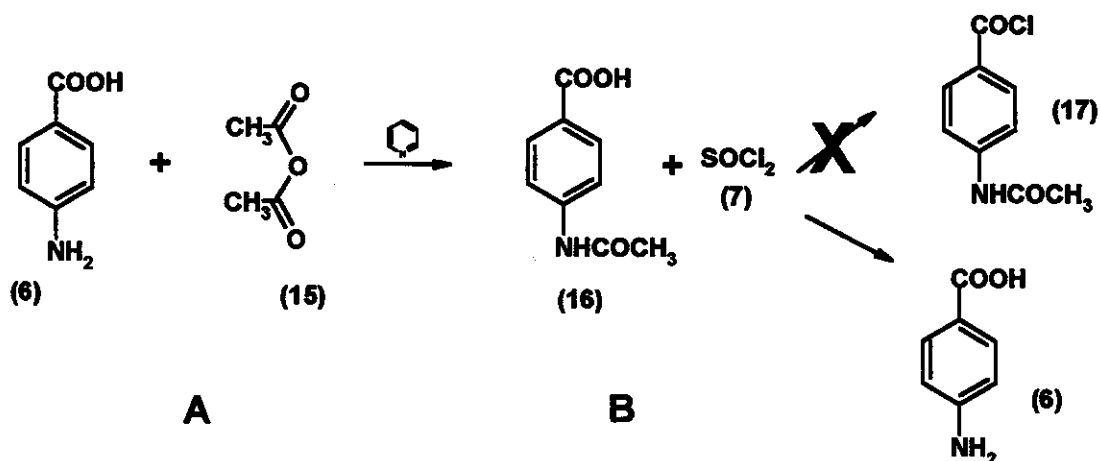


Esquema 4 - A)- Síntese do cloreto de ácido *p*-toluenossulfonilaminobenzóico (12). **B)-** Tentativa de síntese da 4'-bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-tosilfenil metanona (14).

d). Proteção do grupo amina do PABA com o grupo acetil e formação do cloreto de ácido *p*-acetamidobenzóico

Para a acetilação reagimos 2 mmoles (0,27 g) do PABA (6) com anidrido acético (15) (4 mL) na presença de piridina, por ± 12 horas em temperatura ambiente (esquema 5). O anidrido acético e a piridina foram destilados à vácuo e o produto de reação, obtido com rendimento quantitativo, foi caracterizado por espectroscopia no IV (KBr, bandas cm^{-1} : ν 3305 -NH ArNHCOCH₃; 1686,4 e 1525,4 C=O ArNHCOCH₃; ν 1589,8 C=C anel aromático) e ponto de fusão como ácido *p*-acetamidobenzóico (16). Para a síntese da cetona 3i (esquema 1), numa primeira etapa tentamos preparar o cloreto de ácido *p*-acetamidobenzóico (17). O composto 16 (2 mmoles) foi refluxado com 2 mL de SOCl₂ (7) (27,5 mmoles) por ± 4 horas e em seguida o excesso de SOCl₂ foi destilado à vácuo. Como produto da reação recuperamos o PABA (6) (IV KBr, bandas cm^{-1} : ν 3460 e 3363 NH ArNH₂; ν 1671,2 C=O,

ArCOOH; ν 1607,9 C=C anel aromático).



Esquema 5 - A- Proteção do grupo -NH₂. B- Reação do ácido *p*-acetamidobenzóico (16) com SOCl₂ (7).

Como nova alternativa, decidimos sintetizar o derivado amina de diarilpropenaminas (5i), a partir da redução do derivado nitro (5e). No primeiro passo, preparamos a cetona 4'-bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-nitrofenil metanona (3e) por acilação de Friedel-Crafts e em seguida por reação de Wittig o composto 5e (esquema 1), o qual foi em seguida submetido à reações para redução do grupo nitro. Os procedimentos serão descritos posteriormente no item 3.2.f.

3.2) Síntese dos compostos 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (5a, 5c, 5e, 5j, 5l e 5i)

Os derivados 5a e 5c foram sintetizados e os seus respectivos isômeros

geométricos *E* e *Z*, foram isolados de acordo com procedimento já descrito (De Conti e col., 1996a; Oliveira e col., 1999).

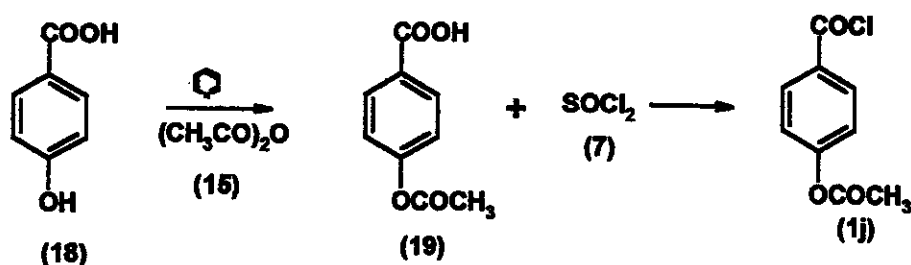
Os novos derivados **5i**, **5j** e **5l** também foram sintetizados. Para a síntese do derivado **5j** partimos do ácido 4-hidroxibenzóico (**18**), o qual foi acetilado formando o ácido 4-acetoxibenzóico (**19**). Em seguida, obtivemos o cloreto de ácido 4-acetoxibenzóico (**1j**) e a cetona **3j**. Esta, por reação de Wittig originou o composto **5j** (esquema 1).

Para a síntese do composto **5l** tentamos obter a cetona **3l** a partir da desmetilação de **3g**. Como será descrito, a desmetilação ocorreu juntamente com a perda do brometo da posição *para* do anel bifenila, formando o composto **21**. Este fato, nos levou a preparação do composto **5l** a partir da hidrólise do derivado **5j** (esquema 7, página 36).

a). Síntese do ácido 4-acetoxibenzóico e cloreto de ácido 4-acetoxibenzóico

Ao ácido 4-hidroxibenzóico (**18**) (0,99 g - 7,2 mmoles) adicionamos anidrido acético (**15**) (3 mL - 31,7 mmoles) e 2-3 gotas de piridina (Ignatious e col., 1995). A acetilação se procedeu por aproximadamente 15 horas em temperatura ambiente, sob constante agitação (esquema 6). O excesso de anidrido acético e piridina foi destilado à vácuo e o ácido 4-acetoxibenzóico (**19**) foi extraído com solvente orgânico e caracterizado de acordo com os dados abaixo (espectros de IV e RMN¹H, respectivamente nas figuras 13 e 14, em anexo). Para a síntese do cloreto de ácido 4-acetoxibenzóico (**1j**) reagiu-se o composto **19** (0,21 g - 1,04 mmoles) e SOCl₂ (2 mL-27 mmoles) sob refluxo e agitação constante, por aproximadamente 6 horas (esquema 6). O excesso de SOCl₂ foi removido por destilação à vácuo obtendo-se um óleo amarelo com rendimento quantitativo (0,2 g - 1,04 mmoles), que foi caracterizado por

espectroscopia no IV como cloreto de ácido 4-acetoxibenzóico (1j) (ν 1773,4 cm^{-1} , $\text{C}=\text{O}$ ArCOCl).



Esquema 6 - Síntese do ácido 4-acetoxibenzóico (19) a partir do ácido 4-hidroxibenzóico (18) e formação do cloreto de ácido 4-acetoxibenzóico (1j).

Composto 19

Ponto de fusão: 191°C

IV (KBr, cm^{-1}): 1759,1 (ν , $\text{C}=\text{O}$ ArOCOCH_3), 1682,7 (ν , $\text{C}=\text{O}$ ArCOOH), 1604,9 (ν $\text{C}=\text{C}$ anel aromático) (**figura 13**, em anexo).

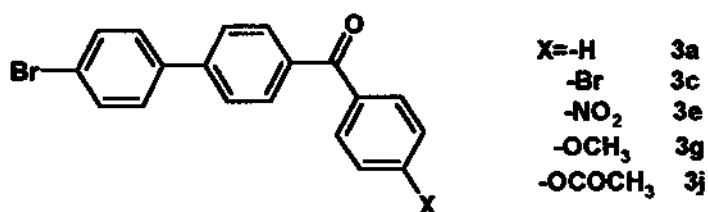
RMN^1H (300 MHz; CDCl_3/TMS , δ): 8,20 (1d, 2H, Ar, $J=8,85$ Hz), 7,29 (1d, 2H, Ar, $J=7,32$ Hz), 2,35 (s, 3H, CH_3) (**figura 14**, em anexo).

b). Síntese das 4'bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-X-fenil metanonas (3a, 3c, 3e, 3g e 3j)

As cetonas 3a, 3c, 3e, 3g e 3j foram preparadas via acilação de Friedel Crafts adicionando-se 1,1 mmoles de 4-bromobifenila (2) e 1 mmol dos respectivos cloretos de ácidos (benzóico (2a), 4-bromobenzóico (2c), 4-nitrobenzóico (2e), 4-metoxibenzóico (2g) e 4-acetoxibenzóico (2j) na presença de CS_2 (5 mL) e AlCl_3 (1,92 mmoles). Após refluxo por 7-8 horas,

sob agitação constante, as reações foram interrompidas por resfriamento à 0°C pela adição de gelo (**esquema 1**). O CS₂ foi destilado à vácuo e o produto bruto extraído com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e destilada sob pressão reduzida, resultando as 4'bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-X-fenil metanonas (**3a**, **3c**, **3e**, **3g** e **3j**, **esquema 1**). As cetonas foram purificadas por cristalização em CH₂Cl₂/C₆H₁₄ e caracterizadas por ponto de fusão, espectrofotometria de UV/VIS, espectroscopia no IV, RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS, δ), RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃/TMS, δ) e espectrometria de massa (EI - 70 eV). A seguir estão os dados referentes à caracterização estrutural e a **Tabela 1** expressa as propriedades físicas das metanonas **3a**, **3c**, **3e**, **3g** e **3j**.

Caracterização estrutural das 4'bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-X-fenil metanonas (3a**, **3c**, **3e**, **3g** e **3j**)**



Composto **3a**

IV (KBr, cm⁻¹): 1644 (v, C=O ArCOAr).

RMN¹H (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ): 7,88-7,4 (m, 13H, Ar).

EM (*m/z*): 338/336 (M⁺, 83), 261/259 (83), 152 (65), 105 (100), 77 (95).

Composto 3c

IV (KBr, cm^{-1}): 1644 (ν , ArCOAr).

RMN¹H (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ): 8,0-7,4 (m, 12H, Ar).

EM (m/z): 416/414 (M^{+} , 100), 337/335 (23), 261/259 (70), 185/183 (69), 152 (79).

Composto 3e

IV (KBr, cm^{-1}): 1644 (ν , C=O ArCOAr).

RMN¹H (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ) 8,36 (1d, 2H, Ar, $J=6,98$ Hz), 7,96 (1d, 2H, Ar, $J=8,63$ Hz), 7,89 (1d, 2H, Ar, $J=8,30$ Hz), 7,71 (1d, 2H, Ar, $J=8,25$ Hz), 7,62 (1d, 2H, Ar, $J=6,71$ Hz), 7,52 (1d, 2H, Ar, $J=8,50$ Hz).

RMN¹³C (75 MHz; CDCl₃/TMS, δ): 194,22 (C=O), 149,81 (C), 144,95 (C), 142,87 (C), 138,42 (C), 135,18 (C), 132,19 (CH), 130,81 (CH), 130,61 (CH), 128,82 (CH), 127,08 (CH), 123,57 (CH), 122,95 (C).

EM (m/z): 383/381 (M^{+} , 100), 261/259 (65), 152 (90).

Composto 3g

IV (KBr, cm^{-1}): 1638,7 (ν C=O, ArCOAr), 1256 (ν RC-O-C).

RMN¹H (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ): 8,1-7,0 (m, 12 H, Ar), 3,9 (s, 3H, ArOCH₃).

EM (m/z): 368/366 (M^{+} , 45), 234/232 (82), 152 (92), 135 (100).

Composto 3j

IV (KBr, cm^{-1}): 1744,1 (ν C=O, OCOCH₃), 1642,5 (ν C=O, ArCOAr),

RMN¹H (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ): 8,0-7,1 (m, 12 H, Ar), 2,35 (s, 3H, ArOCOCH₃).

RMN¹³C (75 MHz; CDCl₃/TMS, δ): 195,07 (C=O), 168,77 (C=O), 144,02 (C), 138,80 (C), 136,45 (C), 135,21 (C), 132,12 (CH), 132,00 (CH), 131,92 (CH), 131,71 (CH), 130,74 (CH), 128,85 (CH), 128,77 (CH), 127,92 (CH), 126,84 (CH), 126,68 (C), 126,41 (C), 125,40 (CH), 122,64 (C), 122,14 (CH), 122,03 (CH), 121,75 (CH), 21,17 (CH₃).

EM (m/z): 396/394 (M^{+} , 22), 354/352 (73), 261/259 (20), 152 (53), 121 (100), 93 (8), 65 (8).

Tabela 1 - Rendimentos de reação e propriedades físicas das metanonas **3a**, **3c**, **3e**, **3g**, **3j** e **20**

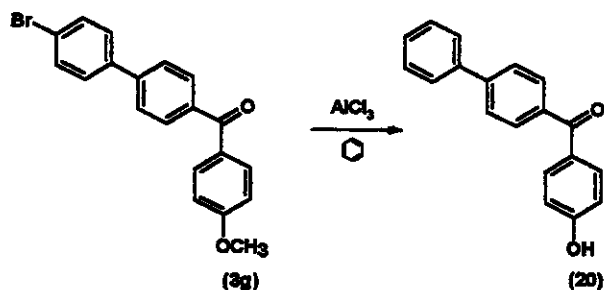
Cetonas	Rend. (%)	P.F. (°C)	UV/VIS λ (nm) CH ₂ Cl ₂
3a	60	157-158	292
3c	70	223-224	294
3e	70	182	272
3g	80	248	284
3j	80	185-195	254
20	≈ 100	161	ND

Rend.-Rendimento de reação; P.F.–Ponto de fusão; ND-Não determinado

Estas metanonas serão utilizadas para obtenção dos compostos **5a**, **5c**, **5e**, e **5j** através de reação de Wittig (**esquema 1**). A metanona **3g** passou por processo de desmetilação para formação da cetona hidroxilada **3l** e posterior formação do derivado fenólico de diarilpropenaminas **5l** conforme o procedimento descrito a seguir.

c). Desmetilação da 4'-bromo [1,1'-bifenila]-4-il 4-metoxifenil metanona (3g) e síntese da 1,1'-[bifenil]-4-il 4-hidroxifenil metanona (20)

1,36 mmoles (0,5 g) da metanona 3g foram refluxados com 5,27 mmoles (0,70 g) de AlCl_3 e 7 mL de benzeno por 4 horas, sob agitação constante (esquema 7), conforme metodologia descrita para um composto similar (Sergievskaya e Chemerisskaya, 1950). Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de água destilada e acidificada com HCl concentrado. Por extração com CH_2Cl_2 obteve-se o produto da reação, o qual foi purificado por cristalização com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{H}_{14}$ apresentando rendimento quantitativo. O sólido obtido têm cor vermelha e foi caracterizado por ponto de fusão, espectroscopia no IV (figura 20b, em anexo), RMN^1H (figura 18, em anexo) e espectrometria de massa (figura 19a, em anexo) como 1,1'-bifenil-4-il 4-hidroxifenil metanona (20) de acordo com os dados a seguir e Tabela 1. Através de uma análise qualitativa de bromo por fluorescência de raio-X (EDXRF) (figura 19b, em anexo) confirmamos a ausência de bromo na amostra e os dados estão demonstrados na Tabela 2 e na figura 20b, em anexo. Durante a desmetilação também ocorreu perda do brometo da posição *para* do anel bifenila e a metanona 20 assim obtida será utilizada para síntese do derivado fenólico 21.



Esquema 7 - Desmetilação da 4'-bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-metoxifenil metanona (3g) e obtenção da 1,1'-[bifenil]-4-il 4-hidroxifenil metanona (20).

Caracterização estrutural da metanona 20

IV (KBr, cm^{-1}): 3322,9 (v, -OH), 1644,1 (v, C=O ArCOAr) (figura 20b, em anexo).

RMN^1H (300 MHz; CDCl_3/TMS , δ): δ 8,35-7,31 (m, 13 H, Ar) (figura 18, em anexo).

EM (m/z): 274 (M^+ , 100), 181 (79), 152 (44), 121 (94) (figura 19a, em anexo).

Tabela 2 - Análise Qualitativa de Bromo (EDXRF) do composto 20

Fluorescência de Raio-X por Energia Dispersiva

Elemento	Concentração (%)	Erro
Alumínio	1,149	0,0680
Fósforo	0,124	0,0103
Cloro	0,038	0,0026
Cálcio	0,016	0,0005
Ferro	0,001	0,0001
Cobre	0,003	0,0001
Zinco	0,001	0,0001
Bromo	0,641	0,0028
OCHN	98,028 (diferença)	-

d). Reação de Wittig para síntese dos derivados de diarilpropenaminas

À soluções contendo brometo de β -dimetilamino etil trifenilfosfônio (4) (0,83 g -2 mmoles) em tetrahidrofurano (THF), adicionamos lentamente, sob atmosfera de argônio, 2,20 mmoles de n-butil-lítio. Por um período de 30 minutos, a agitação foi mantida constante e a temperatura à 0°C. Em seguida, as metanonas **3a**, **3c**, **3e** e **3j** foram adicionadas à diferentes balões de reação para obtenção das respectivas diarilpropenaminas **5a**, **5c**, **5e** e **5j**, (esquema 1).

As soluções foram mantidas sob agitação constante, à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse tempo, as reações foram interrompidas pela adição de água destilada e o THF foi destilado à vácuo. Em seguida, realizou-se uma extração orgânica com CH_2Cl_2 , secagem com MgSO_4 e filtração. Os produtos das reações, foram purificados em coluna cromatográfica contendo sílica-gel 60 Å (200-400 mesh ou 35-70 mesh ASTM (Merck - Art. 7733) 0,2-0,5 mm) e eluídos com um gradiente de acetato de etila/metanol 1-12%. Deste processo de purificação obtivemos 3 frações principais: a 1ª fração, corresponde à metanona de partida que não reagiu, a 2ª fração, aos derivados de diarilpropenaminas (**5a**, **5c**, **5e** e **5j**) e a 3ª fração, ao óxido de trifenilfosfina produzido como produto secundário. Os derivados de diarilpropenaminas foram purificados uma segunda vez por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e devidamente caracterizados por espectroscopia no IV, RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massa. A seguir estão os dados obtidos pela caracterização estrutural e a **Tabela 3** expressa o rendimento obtido nas reações e a absorção destes compostos por espectrofotometria de UV/VIS. Os derivados de diarilpropenaminas **5j** e **5e** serão utilizados como compostos intermediários para a síntese de **5l** e **5i**, respectivamente (**esquemas 8 e 9**).

No caso do composto **5j** havia a presença de impurezas ou produtos secundários. Para a purificação utilizamos CCDP e como fase móvel várias combinações de solventes orgânicos em diferentes proporções. Como segunda alternativa tentamos purificar o produto bruto em coluna de sílica gel 35-70 Mesh ASTM (Merck - Art. 7733) 0,2-0,5 mm. Como eluente utilizamos acetato de etila e o composto **5j** foi recolhido na 3ª fração juntamente com impurezas detectadas por RMN^1H . Na terceira tentativa, o composto foi solubilizado em solução saturada de ácido tartárico e por extração obtivemos 2 fases: uma orgânica e outra aquosa. Através de análise do espectro de RMN^1H verificamos a presença do composto na fase orgânica juntamente com

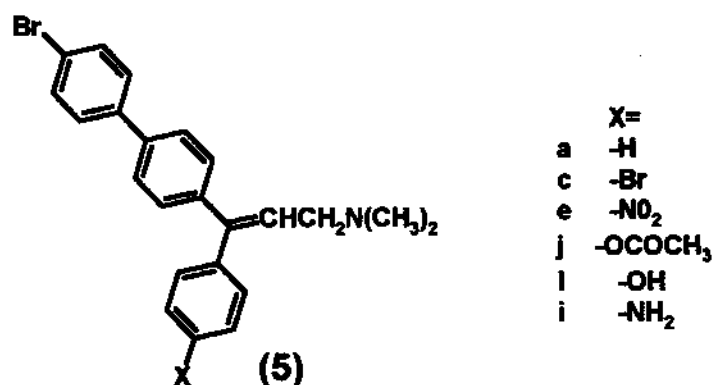
impurezas não eliminadas por CCDP.

Tabela 3 - Rendimentos de reação e propriedades físicas dos derivados de diarilpropenaminas (**5a**, **5c**, **5e**, **5i**, **5j**, **5l** e **21**)

Compostos	Rend. (%)	UV λ (nm) CH ₂ Cl ₂
5a	60	276
5c	46	268
5e	60	280
5i	± 30	ND
5j	40	ND
5l	± 40	ND
21	80	ND

ND - não determinado

Caracterização estrutural dos derivados de diarilpropenaminas



Composto **5a**

IV (filme, cm⁻¹): 1654 (v, C=C, olefina), 1487 (v, C=C, anel aromático), 1167 (v, C-N).

RMN¹H (500 MHz; CDCl₃/TMS): δ 7,57-7,16 (m, 26H, Ar - *E/Z*); 6,33 (1t, 1H, CH - *E/Z*, $J=6,96$ Hz); 6,28 (1t, 1H, -CH - *E/Z*, $J=6,96$ Hz), 3,16 (1d ,

2H, -CH₂ - *E/Z*, *J*=6,96 Hz); 3,13 (1d, 2H, -CH₂ - *E/Z*, 6,96 Hz); 2,31 (s, 12H, N(CH₃)₂ - *E/Z*) (**figura 21**, em anexo).

RMN¹³C (125 MHz; CDCl₃/TMS, δ): 144,75 (C), 141,59 (C), 140,89 (C), 139,49 (C), 139,10 (C), 139,03 (C), 138,96 (C), 138,70 (C), 131,92 (CH), 131,86 (CH), 130,32 (CH), 129,67 (CH), 128,59 (CH), 128,51 (CH), 128,40 (CH), 128,25 (CH), 127,84 (CH), 127,67 (CH), 127,54 (CH), 127,44 (CH), 126,75 (CH), 126,69 (CH), 124,80 (C), 124,51 (C), 121,69 (C), 121,58 (C), 57,87 (CH₂), 44,66 (CH₃), 44,61 (CH₃).

EM (*m/z*): 393/391 (M⁺, 34), 316/314 (20), 272/270 (32), 160 (52), 70 (100), 58 (93).

Composto 5c

IV (filme, cm⁻¹): 1583 (v, C=C, olefina).

EM (*m/z*): 443/441 (M⁺, 29), 394/392 (2), 346 (27), 265 (32), 238 (45), 154 (93), 70 (100), 58 (68).

RMN¹H (500 MHz; CDCl₃/TMS): δ 7,059-7,046 (m, 24H, Ar - *E/Z*), 6,33 (1t, 1H, -CH - *E/Z*, *J*=6,96 Hz); 6,27 (1t, 1H, -CH - *E/Z*, *J*=6,96 Hz); 3,22 (1d, 2H, -CH₂ - *E/Z*, *J*=6,96 Hz); 3,15 (1d, 2H, -CH₂ - *E/Z*, *J*=6,96); 2,36 (s, 12H, -N(CH₃)₂ - *E/Z*) (**figura 22**, em anexo).

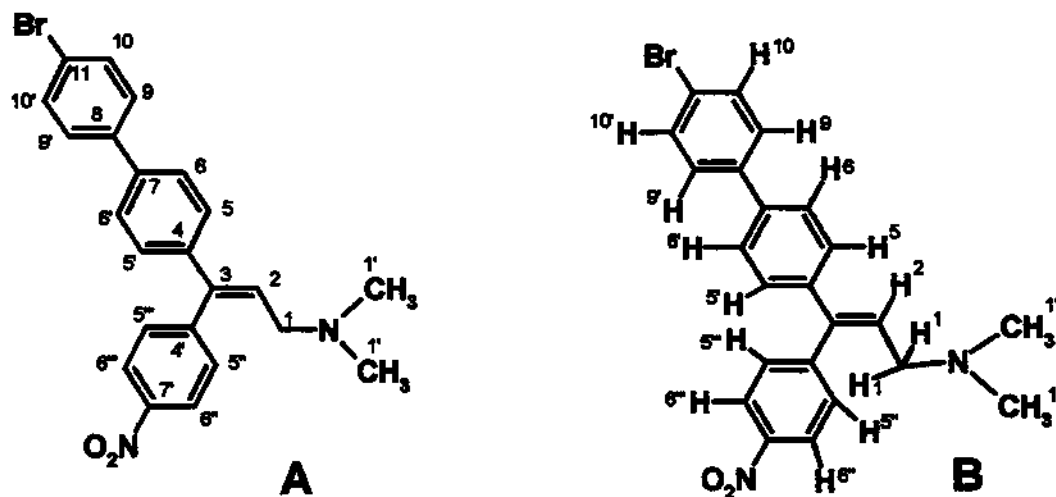
RMN¹³C (500 MHz; CDCl₃/TMS, δ): 143,58 (C), 140,41 (C), 140,35 (C), 139,31 (C), 139,29 (C), 139,26 (C), 137,95 (C), 137,89 (C), 131,94 (CH), 131,87 (CH), 131,63 (CH), 131,39 (CH), 131,37 (CH), 131,16 (CH), 131,04 (CH), 130,22 (CH), 129,04 (CH), 128,57 (CH), 128,50 (CH), 127,82 (CH), 126,89 (CH), 126,76 (CH), 125,04 (C), 124,82 (C), 121,85 (C), 121,80 (C), 121,72 (C), 121,66 (C), 57,70 (CH₃), 57,64 (CH₃), 44,54 (CH₂), 44,43 (CH₂).

Composto 5e

IV (filme, CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 1513 (v, N-O), 1348 (v, N-O), 1268 (v, C-N).

EM (m/z): 438/436 (M^{+} , 28), 423/421 (9), 215 (91), 201 (82), 84 (100), 58 (62).

A seguir, temos a enumeração dos átomos de carbonos (estrutura A) e hidrogênios (estrutura B) do composto 5e. Através das técnicas de RMN^1H e ^{13}C (figuras 23 e 24, em anexo), HMQC (figuras 27 e 28, em anexo), HMBC (figuras 29 e 30, em anexo), COSY (figura 25 e 26, em anexo), RMN^{13}C e dept 90° e 135° realizamos a atribuição dos sinais dos hidrogênios e carbonos aos deslocamentos químicos conforme os dados abaixo.



RMN^1H (500 MHz; CDCl_3/TMS , δ , E/Z): 8,28 (1d, $\text{H6}'''\text{6}''$, $J=8,79$ Hz), 8,15 (1d, $\text{H6}'''\text{6}''$, $J=8,79$ Hz), 7,62 (1d, $\text{H6H6}'$, $J=6,60$ Hz), 7,60 (1d, $\text{H9H9}'$, $J=6,84$ Hz), 7,56 (1d, $\text{H10H10}'$, $J=8,30$ Hz), 7,51 (1d, $\text{H6H6}'$, $J=8,06$ Hz), 7,45 (1d, $\text{H9H9}'$, $J=8,55$ Hz), 7,43 (1d, $\text{H5}'''\text{H5}''$, $J=8,79$ Hz), 7,40 (1d, $\text{H5}'''\text{H5}''$, $J=8,79$ Hz), 7,27 (1d, $\text{H5H5}'$, $J=8,30$ Hz), 6,42 (1t, H2 , $J=6,72$ Hz), 6,39 (1t, H2 , $J=6,96$ Hz), 3,17 (1d, H1 , $J=6,59$ Hz), 3,04 (1d, H1 , $J=7,08$ Hz),

2,33 (H1'), 2,29 (H1').

RMN¹³C (125 MHz; CDCl₃/TMS, δ , *E/Z*): 148,07 (C4'), 147,20 (C7'), 146,97 (C7'), 146,37 (C4'), 142,24 (C3), 141,93 (C3), 139,94 (C4), 139,54 (C7), 139,21 (C8), 139,18 (C8), 137,39 (C4), 131,99 (C6 e C6'), 131,93 (C10 e C10'), 130,77 (C5'' e C5'''), 130,21 (C2, C5 e C5'), 128,60 (C9, C9', C10 e C10'), 128,51 (C5'' e C5'''), 128,02 (C2), 127,77 (C5 e C5'), 127,08 (C9 e C9'), 126,94 (C6 e C6'), 123,65 (C6'' e C6'''), 123,60 (C6'' e C6'''), 121,92 (C11), 121,80 (C11), 58,11 (C1), 58,06 (C1), 45,16 (C1'), 45,13 (C1').

5j (impuro)

IV (filme, cm⁻¹): 1752 (ν , C=O, ArOCOCH₃).

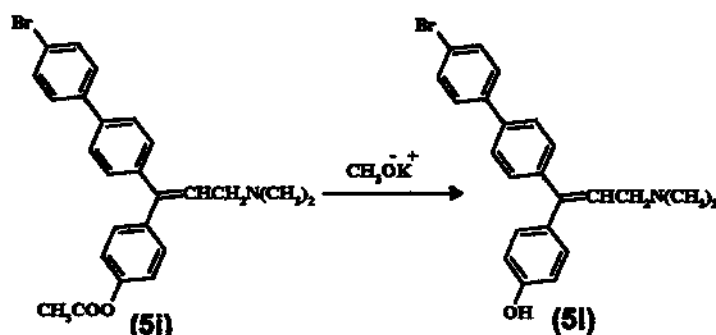
RMN¹H (300 MHz; CDCl₃/TMS): δ 7,8-6,8 (m, 24H Ar, *E/Z*), 6,33 (1t, 1H, -CH, *E/Z*, *J*=6,96), 6,30 (1t, 1H, -CH, *E/Z*, *J*=6,96 Hz), 6,28 (1t, 1H, -CH, *E/Z*, *J*=6,96 Hz), 3,45 (1d, 2H, -CH₂, *E/Z*, *J*=7,32 Hz), 3,32 (1d, 2H, -CH₂, *E/Z*, *J*=6,96 Hz), 2,43 (s, 6H, CH₃ -OCOCH₃, *E/Z*) e 2,30 (s, 12H, -N(CH₃)₂, *E/Z*) (figura 31, em anexo).

EM (*m/z*): 451/449 (M⁺, 27), 436 (8), 406 (5), 363 (13), 363 (13), 329 (41), 314 (92), 58 (100).

e). Hidrólise do composto 5j para síntese do derivado 5l

O composto **5j** (0,40 mmoles) foi colocado na presença de metóxido de potássio (5 mL) e mantido sob refluxo por 4-5 horas (esquema 8). Após esse período, realizamos uma extração com CH₂Cl₂ em meio ácido. Após o tratamento da reação, a fase orgânica obtida foi purificada por CCDP usando

como eluente acetato de etila/metanol 5%/TEA 0,4% e o produto da hidrólise (**5l**) obtido com $\pm 40\%$ de rendimento foi devidamente caracterizado de acordo com os dados a seguir.



Esquema 8 - Síntese do composto **5l** a partir da hidrólise do composto **5j**.

Composto 5l

IV (filme, CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3322 (v, ArOH).

RMN^1H (300 MHz; CDCl_3/TMS): δ 7,54-6,64 (m, 24H Ar, *E/Z*); 6,13 (1t, 1H, -CH *E/Z*, $J=6,96$ Hz); 6,00 (1t, 1H, -CH *E/Z*, $J=6,96$ Hz); 3,12 (1d, 2H, -CH₂ *E/Z*, $J=6,96$ Hz); 3,07 (1d, 2H, -CH₂ *E/Z*, $J=6,96$ Hz); e 2,27 (s, 12H -N(CH₃)₂, *E/Z*) (figura 32, em anexo).

EM (m/z): 409/407 (M^{+} , 100), 394/392 (34), 365/363 (41), 176 (47), 107 (29), 70 (46), 58 (63). (figura 33a, em anexo).

f). Redução do composto 5e para obtenção do derivado 5i

Como descrevemos anteriormente (item 3.1) utilizamos vários procedimentos para a síntese do derivado amina (**5i**). Nesta etapa, como alternativa, decidimos sintetizá-lo a partir da redução do derivado nitro (**5e**).

Num primeiro passo preparamos a cetona **3e** por reação de Friedel-Crafts e em seguida o composto **5e** por reação de Wittig como já descrito. Vários procedimentos foram realizados visando a reação de redução do grupo nitro do composto **5e**.

1ª. Tentativa

Baseado em procedimento descrito na literatura (Lalancette e Brindle, 1971), inicialmente preparamos NaBH_2S_3 a partir de NaBH_4 e S_2 , em atmosfera de argônio. Reagimos 1 mmol de NaBH_4 e 3 mmoles de S_2 na presença de THF como solvente. Após 30 minutos, o THF foi destilado e o sólido obtido foi lavado com éter de petróleo pelo menos três vezes. Para a reação de redução adicionamos 1 mmol de **5e** para 2 mmoles do agente redutor NaBH_2S_3 , na presença de THF. Após 72 horas interrompemos a reação por adição de H_2O , destilamos o THF e realizamos uma extração com CH_2Cl_2 . Da purificação por CCDP (acetato de etila/MeOH 10% como fase móvel) obtivemos 2 frações, nas quais não foi detectado o produto da reação.

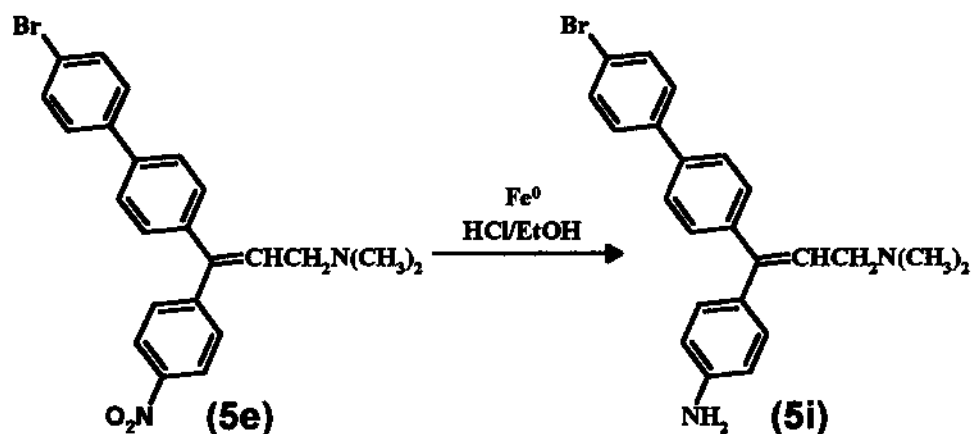
2ª. Tentativa

Nesta tentativa realizamos uma hidrogenação catalítica com Pd/C (10%) (Hammadi e col., 1996). O composto **5e** (0,23 mmoles) foi dissolvido em 100 mL de EtOH e a esta solução adicionamos 4,58 μmoles de Pd/C (10%). A amostra foi mantida sob agitação constante em temperatura ambiente e hidrogenação por 30 minutos. O catalisador foi removido por filtração e o solvente orgânico evaporado sob pressão reduzida. Como produto de reação

obtivemos o composto de partida **5e**.

3ª. Tentativa

A redução do grupo nitro do composto **5e** ocorreu na presença de $\text{Fe}^0/\text{EtOH}/\text{HCl}$ de acordo com metodologia descrita por Mahood e Schaffner (1948). Reagimos 0,11 mmoles (0,05 g) de **5e** com 6 mmoles (0,04 g) de Fe^0 em solução de EtOH 50% e HCl alcoólico (2 mol L^{-1}) sob refluxo por 6 horas (esquema 9). Após alcalinização da mistura com solução alcoólica de KOH 15% até pH 8,3, adicionamos 38 μl de H_2SO_4 alcoólico (3 mol L^{-1}) e a amostra foi filtrada. Destilamos o EtOH e realizamos uma extração com CH_2Cl_2 . O produto da reação foi purificado por CCDP com $\pm 30\%$ de rendimento e caracterizado por espectroscopia no IV, RMN^1H e espectrometria de massa como 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-aminofenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (**5i**), de acordo com os dados abaixo. Na Tabela 3, estão expressos as propriedades físicas deste composto.



Esquema 9 - Síntese do composto **5i** a partir da redução do composto **5e**.

Composto 5i

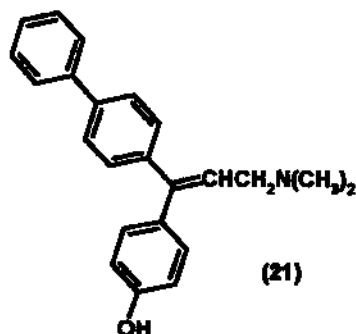
IV (filme, CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3054 (v, N-H), 1265 (v, C-N).

RMN¹H (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ): 7,60-6,59 (m, 24H Ar, *E/Z*), 6,28 (1t, 1H, -CH *E/Z*, *J*=6,96 Hz), 6,22 (1t, 1H, -CH *E/Z*, *J*=7,14 Hz), 3,81 (s, banda larga, 4H -NH₂, *E/Z*), 3,43 (1d, 2H, -CH₂ *E/Z*, *J*=6,96 Hz), 3,39 (1d, 2H, -CH₂, *E/Z*, 7,32 Hz), 2,49 (s, 12H -N(CH₃)₂, *E/Z*) (**figura 34**, em anexo).

EM (*m/z*): 408/406 (M⁺ 100), 393/391 (50), 130 (34), 106 (55), 70 (30), 58 (55) (**figura 33b**, em anexo).

g). Síntese do composto 21

A partir da metanona **20** sintetizamos o composto 3-[1,1'-bifenil]-4-il-3-(4-hidroxifenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (**21**) de acordo com o procedimento descrito para a reação de Wittig. Após a extração, o produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel 35-70 Mesh ASTM (Merck - Art. 7733) 0,2-0,5 mm com acetato de etila e em seguida purificado por CCDP utilizando-se acetato de etila/metanol 20% como fase móvel. O rendimento da reação foi de 80% e a caracterização foi realizada por espectroscopia no IV, RMN¹H, RMN¹³C e espectrometria de massa conforme os dados abaixo.



IV (filme, CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3322 (v, ArOH).

RMN^1H (500 MHz; CDCl_3/TMS , δ): 7,86 (s, banda larga, 2H -OH, *E/Z*), 7,53-6,7 (m, 26H Ar, *E/Z*), 6,14 (1t, 1H -CH, *E/Z*, $J=6,96$ Hz), 6,05 (1t, 1H, -CH *E/Z*, $J=6,96$ Hz), e 3,28 (1d, 2H, -CH₂ *E/Z*, $J=6,84$ Hz), 3,25 (1d, 2H, -CH₂ *E/Z*, $J=6,84$ Hz), 2,34 (s, 12H $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, *E/Z*) (figura 35a, em anexo).

RMN^{13}C (500 MHz; CDCl_3/TMS , δ): 157,46 (C), 157,82 (C), 146,71 (C), 146,39 (C), 140,36 (C), 140,22 (C), 140,21 (C), 140,14 (C), 140,03 (C), 137,74 (C), 132,00 (CH), 130,64 (CH), 129,79 (CH), 128,56 (CH), 128,55 (CH), 128,49 (CH), 127,73 (CH), 127,20 (CH), 127,06 (CH), 126,74 (CH), 126,71 (CH), 126,66 (CH), 126,54 (CH), 120,08 (C), 118,33 (C), 115,53 (CH), 115,50 (CH), 57,23 (CH_3), 56,95 (CH_3), 43,48 (CH_2), 43,43 (CH_2).

EM (m/z): 329 (M^+ , 100), 314 (41), 285 (50), 176 (29), 107 (30), 70 (26), 58 (45) (figura 35b, em anexo).

b). Separação dos isômeros geométricos dos compostos 5a e 5c

Os isômeros 5a*E* e 5a*Z* do composto 5a foram separados por cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) com o sistema eluente éter etílico/hexano/hidróxido de amônio (70:30:0,5) (Oliveira e col., 1999).

Para o composto **5c** o isolamento dos isômeros geométricos **5cE** e **5cZ** se procedeu por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo modelo Waters 600E Millipore com coluna Hi-Chrom semi-preparative HPLC column, Spherisorb S5W 5 μ M 25 cm x 10 mm. O isômero **5cE** teve um tempo de retenção de 62,94 minutos e o **5cZ** de 68 minutos. Para ambos os compostos, os isômeros foram caracterizados por ponto de fusão, espectrofotometria de UV/VIS e RMN¹H. A Tabela 4 expressa algumas propriedades físicas destes isômeros e os dados referentes à caracterização estrutural estão listados abaixo.

Tabela 4 - Propriedades físicas dos isômeros geométricos *E* e *Z* dos compostos **5a** e **5c**

Compostos	Ponto de Fusão °C	UV/VIS λ (nm) CH ₂ Cl ₂
5aE	123-125	286
5aZ	óleo	260
5cE	óleo	264
5cZ	131	280

5aE e **5aZ**, isômeros geométricos *E* e *Z* do composto **5a**

5cE e **5cZ**, isômeros geométricos *E* e *Z* do composto **5c**.

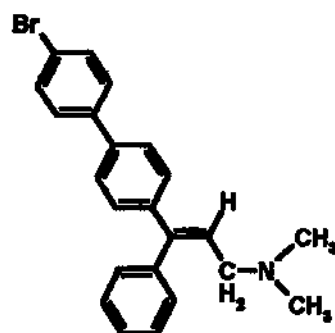
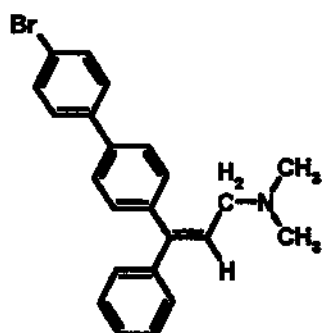
Caracterização estrutural

Isômeros geométricos do composto **5a**

RMN¹H (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ):

5aE: δ 7,49-7,09 (m, 13H, Ar), 6,26 (1t, 1H -CH $J=6,96$ Hz), 3,10 (1d, 2H -CH₂ $J=6,96$ Hz), 2,28 (s, 6 H -N(CH₃)₂) (**figura 36**, em anexo).

5aZ: δ 7,60-7,22 (m, 13H, Ar), 6,23 (1t, 1H, -CH $J=6,96$ Hz), 3,07 (1d, 2H, -CH $J=6,59$ Hz), 2,32 (s, 6 H, N(CH₃)₂) (**figura 37**, em anexo).

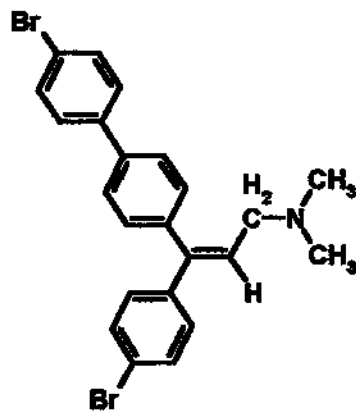
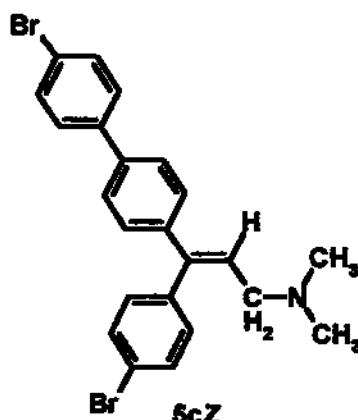
**5aE****5aZ**

Isômeros geométricos do composto 5c

RMN¹H (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ)

5cE: δ 7,61-7,36 (m, 8H, Ar), 7,22-7,14 (m, 4H Ar), 6,29 (1t, 1H -CH $J=6,59$ Hz), 3,22 (1d, 2H -CH₂ $J=6,96$ Hz), 2,24 (s, 6 H -N(CH₃)₂) (**figura 38**, em anexo).

5cZ: δ 7,58-7,06 (m, 12H, Ar), 6,30 (1t, 1H, -CH $J=6,78$ Hz), 3,04 (1d, 2H -CH₂ $J=6,59$ Hz), 2,28 (s, 6 H, -N(CH₃)₂) (**figura 39**, em anexo).

**5cE****5cZ**

3.3) Ensaios Biológicos *In Vitro*

3.3.1) Determinação da Atividade tripanossomicida

A avaliação da atividade tripanossomicida *in vitro* foi realizada com a colaboração da Professora Dra. Solange Lisboa de Castro da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y foram obtidas de camundongos com pico de parasitemia após 7 e/ou 22 dias de inoculação. Os parasitas foram isolados por centrifugação diferencial do sangue dos animais. As formas epimastigotas foram mantidas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) e coletadas na fase exponencial de crescimento.

Quando necessário, o sangue infectado com o parasita foi diluído em meio de cultura DMEM a uma concentração final de $2,5 \times 10^6$ cél/mL. Esta suspensão foi adicionada à droga na proporção de 1:1 e a mistura foi incubada à 4°C. As drogas foram dissolvidas em DMSO e diluídas para utilização.

Os parasitas foram incubados na presença ou ausência de cada droga, em meio de cultura DMEM de 2 à 72 horas à 37°C e a avaliação de mobilidade ou sobrevivência das formas tripomastigotas do parasita foi realizada examinando-as ao microscópio ou contando-as em câmaras de Neubauer após 24 horas de incubação (De Castro e Meirelles, 1987). Neste experimento avaliamos a atividade dos compostos 5i, 5l e 21. A concentração da droga que corresponde à inibição de 50% do crescimento dos parasitas é definida como ID₅₀ (ou seja, dose em que ocorre 50% de sobrevivência das formas tripomastogotas).

3.3.2) Avaliação da Atividade Antimicobacteriana

Estes testes foram realizados no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto em colaboração com a pesquisadora Daisy Nakamura Sato. A atividade antimicobacteriana dos derivados de diarilpropenaminas foi avaliada em cepas padrões de micobactérias e em cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes portadores de tuberculose. Estas últimas foram classificadas em sensíveis ou resistentes à quimioterapia usada na tuberculose, como será descrito a seguir. Também determinamos as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para as drogas anti-tuberculose Isoniazida, Estreptomicina, Etambutol, Pirazinamida e Rifampicina.

Os primeiros ensaios para determinação das CIMs foram realizados através da técnica da macrodiluição em tubos em meio líquido de Middlebrook 7H9 e subcultivo em meio Lowenstein-Jensen para determinação das concentrações bactericidas mínimas (CBMs) (Ericsson e Sheris, 1971). Numa segunda etapa passamos a determinar somente as CIMs utilizando a microdiluição em placa (Collins e Franzblau, 1997).

a). Determinação do perfil de sensibilidade de cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes

A determinação do perfil de sensibilidade das micobactérias à diferentes drogas foi efetuada pelo Método das Proporções Indireto (Brasil, 1994). O método consiste em se estabelecer a proporção de mutantes resistentes de determinada cepa de *M. tuberculosis* à diferentes drogas utilizadas no tratamento da tuberculose. Para cada droga utilizada se estabeleceu uma concentração crítica, capaz de inibir o desenvolvimento da maioria das cepas

clínicas e se determinou uma proporção crítica, que é definida como a proporção de mutantes resistentes de uma população bacteriana, acima da qual a cepa é considerada resistente (Canetti e col., 1963).

Os antimicrobianos utilizados foram a Isoniazida (Sigma), Rifampicina (Sigma), Pirazinamida (Sigma), Sulfato de Estreptomicina (Sigma) e Cloreto de Etambutol (Sigma). Essas drogas foram dissolvidas em DMSO à 10 mg L⁻¹ (com exceção da Rifampicina que foi dissolvida em metanol) e diluídas até as concentrações desejadas. A seguir, foram adicionadas ao meio de cultura de Lowenstein-Jensen antes da solidificação, de maneira, a se obter as concentrações críticas citadas na **Tabela 5**.

A partir de uma cepa de *M. tuberculosis* isolada de espécimes clínicos preparou-se uma suspensão micobacteriana. Várias colônias foram colocadas em um frasco contendo pérolas de vidro e cerca de 1 mL de água destilada estéril. Após a agitação em Vortex, deixou-se em repouso por 5 minutos, para deposição das micobactérias presentes no aerossol. A suspensão micobacteriana (tubo “mãe”) foi comparada com a escala padrão de McFarland N° 1 (3×10^8 cél/mL) (Hendrickson, 1985) e diluídas em água destilada estéril para obtenção das concentrações de 3×10^3 à 3×10^7 cél/mL. 200 µL das diluições de 10^3 e 10^5 cél/mL foram inoculadas nos meios de cultura sem droga (frasco **a** - controle) e meios de cultura contendo as drogas nas suas concentrações críticas (frasco **b** - teste). Os cultivos assim preparados foram incubados à 37°C por 28 dias, quando se realizou a leitura.

Para a determinação da proporção dos bacilos resistentes, foi realizada a contagem de colônias no frasco teste (**b**) e o número obtido foi dividido pelo número de colônias no frasco controle (**a**) e multiplicado por 100 (**b/a x 100**). A cepa de *M. tuberculosis* foi considerada sensível a determinada droga quando a proporção de bacilos resistentes foi inferior à proporção crítica e resistente quando a proporção de bacilos resistentes foi superior à proporção

crítica citadas na Tabela 5

Tabela 5 - Critérios de resistência do *M. tuberculosis* H₃₇Rv aos antimicrobianos

Antimicrobianos	Concentração Crítica $\mu\text{mol L}^{-1}$	Proporção Crítica %
Isoniazida	1,46	1
Pirazinamida	1620	10
Rifampicina	48,6	1
Estreptomicina	2,74	10
Etambutol	7,2	1

b). Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pela macrodiluição em tubos

Para a determinação das CIMs e CBMs (Ericsson e Sheris, 1971) os derivados de diarilpropenamias (5a, 5aE, 5aZ, 5c, 5cE, 5cZ, 5l e 5i) foram dissolvidos em DMSO (1 g L⁻¹) e as diluições subsequentes (0,22 à 320 $\mu\text{mol L}^{-1}$) efetuadas nos próprios tubos de ensaio contendo o meio de cultura Middlebrook 7H9. As drogas anti-tuberculose foram preparadas como anteriormente mencionado e como controles utilizamos tubos contendo a suspensão micobacteriana e o DMSO nas mesmas proporções usadas para as amostras.

Nestes testes, utilizamos cepas de *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294, *M. tuberculosis* H₃₇Ra ATCC 25177, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. avium* ATCC 15769, *M. intracellulare* ATCC 25169, *M. cellatum* ATCC 51130, *M. malmoense* ATCC 29571 e as cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes. As cepas foram cultivadas em meio de Lowenstein-Jensen à 37°C por três

semanas e subcultivadas em meio líquido de Middlebrook 7H9 (Difco) à 37°C por 10 dias, quando a densidade micobacteriana atingiu uma turbidez correspondente a escala padrão N°1 de McFarland (3×10^8 cél/mL). Aos tubos contendo 2 mL de meio de cultura com as diferentes concentrações das drogas e aos tubos controle (contendo somente meio de cultura) foram inoculados 50 µl da suspensão micobacteriana. Os tubos foram incubados à 37°C por 10 dias, quando se realizou a leitura macroscópica do crescimento micobacteriano, por turvação do meio de cultura. A CIM foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir macroscopicamente o crescimento micobacteriano.

Para a determinação das CBMs foi realizado o subcultivo em meio de cultura sólido das diluições iguais ou superiores às CIMs determinadas pela técnica da macrodiluição. Para isso, 100 µL das diferentes diluições das drogas foram inoculados em meio de cultura de Lowenstein-Jensen e incubados à 37°C por 28 dias, para posterior leitura. A CBM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir mais de 99,9% da população micobacteriana no meio de cultura.

c). Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas pela microdiluição em placa

As CIMs também foram determinadas pela técnica da microdiluição em placa utilizando como revelador o corante Alamar Blue (MABA - Microplate Alamar Blue Assay) (Collins e Franzblau, 1997). Os derivados de diarilpropenaminas (5a, 5aE, 5c, 5cE, 5cZ, 5l, 5i e 21) e as drogas usadas na quimioterapia da tuberculose foram preparadas como mencionado nos itens

3.3.2.a e 3.3.2.b. As cepas de micobactérias foram cultivadas em meio de Lowenstein-Jensen à 37°C por três semanas e subcultivadas em meio líquido de Middlebrook 7H9 (Difco) à 37°C por 10 dias, quando a densidade micobacteriana atingiu uma turbidez correspondente a escala padrão N^º1 de McFarland (3×10^8 cél/mL). A suspensão micobacteriana foi diluída 1:25 em meio de cultura 7H9 e 100 µl ($1,2 \times 10^7$ cél/mL) foram adicionados a microplaca contendo 100 µL de meio de cultura e diferentes concentrações das drogas. As cavidades controles continham meio de cultura (controle do meio de cultura – CMC), as drogas e meio de cultura (controle da droga - CD) ou meio de cultura e micobactérias (controle da micobactéria - CM). As microplacas foram incubadas à 37°C e após 5 dias, adicionou-se 25 µl de uma mistura 1:1 de Tween 80 à 10% e Alamar Blue a uma das cavidades controle da micobactéria. Caso a preparação contida nessa cavidade tenha se tornado rósea, a solução do corante Alamar Blue e Tween 80 era adicionada às demais cavidades. As microplacas eram re-incubadas à 37°C e após 24 horas a leitura macroscópica era efetuada para determinação das CIMs, definidas como a menor concentração da droga capaz de impedir a alteração da cor azul para rósea. Os ensaios foram realizados pelo menos em triplicata para as cepas padrões e uma vez para as cepas isoladas de pacientes. A permanência da cor azul nos orifícios indica a ausência de crescimento micobacteriano e o desenvolvimento da cor rósea indica a presença de crescimento micobacteriano.

3.3.3) Avaliação da citotoxicidade em Células Fibroblásticas

A avaliação da citotoxicidade dos compostos **5i**, **5l** e **21** foi realizada

com a colaboração do grupo da Prof^a Marcela Haun (Laboratório de Cultura de Células, Instituto de Biologia - Unicamp). As células utilizadas foram fibroblastos de pulmão de hamster chinês, linhagem estabelecida em cultura V79.

a). Manutenção da cultura celular

As células V79 são armazenados sob nitrogênio líquido em meio de cultura DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino e 10% de DMSO. Um tubo contendo células é retirado do nitrogênio e, imediatamente, colocado em estufa à 37°C. Após cerca de 15 minutos, o sobrenadante é removido e o aglomerado de células que permanece no fundo do tubo é homogeneizado com 1 mL de meio de recondicionamento (meio de cultura metabolizado por células em fase de crescimento) e colocado em uma placa de Petri contendo 4 mL do mesmo meio de cultura. Quando ocorre a fixação das células na placa (após cerca de 6 horas) o meio de cultura é novamente trocado. Os primeiros repiques são realizados à medida em que as células atingem a densidade de confluência. A fase de adaptação das células ao novo ambiente dura aproximadamente 7 dias e dessa etapa em diante, a cultura é mantida continuamente através de repiques periódicos.

Para a realização dos ensaios, o cultivo das células foi realizado em meio DMEM, contendo 100 U/mL de Penicilina e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Sulfato de Estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A incubação foi feita em estufa à 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 (Melo, 1996).

Os derivados de diarilpropenaminas **5i**, **5l** e **21** foram dissolvidos em DMSO (1 g L^{-1}) e diluídos em meio de cultura DMEM. Nos três diferentes

ensaios de citotoxicidade, descritos a seguir (DNA, VN, MTT), o plaqueamento foi realizado inoculando-se 3×10^4 cél/mL em cada cavidade da placa (24 cavidades) e os ensaios foram realizados em triplicatas. As células foram incubadas por 48 horas à 37°C e em seguida, foram expostas durante 24 horas à concentrações de 2 à 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A citotoxicidade é expressa por valores de IC_{50} que representa a concentração da droga que inibe 50% da proliferação celular.

b). Quantificação de DNA (DNA)

Após a incubação e remoção do meio de cultura contendo as drogas **5i**, **5l** e **2l**, as células foram lavadas com PBS- Ca^{2+} , fixadas com ácido tricloroacético 5%, lavadas 2 vezes com etanol (todas as soluções geladas), secas sob temperatura ambiente e lisadas com hidróxido de sódio 0,5 mol L^{-1} (1 mL/cavidade, 1 hora à 37°C). A absorvância do lisado foi medida à 260 nm em espectrofotômetro UV/Vis. O crescimento relativo das células tratadas com os derivados de diarilpropenaminas foi expresso em porcentagem com relação ao controle (células sem tratamento) nas mesmas condições experimentais. Foram construídos os gráficos de proliferação das células tratadas com relação ao controle (não tratado) versus concentração das drogas utilizadas, obtendo-se, por interpolação, o valor de IC_{50} para cada composto (Cingi e col., 1991).

c). Incorporação do corante vermelho neutro (VN)

Após o tratamento das células com as drogas, o meio de cultura foi

removido e substituído por outro sem soro contendo o corante VN na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, pré-incubado durante 12 horas à 37°C e filtrado antes do uso, em membrana Millipore ($0,22 \mu\text{m}$). Após três horas de incubação, as células foram lavadas com PBS- Ca^{2+} à 37°C para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomas. A cada cavidade das placas foi adicionado 1 mL de uma solução aquosa contendo ácido acético glacial (1%) e etanol (50%) para fixar as células e extrair o corante incorporado nos lisossomas. As placas foram agitadas por 20 minutos e a absorvância das soluções foi lida à 540 nm em espectrofotômetro UV/VIS. Foram construídos os gráficos que expressam a captação do corante por células tratadas com relação à células não tratadas (controle) versus concentração das drogas utilizadas. Por interpolação dos dados o valor de IC_{50} é obtido para cada composto (Riddell e col., 1986).

d). Redução do sal de tetrazólio MTT (MTT)

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

4) Resultados e Discussão

4.1) Síntese do derivado 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-aminofenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (5i)

a). Síntese do cloreto de ácido *p*-aminobenzóico a partir do SOCl₂

Na tentativa de obtenção do cloreto de ácido *p*-aminobenzóico, da reação entre PABA (6) e SOCl₂ (7) obtivemos o cloreto de *p*-sulfinilaminobenzoila (8). Por espectroscopia no IV detectamos uma banda em 1654 cm⁻¹ atribuída à carbonila do grupo RCOCl. Na acilação de Friedel-Crafts para obtenção da metanona 9 não conseguimos caracterizar o produto da reação (esquema 2). Provavelmente ocorreu a formação de polímeros o que estaria dificultando a reação de acilação (Mathias e col., 1987). Como alternativa para evitar a polimerização efetuamos a proteção do grupo amino usando o cloreto de *p*-toluenossulfonil (cloreto de tosila).

b). Proteção do grupo amina do PABA com cloreto de *p*-toluenossulfonil e síntese do cloreto de ácido *p*-toluenossulfonilaminobenzóico

O grupo amina do PABA (6) foi protegido com o cloreto de tosila (10) originando o composto 11 com rendimento quantitativo. Por espectroscopia no IV identificamos as bandas referentes à carbonila do ácido carboxílico (ν 1708 cm⁻¹), à ligação C=C do anel aromático (ν 1606 cm⁻¹) e às sulfonas (ν assimétrico 1336,1 cm⁻¹ SO₂ e ν simétrico 1152,3 cm⁻¹) (figura 12). Da reação entre o ácido *p*-toluenossulfonilaminobenzóico (11) e SOCl₂ (7) (esquema 3) pretendíamos obter o respectivo cloreto de ácido (12) mas obtivemos um

sólido amarelo não identificado.

c). Síntese do cloreto de ácido *p*-toluenossulfonilaminobenzóico a partir do PCl_5

Utilizando o PCl_5 (13) para a cloração e como solvente o benzeno obtivemos o cloreto de ácido de *p*-toluenossulfonilaminobenzóico (12) (esquema 4). Por IV identificamos uma banda em $1681,1 \text{ cm}^{-1}$ referente à carbonila do grupo RCOCl , além das bandas já mencionadas para o íon carboxilato e sulfonas. Na tentativa de síntese da metanona 14 não foi possível a caracterização do produto de reação que por espectroscopia no IV não apresentou bandas características.

d). Proteção do grupo amina do PABA (6) com o grupo acetil e formação do cloreto de ácido *p*-acetamidobenzóico

O grupo amina do PABA (6) foi acetilado formando o ácido *p*-acetamidobenzóico (16), o qual foi caracterizado por espectroscopia no IV (ν 3305 $-\text{NH}$ ArNHCOCH_3 ; ν 1686,4 e 1525,4 $\text{C}=\text{O}$ ArNHCOCH_3 ; ν 1589,8 $\text{C}=\text{C}$, Ar) e ponto de fusão. Da reação deste ácido (16) com SOCl_2 (7) para síntese do cloreto de ácido *p*-acetamidobenzóico (17), o grupo de proteção (acetil) foi hidrolisado e como produto da reação recuperamos o reagente de partida PABA (6), o qual foi devidamente caracterizado por espectroscopia no IV. Esta hidrólise provavelmente se deve as condições ácidas do meio reacional.

4.2) Síntese dos compostos 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina (5a, 5c, 5e, 5j, 5l e 5i)

As cetonas 3a, 3c, 3j e 3g foram obtidas através de uma acilação de Friedel-Crafts entre 4-bromobifenila (2) e os respectivos cloretos de ácido (1) como descrito na parte experimental (esquema 1). Para o derivado acetoxila não há cloreto de ácido 4-acetoxifenila disponível comercialmente. Desta forma, numa primeira etapa obtivemos o ácido 4-acetoxibenzóico e em seguida o respectivo cloreto de ácido para a realização da reação de Friedel-Crafts.

a). Síntese do Ácido 4-acetoxibenzóico e Cloreto de ácido 4-acetoxibenzóico

O ácido 4-acetoxibenzóico (19) foi obtido a partir do ácido 4-hidroxibenzóico (18) e caracterizado por ponto de fusão, espectroscopia no IV e RMN¹H- (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ). Através de espectroscopia no IV verificamos o aparecimento das bandas em 1759,8 e 1682,7 cm⁻¹ atribuídas respectivamente às carbonilas dos grupos ArOCOCH₃ e ArCOOH e em 1604,9 cm⁻¹ temos o v referente à ligação C=C do anel aromático (figura 13). No espectro de RMN¹H observamos em δ 2,35 a presença de um singlete atribuído ao grupo metila e respectivamente, em δ 8,20 e 7,29 dois dubletes atribuídos aos hidrogênios do anel aromático (figura 14).

A partir do ácido 4-acetoxibenzóico (19), obtivemos o cloreto de ácido 4-acetoxibenzóico (1j). A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (fase móvel: acetato de etila/Metanol 10%) e verificamos a formação do produto de reação. Com o decorrer do tempo há o surgimento de

uma mancha mais apolar correspondente ao composto **1j**, o qual é um óleo amarelo e foi caracterizado por IV apresentando uma banda em $1773,4\text{ cm}^{-1}$ referente ao ν da carbonila do grupo ArCOCl . Ocorreu um deslocamento da banda referente à carbonila do grupo ArCOOH já que esta passou a se ligar ao cloreto. A banda referente à carbonila do grupo ArOCOCH_3 , provavelmente está aparecendo junto com a banda da carbonila do cloreto de ácido, sobrepostas (**figura 15**).

b). Síntese das 4'Bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-X-fenil metanonas (3a, 3c, 3e, 3g e 3j)

As cetonas foram obtidas como descrito na parte experimental e a caracterização estrutural foi efetuada principalmente por análise dos espectros de IV, RMN^1H , RMN^{13}C e espectrometria de massa. Todas as metanonas, por espectroscopia no IV, apresentam uma banda da carbonila em torno de 1640 cm^{-1} . No espectro de RMN^1H temos os sinais em multiplete na região de $\delta\ 8,0\text{-}7,0$ referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos. As cetonas **3g** e **3j** apresentam um singlete em $\delta\ 3,9$ e $2,35$ (**figuras 16 e 17**) correspondentes às suas respectivas metilas. Em espectrometria de massa por injeção direta (EI-70 eV) os íons moleculares ($\text{M}^{+\bullet}$) de todas as cetonas foram detectados. Os dados referentes aos picos base e os principais fragmentos formados para cada metanona estão listados na parte experimental.

c). Desmetilação da 4'Bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-metoxifenil metanona (3g) e síntese da 1,1'-[bifenil]-4-il 4-hidroxifenil metanona (20)

Através da desmetilação da metanona 3g pretendíamos obter a cetona 3l conforme o procedimento descrito para um composto similar (Sergievskaia e Chemerisskaia, 1950). Na caracterização do produto obtido 20 por RMN¹H (figura 19) detectamos o desaparecimento do singlete em δ 3,9 (atribuído ao grupo metila da metoxila) mostrando que a desmetilação ocorreu e em δ 8,35-7,31 há sinais em multipletes referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos. Ao analisar o espectro de massa (figura 19a) verificamos que o íon molecular (M^{+}) tem relação m/z de 274 e não há a presença de isótopos de bromo nos fragmentos formados. No caso da metanona 3l, o M^{+} deveria ter relação m/z de 354 e apresentar isótopos do bromo. Por espectroscopia no IV a metanona 3g apresenta uma banda em $1256,4\text{ cm}^{-1}$ (figura 20a) atribuída ao grupo ArOCH_3 , a qual desaparece após a desmetilação. A metanona 20 além dos ν da carbonila do grupo ArCOCl apresenta ν do grupo hidroxila (ArOH) em $3323,5\text{ cm}^{-1}$ (figura 20b). Através de uma análise qualitativa de bromo por fluorescência de raio-X (figura 19b) verificamos que a porcentagem de íons brometo encontrada na amostra é insignificante como demonstra a Tabela 2 no item 3.2.c. Durante a desmetilação também ocorreu a perda do brometo da posição *para* do anel bifenila e o produto de reação trata-se da 1,1'-bifenil-4-il 4-hidroxifenil metanona (20).

d). Reação de Wittig para síntese dos derivados de diarilpropenaminas

Os compostos 5a, 5c, 5e, 5j, 5l e 5i foram obtidos e caracterizados como

descrito na parte experimental. De forma generalizada, os espectros de RMN¹H (5a figura 21; 5c figura 22; 5e figuras 23 e 25 à 30; 5j figura 31, 5l figura 32; 5i figura 34) evidenciam a presença de duplo triplete (região δ 6,0-6,5) e duplo dublete (região δ 3,0-3,5) referentes ao acoplamento dos sinais dos grupos -CH e -CH₂ dos isômeros geométricos *E* e *Z* presentes nestes compostos. Os espectros ainda mostram sinais em multiplete na região de δ 8,2-6,8 atribuídos aos hidrogênios dos anéis aromáticos.

Para o composto 5e a completa atribuição dos sinais dos espectros de RMN de ¹H (figura 23) e ¹³C (figura 24) só foi possível com a utilização das técnicas bidimensionais como COSY (atribuição dos sinais de RMN¹H; figuras 25 e 26), HMQC (atribuição dos sinais do -CH, -CH₂ e -CH₃; figuras 31 e 32) e HMBC (atribuição dos carbonos quaternários; figuras 27 e 28). Esta atribuição foi realizada somente para o composto 5e porque dentre os compostos sintetizados o substituinte nitro na posição *para* do anel fenila confere maior efeito de desproteção sobre os hidrogênios aromáticos contribuindo para deslocamentos químicos mais separados.

O composto 5j foi obtido juntamente com impurezas ou produtos secundários os quais não foram eliminados por CCDP e foram detectados por RMN¹H (figura 31). Verificamos que, além das impurezas observadas, o composto obtido não se tratava apenas do derivado acetoxila, mas também do composto hidroxilado, o que nos parece possível, porque na reação de Wittig o meio reacional é básico o que levaria a hidrólise (parcial) do grupo acetila, principalmente no momento em que adicionamos água para interrupção da reação. Para esclarecer se esta hidrólise realmente estava ocorrendo, uma parte da amostra foi acetilada e através de RMN¹H observamos o desaparecimento de um triplete na região de δ 6,2 e de um dublete em δ 3,2 que estariam correspondendo, respectivamente, aos prótons dos grupos -CH e -CH₂ do

derivado hidroxilado. Os sinais, à princípio, atribuídos aos tripletes e dubletes do derivado acetoxila (grupos $-CH$ e $-CH_2$), respectivamente, em δ 6,33 e 6,30 e δ 3,45-3,32 não apresentaram nenhum deslocamento.

Realizamos várias tentativas de purificação alterando a composição da fase móvel da coluna cromatográfica ou a sílica utilizada. Na 3ª e última tentativa o composto foi tratado com ácido tartárico onde pretendíamos transformá-lo para a forma de sal, e assim isolá-lo na fase aquosa. Como descrito na parte experimental, o composto foi solubilizado na fase orgânica juntamente com impurezas não eliminadas por CCDP.

e). Hidrólise do composto 5j para síntese do composto 5l

Após hidrólise com metóxido de potássio obtivemos o composto 5l. Em RMN¹H (figura 32) na região de campo baixo δ 7,54-6,64 há sinais em multiplete referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos e em δ 6,13 e 6,0 há dois tripletes e em δ 3,12 e 3,07 dois dubletes, correspondentes, respectivamente, aos hidrogênios dos grupos $-CH$ e $-CH_2$. Em espectrometria de massa (figura 33a), o íon molecular (M^{++}) de relação m/z 409/407 foi detectado e o pico base tem relação m/z de 58.

f). Redução do composto 5e para obtenção do derivado 5i

Na primeira tentativa de redução do grupo nitro do composto 5e quando utilizamos $NaBH_2S_3$, o produto da reação não foi identificado. Na segunda tentativa, por hidrogenação catalítica com Pd/C a redução também não

ocorreu, mas o produto de partida foi recuperado. Possivelmente, o tempo de 30 minutos não foi suficiente para que a reação ocorresse.

A redução do composto **5e** finalmente ocorreu quando utilizamos Fe^0 como agente redutor. O composto **5i** foi obtido e devidamente caracterizado. Nos espectros de RMN^1H (figura 34) os sinais em δ 7,6-6,59 são atribuídos aos hidrogênios dos anéis aromáticos e em δ 6,28 e 6,22 e 3,43 e 3,39, há dois tripletes e dois dubletes atribuídos respectivamente, aos grupos CH e CH_2 . Em δ 2,49 há um singlete referente às metilas do grupo $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ e em δ 3,81 há uma banda larga atribuída aos hidrogênios do grupo $-\text{NH}_2$. Por espectrometria de massa (figura 33b) o íon molecular, (M^{+} , 408/406) foi detectado e o pico base tem relação m/z 393/391.

g). Síntese do composto 21

Na primeira tentativa de síntese do composto **5l** pretendíamos obter a metanona **3l** a partir da metanona **3g** e por reação de Wittig o composto **5l**. Além da desmetilação ocorreu perda do brometo da posição *para* do anel bifênica de **3g** originando o composto **20**, como descrito na parte experimental. Nesta etapa decidimos obter o composto **21** e utilizá-lo nos ensaios biológicos, considerando a possibilidade de determinação da importância do brometo para a atividade biológica. A partir da metanona **20** o composto **21** foi obtido e purificado. Por RMN^1H (figura 35a) observamos entre δ 7,53-6,7 um sinal em multiplete atribuído aos H dos anéis aromáticos. Os 2 tripletes em δ 6,14 e 6,05 são devido ao acoplamento do H do grupo $-\text{CH}$ com os H do grupo $-\text{CH}_2$ (isômeros *E* e *Z*); em δ 3,28 e 3,25 há 2 dubletes referentes ao acoplamento dos H do grupo $-\text{CH}_2$ com o H do grupo $-\text{CH}$ (isômeros *E* e *Z*); e em δ 2,34

um singlete correspondente as metilas do grupo $-N(CH_3)_2$. Em espectrometria de massa (figura 35b) o íon molecular (M^{+}) de relação m/z 329 é detectado com seus respectivos fragmentos e o pico base tem relação m/z 285.

h). Separação dos Isômeros geométricos dos compostos 5a e 5c

O isolamento dos isômeros geométricos do composto 5a se procedeu por cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) e foi confirmada por análise das frações obtidas através de espectrofotometria de UV/VIS e RMN¹H. O isômero 5aZ apresentou uma absorção máxima em 260 nm e o isômero 5aE em 286 nm. Esta diferença entre valores de $\lambda_{\text{máx}}$ se deve, provavelmente, à posição dos grupos substituintes mais volumosos que no isômero 5aE estão em lados opostos da dupla ligação, livres de impedimento estérico, o que permite coplanaridade do grupo bifenila com o sistema de elétrons π conjugados. Para o isômero 5aE temos o sinal de um próton em δ 6,26 (1t, -CH) (figura 36) e para o próton do isômero 5aZ o sinal ocorre em δ 6,23 (1t, -CH) (figura 37). Os prótons do grupo $-CH_2$ estão mais desprotegidos no isômero 5aE (1d, δ 3,10) e este fato também ocorre para os hidrogênios das metilas.

Para o composto 5c os isômeros 5cE e 5cZ foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O isômero 5cE teve um tempo de retenção de 62.94 minutos e o 5cZ de 68 minutos. O isômero de configuração 5cZ apresenta-se como um sólido branco e absorve no UV em 280 nm e o de configuração 5cE é um óleo amarelo com absorvância máxima em 264 nm. Através de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) e espectrofotometria de UV/Vis confirmamos a separação dos isômeros 5cE e 5cZ (figuras 38 e

39). Para os isômeros isolados, pode se observar nos espectros de RMN¹H, a presença de apenas um triplete devido ao acoplamento do próton do grupo -CH com os prótons do -CH₂, e um dublete que corresponde ao acoplamento dos prótons do -CH₂ com o -CH.

4.3) Ensaios Biológicos *In Vitro*

4.3.1). Atividade tripanossomicida

A atividade tripanossomicida foi avaliada em formas sanguíneas tripomastigotas e epimastigotas - cepa Y - através da determinação da ID₅₀, dose que inibe 50% da proliferação celular no tempo de 24 horas (ID₅₀/24h/4°C).

Nas formas tripomastigotas, os derivados de diarilpropenaminas apresentam valores de ID₅₀ consideravelmente menores que a ID₅₀ do Nifurtimox ($157,0 \pm 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e do Cristal Violeta ($536,6 \pm 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) utilizado em bancos de sangue. Os compostos **5l**, **5i** e **21** apresentaram ID₅₀, respectivamente de $29,1 \pm 2,1$; $121,7 \pm 12,0$ e $25,7 \pm 1,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ para tripomastigota e $16,5 \pm 1,7$; $71,7 \pm 6,2$ e $8,4 \pm 1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ para epimastigota. A atividade tripanossomicida está na mesma faixa daquela anteriormente encontrada para os outros derivados de diarilpropenaminas como mostra a Tabela 6 abaixo (De Conti e Col., 1996ab). Ao compararmos a ID₅₀ do composto **5l** com o **21** verificamos maior efetividade do composto **21** sobre as formas epimastigotas, mostrando que o átomo de bromo na posição para do anel bifenila provavelmente não é relevante para a atividade tripanossomicida.

Tabela 6 - Atividade tripanossomicida dos derivados de diarilpropenaminas, Nifurtimox e Cristal Violeta

Compostos	ID ₅₀ /24 HORAS $\mu\text{mol L}^{-1}$		
	tripomastigota (-4°C)	amastigota (24°C)	epimastigota (28°C)
Cristal violeta*	536,6 $\pm$ 3,0	ND	ND
Nifurtimox*	157,0 $\pm$ 3,0	207,3 $\pm$ 35,4	163,7 $\pm$ 4,1
5a*	18,8 $\pm$ 1,2	6,6 $\pm$ 1,2	12,7 $\pm$ 0,1
5b*	50,8 $\pm$ 8,1	6,7 $\pm$ 0,3	15,8 $\pm$ 1,7
5c*	12,1 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 0,2	13,2 $\pm$ 1,6
5d*	33,0 $\pm$ 0,5	8,9 $\pm$ 0,3	17,8 $\pm$ 2,1
5e*	35,0 $\pm$ 2,7	6,9 $\pm$ 0,4	24,3 $\pm$ 2,0
5f*	22,0 $\pm$ 0,5	23,1 $\pm$ 1,0	25,1 $\pm$ 3,5
5g*	54,9 $\pm$ 2,2	6,1 $\pm$ 0,8	27,1 $\pm$ 2,2
5h*	34,4 $\pm$ 4,8	6,0 $\pm$ 0,6	18,2 $\pm$ 3,0
5i	29,1 $\pm$ 2,1	ND	16,5 $\pm$ 1,7
5i	121,7 $\pm$ 12,0	ND	71,7 $\pm$ 6,2
21	25,7 $\pm$ 1,7	ND	8,4 $\pm$ 1,2

*De Conti e col., 1996b, ND-Não determinado

4.3.2) Atividade Antimicobacteriana

Considerando o desenvolvimento de resistência micobacteriana várias drogas têm sido testadas na busca de uma nova quimioterapia para o tratamento da tuberculose. Neste sentido, determinamos as CIMs e as CBMs utilizando diferentes cepas padrões de *Mycobacterium* e cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes. No caso das cepas de pacientes, estas foram classificadas em sensíveis ou resistentes à quimioterapia usada na tuberculose.

a). Perfil de Sensibilidade das cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes

Dezoito cepas de *M. tuberculosis* foram isoladas de escarro de pacientes portadores de tuberculose, identificadas por números, congeladas e cultivadas em meio Lowenstein-Jensen antes dos experimentos. Utilizamos cepas sensíveis ou resistentes, às drogas Pirazinamida, Isoniazida, Rifampicina, Estreptomicina e Etambutol. Na Tabela 7, está o perfil de sensibilidade destas cepas que foram classificadas em resistentes ou sensíveis de acordo com o método das proporções indireto.

Dentre as cepas isoladas há grande número de cepas sensíveis. Sensíveis ou resistentes, estas cepas são importantes no estudo porque são diferenciadas das cepas padrões ATCC, uma vez que já sofreram interferências do meio. Dessa forma é de grande relevância a utilização dessas cepas na triagem de compostos anti-tuberculose.

Para a Pirazinamida na concentração crítica de $1620 \mu\text{mol L}^{-1}$ o número de colônias no frasco teste foi inferior à 10% (proporção crítica) do número encontrado no frasco controle (sem droga) para todas as cepas testadas e consequentemente essas são consideradas sensíveis à Pirazinamida. No caso da Isoniazida a concentração crítica é de $1,46 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a proporção crítica de 1%. Há quatro cepas resistentes significando que para essas cepas o número de colônias encontradas no frasco teste está acima de 1% do número encontrado no controle. Para o Etambutol ($7,21 \mu\text{mol L}^{-1}$), Rifampicina ($48,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) e Estreptomicina ($2,74 \mu\text{mol L}^{-1}$) as concentrações críticas são respectivamente 1%, 1% e 10%. A cepa 3415 é resistente ao Etambutol, Isoniazida, Rifampicina e Estreptomicina; a 3082 à Isoniazida e Rifampicina e as cepas 2050 e 258 são resistentes somente à Isoniazida.

Tabela 7 - Perfil de sensibilidade das cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes

Cepas	Drogas $\mu\text{mol L}^{-1}$				
	PZA 1620 10%	INH 1,46 1%	EMB 7,21 1%	RFP 48,6 1%	SM 2,74 10%
3415	S	R	R	R	R
2050	S	R	S	S	S
258	S	R	S	S	S
3082	S	R	S	R	S
3375	S	S	S	S	S
3236	S	S	S	S	S
282	S	S	S	S	S
3236	S	S	S	S	S
536	S	S	S	S	S
909	S	S	S	S	S
544	S	S	S	S	S
452	S	S	S	S	S
3342	S	S	S	S	S
552	S	S	S	S	S
329	S	S	S	S	S
2277	S	S	S	S	S
3377	S	S	S	S	S
3251	S	S	S	S	S

Concentrações críticas: PZA 1620-Pirazinamida $1620 \mu\text{mol L}^{-1}$; INH 1,46-Isoniazida $1,46 \mu\text{mol L}^{-1}$; EMB- Etambutol $7,21 \mu\text{mol L}^{-1}$; RFP 48,6-Rifampicina $48,6 \mu\text{mol L}^{-1}$; SM 2,74- Estreptomicina $2,74 \mu\text{mol L}^{-1}$; R= Cepas Resistentes; S= Cepas Sensíveis; os números em % se referem à proporção crítica.

b). Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pela macrodiluição em tubos

Estas CIMs e CBMs, foram obtidas, através da macrodiluição em meio líquido de Middlebrook 7H9 (Difco). Nesta triagem utilizamos os compostos derivados de diarilpropenaminas e como padrão as drogas Rifampicina,

Isoniazida, Etambutol, Pirazinamida e Estreptomicina.

Nas Tabelas 8 e 9 estão apresentados os valores das CIMs e CBMs para os derivados de diarilpropenaminas frente as cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Ra, *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. malmoense*, *M. intracellulare* e cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes, as quais estão identificadas por números.

Tabela 8 - CIMs frente as cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. malmoense* e cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes (identificadas por números)

Cepas	Compostos $\mu\text{mol L}^{-1}$					
	5a	5aE	5aZ	5c	5cE	5cZ
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	20	10	20	17	34	17
<i>M. kansasii</i>	ND	20	5	17	17	17
<i>M. avium</i>	20	20	20	17	17	17
<i>M. malmoense</i>	20	20	40	ND	34	17
282	ND	20	80	68	17	17
3236	ND	20	40	68	17	34
3415	ND	20	80	68	17	4,2
2277	40	20	40	34	17	17
3377	40	20	20	17	34	34
2050	40	20	20	17	8,5	17
3251	20	20	10	8,5	8,5	8,5

5a e 5c - Compostos 5a e 5c; 5aE e 5aZ - Isômeros geométricos E e Z do composto 5a; 5cE e 5cZ - Isômeros geométricos E e Z do composto 5c; ND-Não determinado.

Nestes ensaios utilizamos os derivados 5a e 5c de diarilpropenaminas e seus respectivos isômeros geométricos E e Z. As CIMs variaram de 5 à 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e as CBMs de 20 à 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dentre todas as cepas utilizadas. Os valores representam a média de ensaios em duplicata. O derivado 5c e seus isômeros geométricos 5cE e 5cZ foram os mais efetivos sobre as cepas de

micobactérias o que pode estar relacionado ao caráter lipofílico que o átomo de bromo na posição *para* do anel fenila confere a molécula.

A comparação das CIMs e CBMs para o *M. tuberculosis* H₃₇Rv mostram que a concentração necessária para efeito bactericida é igual ou 2x a concentração bacteriostática. Com exceção do composto **5cZ**, para as cepas 282, 3236 e 3415 isoladas de pacientes, as CIMs e CBMs são iguais evidenciando o efeito bactericida dos derivados de diarilpropenaminas.

Tabela 9 - CBM frente as cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. malmoense* e cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes (identificadas por números)

Cepas	Compostos $\mu\text{mol L}^{-1}$					
	5a	5aE	5aZ	5c	5cE	5cZ
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	20	20	20	34	34	34
<i>M. kansasii</i>	ND	40	160	136	≥ 136	≥ 34
<i>M. avium</i>	160	≥ 160	160	68	≥ 136	≥ 136
<i>M. malmoense</i>	ND	≥ 160	≥ 80	136	≥ 68	34
282	ND	20	80	68	17	68
3236	ND	20	40	68	17	34
3415	ND	20	80	68	17	8,4
2277	40	80	80	68	136	136
3377	40	80	≥ 160	136	34	68
2050	40	40	80	136	34	68
3251	20	40	40	34	136	≥ 136

5a e **5c** - Compostos **5a** e **5c**; **5aE** e **5aZ** - Isômeros geométricos *E* e *Z* do composto **5a**; **5cE** e **5cZ** - Isômeros geométricos *E* e *Z* do composto **5c**; ND-Não determinado.

c). Concentração Inibitória Mínima pela microdiluição em placa

No início do estudo havíamos proposto somente o uso da técnica da macrodiluição em meio líquido de Middlebrook 7H9 para avaliarmos as CIMs,

mas durante a execução dos experimentos decidimos também determinar as CIMs através da dosagem em microplacas e revelação com o corante Alamar Blue - **Tabela 10** (Yajko e col., 1995; Collins e Franzblau, 1997). A utilização de duas técnicas diferentes com a mesma finalidade nos possibilitou a comparação dos resultados obtidos que apresentaram uma boa correlação. O corante Alamar Blue funciona como um indicador de crescimento ou viabilidade celular permitindo o monitoramento da proliferação celular (Ahmed e col., 1994). Em células de mamíferos, a redução do corante Alamar Blue depende da atividade de enzimas dehidrogenases não específicas, as quais estão envolvidas na cadeia respiratória das mitocôndrias (Fairlamb e Oppenheims, 1986). A forma oxidada de cor azul não fluorescente se torna rosa e fluorescente após a redução quando na presença de células.

A **Tabela 10** mostra que as CIMs obtidas pela microdiluição em placa para os derivados de diarilpropenaminas variaram de ≤ 5 a 80 e $\leq 4,2$ a 68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os compostos **5a** e **5c**, respectivamente. Os seus isômeros geométricos **5aE**, **5aZ**, **5cE** e **5cZ** apresentaram atividade antimicobacteriana semelhante àquela das misturas isoméricas. Para o composto **5i** as CIMs foram determinadas somente nas cepas padrões e variaram de 4,9 a 78,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Comparando as CIMs obtidas pela macrodiluição em tubos (**Tabela 8**) e microdiluição em placas (**Tabela 10**), podemos observar que os resultados são semelhantes, fato também relatado anteriormente por Collins e Franzblau (1997), em um estudo para “screening” de drogas.

Tabela 10 - CIM em $\mu\text{mol L}^{-1}$, frente as cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Ra, *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. kansasii* (Mk), *M. avium* (Ma), *M. malmoense* (Mm), *M. cellatum* (Mc), *M. intracellulare* (Mi) e cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes (identificadas por números)

Cepas	Compostos								
	5a	5aE	5aZ	5c	5cE	5cZ	5l	5i	21
H ₃₇ Ra	20	10	10	34	34	17	19,6	39	24
H ₃₇ Rv	10	10	10	8,5	8,5	4,2	9,8	4,9	≤ 6
Mk	20	40	20	34	34	34	19,6	39	97
Ma	40	40	40	34	34	34	19,6	39	97
Mm	80	80	40	17	34	34	78	39	97
Mc	40	40	20	17	34	34	78	4,9	48,6
Mi	40	80	40	68	68	68	78	78,6	97
3415	40	40	40	34	17	34	ND	ND	48,6
282	≤5	≤5	≤5	≤4,2	≤4,2	≤4,2	ND	ND	48,6
536	≤5	≤5	≤5	≤4,2	≤4,2	≤4,2	≤4,9	ND	ND
909	10	20	20	17	17	17	39	ND	ND
544	10	20	20	17	34	17	ND	ND	ND
452	≤5	≤5	≤5	≤4,2	≤4,2	≤4,2	ND	ND	ND
3342	ND	10	10	8,5	8,5	8,5	ND	ND	ND
552	10	20	20	17	17	17	39	ND	ND
258	≤5	≤5	≤5	≤4,2	8,5	8,5	19,6	ND	ND
329	20	20	40	17	17	17	ND	ND	ND
3082	ND	ND	ND	ND	ND	ND	≤4,9	ND	ND

5a, 5c, 5l, 5i e 20 - Compostos 5a; 5c, 5l, 5i e 21;

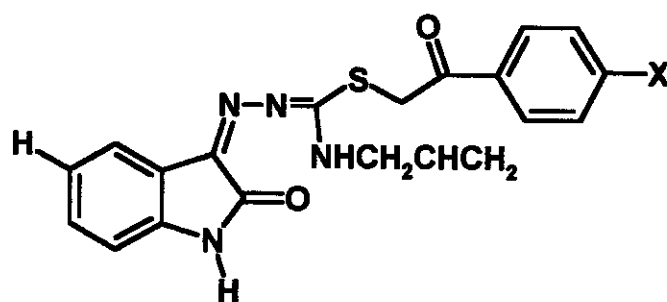
5aE e 5aZ - Isômeros geométricos E e Z do composto 5a;

5cE e 5cZ - Isômeros geométricos E e Z do composto 5c;

ND-Não determinado.

Utilizando a microdiluição em placa o composto 5l apresenta CIMs variando de ≤ 4,9 à 78 $\mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto o composto 21 tem CIMs de 6 à 97 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Provavelmente a presença do átomo de bromo na posição *para* do anel bifenila do composto 5l contribui para sua melhor efetividade. A literatura relata que as hidrazonoindolinonas (figura 8) são agentes com potente atividade anti-tuberculose. A hidrazonoindolona **a** é desprovida dessa

atividade, entretanto o composto **b** exibe 87% de inibição sobre a proliferação do *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Isto demonstra que outros compostos, além das diarilpropenaminas têm a atividade biológica exacerbada quando apresentam o bromo ligado a fenila. Provavelmente a eficácia destes compostos está relacionada ao efeito indutivo que o átomo de bromo exerce sobre a molécula e à lipofilicidade da cadeia alquílica (Karali e col., 1998). Ge e col. (1999) também relatam um estudo onde derivados da Vancomicina com cloro-bifenil na estrutura apresentam melhor atividade antibiótica em cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à Vancomicina. Estes dados salientam a importância do anel bifenila ligado à halogênio nos derivados de diarilpropenaminas para as atividades biológicas.



Hidrazonoindolonas

- a- X=H
b- X=Br

Figura 8 - Estrutura das hidrazonoindolonas

Dentre as cepas padrões o *M. tuberculosis* H₃₇Rv foi o mais susceptível a ação dos derivados de diarilpropenaminas com CIMs de 10, 8,5, 9,8, 4,9 e $\leq 6 \mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente para os derivados **5a**, **5c**, **5l**, **5i** e **21**. Quando comparamos as CIMs destes compostos para as cepas padrões com àquelas das cepas isoladas de pacientes observamos CIMs menores indicando maior susceptibilidade das cepas isoladas de pacientes. Além disso, as cepas de números 258, 3082 e 3415 são resistentes às drogas usadas na quimioterapia da

tuberculose e se mostraram susceptíveis a ação dos derivados de diarilpropenaminas, principalmente a de número 258.

Na Tabela 11 representamos as CIMs determinadas em nosso estudo para as drogas utilizadas na quimioterapia da tuberculose e na Tabela 12 os valores citados na literatura (Collins e Franzblau, 1997). Ao compararmos esses valores de CIMs constatamos certa concordância de resultados.

Ao compararmos os valores de CIMs obtidos para os derivados de diarilpropenaminas com aqueles obtidos para as drogas acima, nossos resultados são comparáveis aos apresentados pelo Etambutol e indicam potencial atividade antimicobacteriana dos derivados de diarilpropenaminas.

Tabela 11 - CIM de drogas utilizadas na quimioterapia da tuberculose para cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. tuberculosis* H₃₇Ra, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. malmoense* e *M. cellatum*

Cepas	CIM - $\mu\text{mol L}^{-1}$			
	Isoniazida	Rifampicina	Estreptomicina	Etambutol
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	$\leq 0,22$	$\leq 0,036$	$\leq 0,086$	14,4
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Ra	$\leq 0,22$	$\leq 0,036$	$\leq 0,086$	3,6
<i>M. avium</i>	$\geq 3,65$	0,3	0,69	$\geq 14,4$
<i>M. kansasii</i>	$\geq 3,65$	$\geq 0,6$	$\leq 1,37$	$> 14,4$
<i>M. malmoense</i>	$> 3,65$	$\geq 0,6$	$\leq 1,37$	$\geq 14,4$
<i>M. cellatum</i>	$> 3,65$	$\geq 0,6$	0,69	7,2

Tabela 12 - CIM de drogas utilizadas na quimioterapia da tuberculose para *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294

Cepas	CIM - $\mu\text{mol L}^{-1}$			
	Isoniazida	Rifampicina	Estreptomicina	Etambutol
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	$\leq 0,18-0,37$	$\leq 0,061-0,121$	$\leq 0,064-0,26$	3,39-6,78

As micobacterias infectam e se multiplicam em macrófagos e para uma droga ter ação anti-tuberculose é necessário sua penetração na célula. Neste estudo, *in vitro*, avaliamos as atividades das drogas em bacilos extracelulares que estão se multiplicando rapidamente. Portanto, é necessário a avaliação destas drogas em macrófagos infectados e a realização de estudo em animais experimentalmente infectados com micobactérias. Provavelmente a realização do estudo *in vivo* elucidará aspectos relacionados a efetividade dos derivados de diarilpropenaminas sobre micobactérias.

4.3.3) Citotoxicidade em Células Fibroblásticas

A avaliação da citotoxicidade dos compostos **5l**, **5i** e **21** foi realizada utilizando-se células fibroblásticas V79, provenientes de pulmão de hamster chinês. Visando obter informações sobre efeitos tóxicos específicos em diferentes organelas ou funções celulares, foram utilizadas três metodologias (DNA, VN e MTT) que avaliam diferentes alvos celulares.

As respectivas curvas dos gráficos (**figuras 9, 10 e 11**) representam a média dos valores obtidos em 9 replicatas para cada concentração de droga avaliada. Os valores de IC_{50} foram obtidos por interpolação de dados e estão expressos na **Tabela 13** para os ensaios de DNA, VN e MTT para os composto **5l**, **5i** e **21**.

A determinação do conteúdo total de DNA (DNA), cujo objetivo é avaliar a capacidade proliferativa das células (Knox e col., 1986), mostrou diferenças na toxicidade dos compostos. O composto **5l** foi o mais citotóxico com IC_{50} de $6,66 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o **5i** o menos citotóxico com IC_{50} de $25,51 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**Tabela 13**). O gráfico da **figura 9** mostra que nos compostos

testados o conteúdo de DNA diminui, à medida em que se aumenta a concentração dos compostos.

Tabela 13 - Citotoxicidade dos derivados de diarilpropenaminas

Compostos	IC ₅₀ - $\mu\text{mol L}^{-1}$		
	DNA	VN	MTT
5I	6,66	7,55	7,19
21	9,57	16,84	18,02
5i	25,51	28,97	28,03

DNA-Conteúdo de DNA, VN-Vermelho neutro, MTT-Sal de tetrazólio

IC₅₀ - Concentração que inibe 50% do crescimento celular

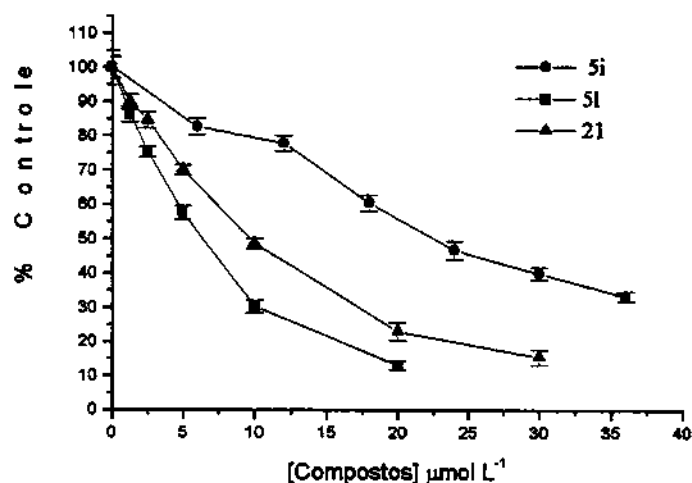


Figura 9 - Determinação do conteúdo total de DNA de células V79 expostas aos derivados de diarilpropenaminas (5I, 5i e 21).

Nos ensaios de avaliação da integridade dos lisossomas, onde foi medida a capacidade das células vivas de incorporar o corante VN, os compostos demonstraram o mesmo padrão de citotoxicidade apresentada para

DNA, sendo o composto **5l** o mais citotóxico com IC_{50} de $7,55 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 13).

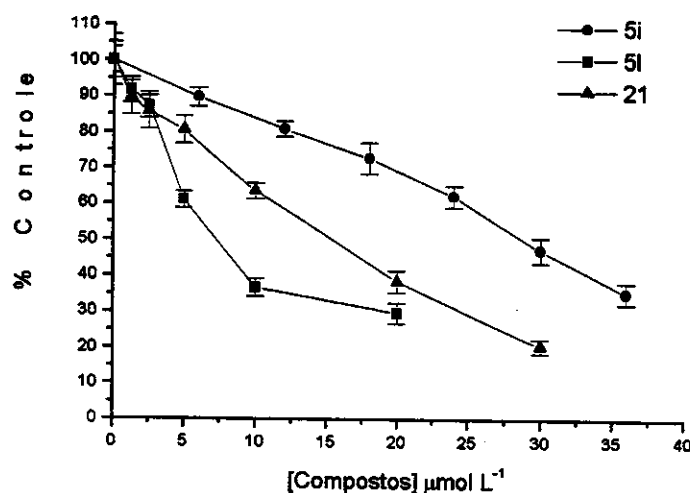


Figura 10 - Avaliação da integridade lisossomal (VN) de células V79 expostas aos derivados de diarilpropenaminas (**5l**, **5i** e **21**).

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

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

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

Existe a possibilidade de que os derivados de diarilpropenaminas por terem demonstrado toxicidade específica sobre os lisossomas e apresentarem um grupo amina e uma região hidrofóbica, possam também induzir a lipidose.

A redução do sal de tetrazólio MTT a formazan, um cristal azul solúvel em etanol, foi utilizada para avaliar o funcionamento correto das mitocôndrias, através da redução enzimática do MTT pela succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis (Denizot e Lang, 1986). A quantidade de formazan produzida é proporcional à quantidade de células, pois tal redução ocorre somente em células vivas ou não danificadas. Neste ensaio, o composto **51** também foi o mais citotóxico com IC_{50} de $7,19 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**Tabela 13 e figura 11**).

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

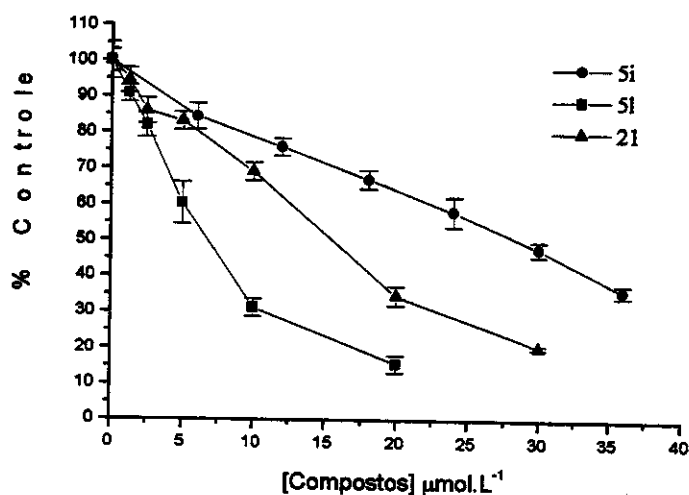


Figura 11 - Avaliação da integridade mitocondrial (MTT) de células V79 expostas aos derivados de diarilpropenaminas (5I, 5i e 21).

Na avaliação da citotoxicidade o composto 5I, mostrou-se o mais citotóxico evidenciando a importância do átomo de bromo que confere maior lipofilicidade à molécula, e consequentemente maior interação com as células.

5) Conclusões

1. Os derivados de diarilpropenaminas **5a** e **5c** foram sintetizados e caracterizados e os seus respectivos isômeros geométricos **5aE**, **5aZ**, **5cE**, **5cZ** foram isolados de acordo com metodologia previamente descrita (De Conti e col., 1996a; Oliveira e col., 1999).
2. Conforme a metodologia descrita neste trabalho obtivemos os compostos **5l**, **5i** e **21**, derivados de diarilpropenaminas, os quais foram purificados e caracterizados. Os compostos **5j** e **5e** embora não constituíssem objetivos do trabalho também foram sintetizados e utilizados como intermediários na síntese dos compostos **5l** e **5i**. O composto **5j** não foi purificado.
3. A atividade tripanossomicida e a citotoxicidade dos compostos **5l**, **5i** e **21** estão na mesma faixa daquelas previamente encontradas para os outros derivados.
4. Os compostos **5a**, **5aE**, **5aZ**, **5c**, **5cE**, **5cZ**, **5l**, **5i** e **21** apresentam atividade antimicobacteriana comparável à apresentada pelo Etambutol.
5. A comparação das atividades antimicobacteriana dos compostos **5l** e **21** evidencia a importância do átomo de bromo na posição *para* do anel bifenila para esta atividade.
6. As técnicas de RMN¹H e RMN¹³C permitiram a realização da atribuição dos hidrogênios e carbonos a seus respectivos deslocamentos químicos para o composto **5e**.

6) Referências Bibliográficas

- Ahmed, S.A.; Gogal, R.M., Jr.; Walsh, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to (³H)thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods*, 170:211-224. 1994.
- Alangaden, G.A.; Manavathu, E.K.; Vakulenko, S.B.; Zvonok, N.M.; Lerner, S.A. Characterization of fluorquinolone-resistant mutant strains of *Mycobacterium tuberculosis* selected in the laboratory and isolated from patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:1700-1703. 1995.
- Aliberti, J.C.S.; Machado, F.S.; Gazzinelli, R.T.; Teixeira, M.M.; Silva, J.S. Platelet-activating factor induces nitric synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infect. Immun.*, 67:2810-2814. 1999.
- Alvarez, S.Z. Hepatobiliary tuberculosis. *J. Gastroenterol. Hepatology*, 13:833-839. 1998.
- Andrade, A.L.S.; Zicher, F.; Oliveira, R.M. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, 348: 1407-1413. 1996.
- Andrade, Z.A.; Andrade, S.G.; Sadigursky, M. Wenthold Jr, R.J.; Hilbert, S.L.; Ferrans, V.J. The indeterminate phase of Chagas Disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 57:328-336. 1997.
- Anez, N.; Carrasco, H.; Parada, H.; Crisante, G.; Rojas, A.; Fuenmayor C.; Gonzalez, N.; Percoco, G.; Borges, R.; Guevara, P.; Ramirez, J.L. Myocardial parasite persistence in chronic Chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60:726-732. 1999.
- Apt, W.; Arribada, A.; Arab, F.; Ugarte, J.M.; Luksic, I.; Sole, C. Clinical trial of benznidazole and an immunopotential against Chagas' disease in Chile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80: 1010. 1986.
- Artico, M.; Mai, A.; Sbardella, G.; Massa, S.; Musiu, C.; Lostia, S.; Demontis, F.; La Colla, P. Nitroquinolones with broad-spectrum antimycobacterial activity *in vitro*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 9:1651-1656. 1999.
- Avila, J.L.; Polegre, M.A.; Robins, R.K. Biological action of pyrazolopyrimidine derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Studies *in vitro* and *in vivo*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86C:49-54. 1987.
- Bannister, B.A., N.T. Begg, S.H. Gillespie (eds). Tuberculosis and other mycobacterial diseases. Em: Infectious Disease, 1th ed. Blackwell Science Ltd. Cambridge, p. 342-366. 1996.
- Barret, P.A.; Beveridge, E.; Bull, D.; Caldwell I.C.; Islip, P.J.; Neal, R.A. e Woods, N. C. The efficacy of a novel compound, (E)-1-(4'bromo-4-biphenyl)-1-(4-chlorophenyl)-3-dimethylaminoprop-1-ene against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Experientia*, 38:338-339. 1982.

- Barry, C.E. New horizons in the treatment of tuberculosis. *Biochem. Pharmacol.*, **54**:1165-1172. 1997.
- Bates, J.H. Tuberculosis Chemotherapy. The need for new antituberculosis drugs is urgent. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**:942-943. 1995.
- Beach, D.H.; Goad, L.J.; Holz Jr. G.G. Effects of Ketoconazole on sterol biosynthesis by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**:851-856. 1986.
- Berkovitz, B.A.; Katzung, B.G. Avaliação básica e clínica dos novos medicamentos. Em: Farmacologia básica e clínica. Ed. B.G. Katzung, Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, p.46-52. 1994.
- Bestetti, R.B. Should benznidazole be used in chronic Chagas' disease. *Lancet*, **349**: 653. 1997.
- Blejer, J.L.; Saguier, M.C.; Dinapoli, R.A.; Salamone, H.J. Prevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in blood donors. *Medicina-Buenos Aires*, **59**:129-132. 1999.
- Bloch, A.B.; Cauthen, G.M.; Onorato, I.M.; Kenneth, G.; Dansbury, G., Kelly, G.D.; Driver, C.R.; Snider, D.E.; Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United States. *J. Am. Med. Assoc.*, **271**:665-671. 1994.
- Bocchi, E.A.; Higuchi, M.D.; Vieira, L.C.; Stolf N.; Bellotti G.; Fiorelli A.; Uip D.; Jatene A.; Pileggi Fiorelli, A. Higher incidence of malignant neoplasms after heart transplantation for treatment of chronic Chagas' heart disease. *J. Heart Lung Transpl.*, **17**:399-405. 1998.
- Bogdan, C.; Rollinghoff, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today*, **15**:22-28. 1999.
- Bonato, V.L.D.; Lima, V.M.F.; Tascon, R.E.; Lowrie, D.B.; Silva, C.L. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect. Immun.*, **66**:169-175. 1998.
- Bond, C.S.; Zhang, Y.H.; Berriman, M.; Cunningham, M.L.; Fairlamb, A.H.; Hunter, W.N. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovered of new natural inhibitors. *Struct. Folding Design*, **7**:81-89. 1999.
- Borenfreund, E.; Puerner, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/VN 90). *J. Tiss. Cult. Meth.*, **9**:7-9. 1984.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2ª. Ed. p. 75-79. 1994.
- Brasil. Ministério da Saúde. Plano Nacional de Controle da Tuberculose. Fundação Nacional de Saúde. p. 1-25. 1999.
- Brener, Z.; Cançado, J.R.; Galvão, L.M.; da Luz, Z.M.P.; Filardi, L.D.S.; Pereira, M.E. S.; Santos, L.M.T.; Cançado. C.B. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **88**:149-153. 1993.
- Brennan, P.J. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infect. Dis.*, **11**:S420-S-430. 1989.

- Brock, D. T.; Madigan, M. T.; Martinko, J. M. *Biology of Microorganisms*. 7^a ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. p. 532-533 e 809-811. 1994.
- Bronia, D.H.; Pereira, B.M.I.; Lujan, H.D.; Fretes, R.E.; Fernandez, A.; Paglini, P.A. Ganglioside treatment of acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice promotes long-term survival and parasitological cure. *An. Tropical Med. Parasitol.*, 93:341-350. 1999.
- Burnett, G.W.; Scherp, H.W.; Schuster, G.S. *Micobactérias e Tuberculose*. Em: *Microbiologia oral e Doenças infecciosas*. 4^a edição. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. p. 455-472. 1978.
- Burns, D.N.; Gellert, G.A.; Crone, R.K.; Tuberculosis in eastern Europe and the former Soviet Union: how concerned should we be? *Lancet*, 343:1445-1446. 1994.
- Butler, W.R., Kilburn, J.O. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide and its relationship to pyrazinamidase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 24:600-601. 1983.
- Cançado, J. R. Tratamento específico. Em: *Cardiopatia Chagásica*. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, p. 327-355. 1985.
- Canetti, G., Rist, N., Grosset, J. Primary drug resistance in tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 90:792-799. 1964.
- Canetti, G.; Rist, N.; Grosset, J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Rev. Tuberc. Pneumol.*, 27:217-72. 1963.
- Cantrell, C.L.; Fischer, N.H.; Urbatsch, L.; McGuire, M.S.; Franzblau, S.G. Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central, and North America. *Phytomedicine*, 5:137-145. 1998.
- Cazzulo, J.J.; Stoka, V.; Turk, V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Chem.*, 378:1-10. 1997.
- Centers for Diseases Control. Primary multi-drug-resistant tuberculosis - Ivanovo Oblast, Russia. *Morb. Mortal Weekly Rep.*, 48:661-663. 1999.
- Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo "Prof. Alexandre Vranjac". 1998.
- Cingi, M.R.; De Angelis, I.; Fortunati, E.; Reggiani, D.; Bianchi, V.; Tiozzo, R.; Zucco, F. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. *Toxicol. In Vitro*, 5:119-125. 1991.
- Cohn, D.C. Treatment of multi-drug-resistant tuberculosis. *J. Hosp. Infect.*, 30 (Suppl.):322-328. 1995.
- Collins, L.A.; Franzblau, S.G. Microplate Alamar Blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41: 1004-1009. 1997.
- Croft, S.L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94:215-220. 1999.
- Crovato, F.; Rebora, A. Chagas disease: a potential plague for Europe. *Dermatol.*, 195:184-185. 1997.

- Daffe, M.; Brennan, P.J.; MacNeil, M. Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by ^1H and ^{13}C NMR analyses. *J. Biol. Chem.*, **265**:6734-6743. 1990.
- David, H.L. Basis for lack of drug susceptibility of atypical mycobacteria. *Rev. Infect. Dis.*, **3**:878-884. 1981.
- De Castro, S.; Meirelles, M.N.L. Effect of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cells in vitro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**:209-215. 1987.
- De Castro, S.L. The challenge of Chagas disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, **53**:83-98. 1993.
- De Castro, S.L.; Pinto, M.C.F.R.; Pinto, A.V. Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*. 1. Establishing a structure/activity relationship. *Microbios*, **78**:83-90. 1994.
- De Cock, K.M.; Chaisson, R.E. Will DOTS do it? A reappraisal of tuberculosis control in countries with high rates of HIV infection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **3**:457-465. 1999.
- De Conti, R. Síntese, toxicidade e atividade tripanocida de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-X-fenil)-N,N-dimetil-2-propeno-1-amina. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Unicamp. 1996.
- De Conti, R.; Gimenez, S.M.N.; Haun, M.; Pilli, R.A.; De Castro, S.L.; Durán N. Synthesis and biological activities of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **31**:1-4. 1996a.
- De Conti, R.; Oliveira, D.A.; Fernandez, A.M.A.P.; Melo, P.S.; Rodrigues, J.A.; Haun, M.; De Castro, S.L.; Souza-Brito, A.R.M.; Durán, N. Application of a multi-endpoint cytotoxicity assay to the trypanocidal compounds 2-propen-1-amine derivative and determination of their acute toxicity. *In Vitro Mol. Toxicol.*, **11**:153-160. 1998.
- De Conti, R.; Santa Rita, R.M.; De Souza, E.M.; Melo, P.S.; M.N.; Haun, M.; De Castro, S.L.; Durán, N. *In vitro* trypanocidal activities of a novel series of N, N-dimethyl-2-propen-1-amine derivative. *Microbios*, **85**:83-87. 1996b.
- De Craecker, S.; Verbruggen, C.; Rajan, P.K.; Smith, K.; Haemers, A.; Fairlamb, A.H. Characterization of the peptide substrate specificity of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **84**:25-32. 1997.
- De Souza, A.O.; Aily, D.C.G.; Sato, D.N.; Durán, N. Atividade da Violaceína *in vitro* sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **58**:59-62. 1999.
- De Toranzo, E.G.D.; Herrera, D.M.; Castro, J.A. Rat liver nuclear nifurtimox nitroreductase activity. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **98**:249-254. 1997.
- Denizot, F.; Lang, R. Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival. Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reability. *J. Immun. Methods*, **89**:271-277. 1986.

- DeRiemer, K.; Rudoy, I.; Schecter, G.F.; Hopewell, P.C.; Daley, C.L. The epidemiology of tuberculosis diagnosed after death in San Francisco, 1986-1995. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 3:488-493. 1999.
- Di Pentima, M.C.; Hwang, L.Y.; Skeeter, C.M.; Edwards, M.S. Prevalence of antibody to *Trypanosoma cruzi* in pregnant Hispanic women in Houston. *Clin. Infec. Dis.*, 28:1281-1285. 1999.
- Dias, J.C.P. Doença de Chagas. *JBM*, 56:58-82. 1989.
- Dias, J.C.P.; Present situation and future of human chagas disease in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (suppl.), 92: 13. 1997.
- Didoli, G.; Revelli, S.; Davila, H.; Ferro, M.E.; Romero-Piffiguer, M.; Botasso, O. Administration of interferon-g to pregnant rats reverses the depressed adjuvant-induced arthrits of their chronically *Trypanosoma cruzi*-infected offspring. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32:753-760. 1999.
- Dobos, K.M.; Quinn, F.D.; Ashford, D.A.; Horsburgh, C.R.; King, C.H. Emergence of a unique group of necrotizing mycobacterial diseases. *Emerging Infectious Dis.*, 5:367-378. 1999.
- DoCampo R.; Schmuñis, G.A. Sterol Biosynthesis inhibitors: Potential chemotherapeutics against Chagas Disease. *Parasitol. Today*, 13:129-130. 1997.
- Dolin, P.J.; M.C. Raviglione; A. Kochi. Global tuberculosis incidence and mortality during 1900-2000. *Bull. W.H.O.*, 72:213-220, 1994.
- Domagala, J.M. Structure-activity and structure-side-effect relationships for quinolone antibacterials. *J. Antimicrob. Chemother.*, 33:685-706. 1994.
- Duncan, K. Prospects for new anti-tuberculosis drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49 (Suppl.1):21-23. 1997.
- Durán, N.; Campos, V.; Riveros, R.; Joyas, A.; Pereira, M.F.; Haun, M. Bacterial Chemistry-III: preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 61:31-36. 1989.
- Duval, P.; Levenes, H.; Boulahbal, F. The prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in New Caledonia, 1995-1996. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 3:219-223. 1999.
- Ericsson, H.M.; Sheris, J.C. Antibiotic sensitivity testing: report for an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, (B) (Suppl.) 217:3-90. 1971.
- Fairlamb, A.H. Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84:613-617. 1990.
- Fairlamb, A.H.; Oppendoes, F.R. Carbohydrate metabolism in African trypanosomes with special reference to the glycosome in cultured cells. Plenum Press, New York, p. 183-224. 1986.
- Ferreira, H.O. Tratamento específico na fase aguda da doença de Chagas. *J. Pediatria*, 64:126-128. 1988.
- Filardi, L. S.; Brener, Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 76:293-297. 1982.

- Flament-Saillour, M.; Robert, J.; Jarlier, V.; Grosset, J. Outcome of Multi-drug-resistant tuberculosis in France. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **160**:587-593. 1999.
- Forbes, M., Kuck, N.A. Peets, E.A. Effect of ethambutol on nucleic acid metabolism in *Mycobacterium smegmatis* and its reversal by polyamines and divalent cations. *J. Bacteriol.*, **89**:1299-1305. 1965.
- Freshney, R.I. Measurement of viability and citotoxicity. Em: Culture of animal cells. Ed. R.I. Freshney, John Wiley Sons, Inc., New-York, p.287-307. 1994.
- Fry, J.R. Hammond, A.H.; Dhanjal, P.; Wilkinson, D.J. Toxicity testing with hepatocytes: some methodological aspects. *Atla*, **23**:91-96. 1995.
- Gallerano, R.H.; Marr, J.J.; Sosa, R.R. Therapeutic efficacy of Allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **43**:159-166. 1990.
- Ge, M.; Chen, Z.; Onishi, R.H.; Kohler, J.; Silver, L.L.; Kerns, R.; Fukuzawa, S.; Thompson, C.; Kahne, D. Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-ala-D-ala. *Science*, **284**:507-511. 1999.
- Girling, D.J. Hepatic toxicity of antituberculosis regimes containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. *Tubercle*, **59**: 13-32. 1978.
- Gorla, N.B.; Ledesma, O.S.; Barbieri, G. and Larripa, I.B. Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Res.*, **224**:263-267. 1989.
- Grange, J.M. Immunotherapy: a new strategy for tuberculosis control? *Resp. Med.*, **91**:1-4. 1997.
- Grange, J.M. The mystery of the mycobacterial 'persistor'. *Tubercle Lung Dis.*, **73**:249-251. 1992.
- Grosset, J. Current problems with tuberculosis treatment. *Res. Microbiol.*, **147**:10-16. 1996.
- Grosset, J.H. Present status of chemotherapy for tuberculosis. *Rev. Infect. Dis.*, **11**:S347-S352. 1989.
- Gurumurthy, P.; Ramachandran, G.; Vijayalaksmi, S.; Kumar, A.K.H.; Venkatesan, P.; Chandrasekaran, V.; Vjayasekaran, V.; Kumaraswami, V.; Prabhakar, R. Bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in a triple drug formulation: comparison of plasma and urine kinetics. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **3**:119-125. 1999.
- Gutteridge, W.E. New anti-protozoal agents. *Int. J. Parasitol.*, **17**: 121-129. 1987.
- Hagar, J. M.; Rahimtoola, S. H. Chagas' heart disease in the United States. *N. Engl. J. Med.*, **325**: 763-768. 1991.
- Hammadi, A.; Ménez, A.; Genet, R. E/Z-Configuration assignment of N-acetyl- α,β -Dehydrotryptophan ethyl ester produced by L-tryptophan 2',3'-Oxidase from *Chromobacterium violaceum*. *Tetrahedron Lett.*, **37**:3309-3312. 1996.
- Hart, C.A; Beeching, N.J.; Duerden, B.I. Tuberculosis into the next century. *J. Med. Microbiol.*, **44**:1-34. 1996.
- Heifets, L.B. Bacteriostatic and bactericidal activity of ciprofloxacin and ofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. *Tubercle* **68**:267-276. 1987.

- Heifets, L.B. Susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40:1759-1767. 1996.
- Hein, L.; Lüllmann-Rauch, R.; Mohr, K. Human Accumulation Potential of Xenobiotics: Potential of Catamphiphilic Drugs to Promote Their Accumulation Via Inducing Lipidosis or Mucopolysaccharidosis. *Xenobiotica*, 20:1259-1267. 1990.
- Hendrickson, D.A. Reagents and stains. Em: Manual of Clinical Microbiology 4th ed. Eds. Lenette, E.H., Balows, A., Hansler Jr, W.J.; Shadomy, H.J., Washington D.C. p.1093-1107. 1985.
- Heym, B., Cole, S.T. Multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 8:61-70. 1997.
- Horsburgh, C.R., Jr., Chin, D.P., Yajko, D.M. Environmental risk factors for acquisition of *Mycobacterium avium* complex in persons with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, 170:362-367. 1994.
- Horsburgh, C.R.Jr. Havlik, J.A., Ellis, D.A. Survival of AIDS patients with disseminated *Mycobacterium avium* complex infection with and without antimycobacterial chemotherapy. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144:557-559. 1991.
- Horsburgh, C.R.Jr. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. engl. J. Med.*, 324:1332. 1991.
- Ignatious, F.; Ward, W. J. Lenz, R. W.; Kantor, S. W. Synthesis of polyesters containing an aromatic triad mesogen. *Polymer*, 36: 2819-1825. 1995.
- Inderlied, C. B. Antimycobacterial agents: *in vitro* susceptibility testing, spectrums of activity, mechanisms of action and resistance and assays for activity in biological fluids. Em: Antibiotics in laboratory medicine. Ed. Lorian V. New York. Williams and Wilkins. p. 134-197. 1991.
- Iseman, M.D. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, 329:784-791. 1993.
- Jagannath, C.; Venkata, R. M.; Kailasam, S.; o'Sullivan, J. F.; Gangadharam, P. R. J.; Chemotherapeutic activity of clofazimine and its analogues against *Mycobacterium tuberculosis in vitro*, intracellular, and *in vivo* studies. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 151: 1083-1086. 1995.
- Karali, N.; Terzioglu, N.; GURSOY, a. Synthesis and structure-activity relationships of 3-Hydrazono-1H-2-indolinones with antituberculosis activity. *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, 48:758-763. 1998.
- Kierszenbaum, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12:210-218. 1999.
- Kilburn, J.O., Greenberg, J. Effect of ethambutol on the viable cell count in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11:534-540. 1977.
- Klopman, G., Fercu, D., Li, J.Y., Rosenkranz, H.S., Jacobs, M.R. Antimycobacterial quinolones: a comparative analysis of structure-activity and structure-cytotoxicity relationships. *J. Antimicrob. Chemother.*, 35:86-96. 1995.
- Knox, K.; Uphill, P.F.; Fry, J.R.; Benford, J. e Balls, M. The frame multicentre project on *in vitro* cytotoxicology. *Food. Chem. Toxic.*, 24:457-463. 1986.
- Kocagoz, T.; Hackbarth, C.J.; Unsal, I.; Rosenberg, E.; Nikaido, H.; Chambers, H.F. Gyrase mutations in laboratory-selected fluoroquinolone-resistant mutants of

- Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**:1768-1774. 1996.
- Lalancette, J.M.; Brindle, J.R. Reductions with sulfurated borohydrides. VI. The reduction of nitro, nitrile, amide, and nitroso groups. *Can. J. Chem.*, **49**:2990-2995. 1971.
- Ledesma, O. Tratamento de infeccion chagásica aguda. *Rev. Fed. Arg. Cardiol.*, **17**: 232-233. 1988.
- Leiby, D.A.; Fucci, M.H.; Stumpf, R.J. *Trypanosoma cruzi* in a low- to moderate-risk blood donor population: seroprevalence and possible congenital transmission. *Transfusion*, **39**:310-315. 1999.
- Leysen, D.C.; Haemers, A.; Pattyn, S.A. Mycobacteria and the new quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**:1-5. 1989.
- Lowrie, D.B.; Silva, C.L.; Tascon, R.E. Progress towards a new tuberculosis vaccine. *Biodrugs*, **10**:201-213. 1998.
- Lowrie, D.B.; Tascon, R.E.; Bonato, V.L.D.; Lima, V.M.F.; Faccioli, L.H.; Stavropoulos, E.; Colston, M.J.; Hewinson, R.G.; Moelling, K.; Silva, C.L. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* **400**:269-271. 1999.
- Lüllmann, H.; Lüllmann-Rauch, R.; Wassermann, O. Lipidosis Induced by Amphiphilic Cationic Drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **27**:501-510. 1978.
- Mahmoudi A.; Iseman, M.D. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis: common errors and their association with the acquisition of drug resistance. *JAMA*, **270**:65-68. 1993.
- Mahood, S. A.; Schaffner, P.V.L. 2,4-Diaminotoluene. *Organic Syntheses* **2**:160-162. 1948.
- Maldonado, R.A.; Molina, J.; Payares, G.; Urbina, J.A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas disease. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **37**:1353-1359. 1993.
- Mata, P. "Design" racional de fármacos. *Boletim Soc. Portuguesa de Química*, p. 1-13, 02/1997.
- Mathias, L.J.; Moore, D.R.; Smith, C.A. Polymerization of N-(p-aminobenzoyl)caprolactam: Block and Alternating Copolymers of Aromatic and Aliphatic Polyamides. *J. Polymer Sci., Part A: Polymer Chem.*, **25**:2699-2709. 1987.
- Mayaud, C.; Cadranel, J. Tuberculosis in AIDS: past or new problems? *Thorax*, **54**:567-571. 1999.
- McCabe, R.E. Failure of Ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. *J. Infec. Dis.*, **158**: 1408-1409. 1988.
- McCabe, R.E.; Remington, J.S.; Araujo, F.G.; Ketoconazole promotes parasitological cures of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**: 613-615. 1987.
- McCabe, R.E.; Remington, J.S.; Araújo, J.S. Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection of mice against lethal infection with the organism. *J. Infec. Dis.*, **150**: 594-601. 1984.

- McCutcheon, A.R.; Stokes, R.W.; Thorson, L.M.; Ellis, S.M.; Hancock, R.E.W.; Towers, G.H.N. Anti-mycobacterial screening of British Columbian medicinal plants. *Int. J. Pharmacog.*, **35**:77-83. 1997.
- Mckenna, M.T.; Mcgray, E.; Onorato, J. The epidemiology of tuberculosis among foreign-born persons in the United States, 1986 to 1993. *N. Eng. J. Med.*, **332**:1071-1076. 1995.
- Melo, P.S. Pigmentos Obtidos de *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens*, Propriedade Tripanocida da Prodigiosina e Estudos Toxicológicos. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia. Unicamp. 1996.
- Moreira, A.A.A.; DeSouza, H.B.W.T.; Amato Neto, V.; Matsubara, L.; Pinto, P.L.S.; Tolezano, J.E.; Nunes, E.V.; Okumura, M. Avaliação da atividade terapêutica do itraconazol nas infecções crônicas, experimental e humana, pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. P.*, **34**:177-180. 1992.
- Mosmann, T. Rapid colorimetry assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**:55-63. 1983.
- Nagel, R. Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. *Mutation Res.*, **191**: 17-20. 1987.
- Neal, R.A.; Bueren, J.V. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **82**: 709-714. 1988.
- Neves P.D. *Trypanosoma cruzi*. Em: *Parasitologia Humana*, 7ª edição, Livraria Atheneu, São Paulo, p. 59-90. 1988.
- Nightingale, S.D.; Byrd, L.T.; Southern, P.M.; Jockusch, J.D. Cal, S.X., Wynne, B.A. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Infect. Dis.*, **165**:1082-1085. 1992.
- Nikaido, H.; Jarlier, V. Permeability of mycobacterial cell wall. *Res. Microbiol.*, **142**:437-443. 1991.
- Oh, Y-K.; Nix, D.E.; Straubiner, R.M. Formulation and efficacy of liposome-encapsulated antibiotics for therapy of intracellular *Mycobacterium avium* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**:2104-2111. 1995.
- Oliveira, D.A.; Fernandes, A.M.P.A.; De Conti, R.; Rodriguez, J.A.; Haun, M.; De Castro, S.L.; Souza-Brito, A.R.M.; Durán, N. Evaluation of in vitro toxicity of isomer of N,N-dimethyl-2-propen-1-amines. *Pharmazie*, No prelo. 1999.
- Pereira, D.G. Antichagásicos 3-(4'-Bromo-[1,1'-bifenila]-4-il)-3-(4-X-fenila)-N,N-dimetil-2-propen-1-amina: aspectos toxicológicos e farmacológicos in vivo. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Unicamp. 1999.
- Pereira, D.G.; De Castro, S.L.; Durán, N. Activity of N,N-dimethyl-1-2-propen-1-amine derivatives in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, **69**:205-211. 1998.
- Raether, A.; Seidenath, H. Ketoconazole and other potent antimycotic azoles exhibit pronounced activity against *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium berghei* and *Entamoeba histolytica* in vivo. *Z. Parasitenkunde*, **70**: 135-138. 1984.
- Rassi, A. Tratamento etiológico da doença de Chagas. *Arq. Bras. Cardiol.*, **38**: 277-281. 1982.

- Rastogi, N.; Goh, K.S. *In vitro* activity of the new difluorinated quinolone sparfloxacin (AT-4140) against *Mycobacterium tuberculosis* compared with activities of ofloxacin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**:1933-1936. 1991.
- Ratnakar, P.; Rao, S.P. Srirama Rao, S.P., Srirama Rao, P., Murthy, P.S. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, **10**:39-43. 1995.
- Raynaud, C.; Laneelle, M.A.; Senaratne, R.H.; Draper, P.; Laneelle, G.; Daffe, M. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology-UK*, **145**:1359-1367. 1999.
- Renzi, D.; Valtolina, M.; Foster, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *Atla*, **21**:89-96. 1993.
- Repetto, G.; Sanz, P. Vermelho neutro uptake. Cellular growth and lysosomal function: *in vitro* effects of 24 metals. *Atla*, **21**:501-507. 1993.
- Riddell, R.J.; Clothier, R.H.; Balls, M. An evaluation of *in vitro* cytotoxicity assays. *Food. Chem. Toxic.*, **24**:469-471. 1986.
- Riley, L.W. Drug-resistant tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, **17** (suppl. 2):S442-S446. 1993.
- Scheifele, H.J.; DeTar, D.F. 2-aminobenzophenone. *Organic Syntheses* **4**:34-38. 1967.
- Schmunis, G.A.; Zicker, F.; Moncayo, A. Interruption of Chagas disease transmission through vector elimination. *Lancet*, **348**:1171. 1997.
- Seibert, H.; Balls, M.; Fentem, J.; Bianchi, V.; Clothier, R.H.; Dierckx, P.J.; Ekwall, B.; Garle, M.J.; Gómez-Lechón, M.J.; Gribaldo, L.; Gulden, M.; Liebsch, M.; Rasmussen, E.; Roguet, R.; Shrivastava, R.; Walum, E. Acute toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. *Atla*, **24**:499-510. 1996.
- Seibert, H.; Gulden, M.; Voss, J.U. Comparative cell toxicology. The basis for *in vitro* toxicity testing. *Atla*, **22**:168-174. 1994.
- Sepkowitz, K.A.; Raffalli, J.; Riley, L.; Kiehn, T.E. Armstrong, D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin. Microbiol Rev.*, **8**:180-199. 1995.
- Sergievskaya, S.I.E., Chemerisskaya, A.A. Dealkylation of B-(2-alkoxy-1-naphthoyl) propionic acids and oxidation of B-(2-ethoxy-1-naphthoyl) propionic acid. *J. Gen. Chem. (URSS)*, **20**, 2284. 1950.
- Shawar, R.M.; Humble, D.J.; Dalfsen, J.M.V.; Stover, C.K.; Hickey, M.J.; Steele, S.; Mitscher, L.A.; Baker, W. Rapid Screening of Natural Products for Antimycobacterial Activity by Using Luciferase-Expressing Strains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**:570-574. 1997.
- Shirmer, H.R.; Muller, J.G.; Krauth-Siegel, L. Dissulfide-Reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: The design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**:141-154. 1995.

- Silva, C.L.; Bonato, V.L.D.; Lima, V.M.F. DNA encoding individual mycobacterial antigens protects mice against tuberculosis. *Braz. J. Medical Biol. Res.*, **32**:231-234. 1999.
- Siqueira-Batista, R.; Storino, R.A.; Vaitsman Chiga, A. L.; Quintas, L.E.M.e Filho, N. M. Enfermidade de Chagas. Aspectos Políticos e Sociais. *ARS CVRANDI - Rev. Clin Med.*, **26**:15-86. 1993.
- Snider, D.E.; Rooper, W.L. The new tuberculosis. *N. Eng. J. Med.*, **326**:703-705. 1992.
- Souza, D.H.F.; Garratt, R.C.; Araújo, A.P.U.; Guimarães, B.G.; Jesus, W.D.P.; Michels, P.A.M.; Hannaert, V.; Oliva, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. *Febs Lett.*, **424**:131-135. 1998.
- Souza, S. C.; Takahashi, C. S.; Da Silva, J. S. Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drug Rochagan in healthy and chagasic rodents. *Mutation Res.*, **259**: 139-145. 1991.
- Stark, D.M.; Shopsis, C.; Borefreund, E.; Babich, H. Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. *Fd. Chem. Toxic.*, **24**:449-455. 1986.
- Suzuki, A.E.; Inamime, J.M. Genetic aspects of drug resistance in *Mycobacterium avium*. *Res. Microbiol.*, **145**:210-213. 1994.
- Sztajzel, J.; Cox, J.; Pache, J.C.; Badaoui, E.; Lerch, R.; Rutishauser, W. Chagas disease may also be encountered in Europe. *Eur. Heart J.*, **17**:1289-1291. 1996.
- Takayama, K.; Kilburn, J.O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**:1493-1499. 1989.
- Tarleton, R.L.; Zhang, L. Chagas disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol. Today*, **15**:94-99. 1999.
- Teixeira, A.R.L.; Silva, R.; Cunha Neto, E.; Santana, J.M.; Rizzo, L.V.; Malignant, non-Hodgkins lymphomas in *Trypanosoma cruzi* infected rabbits treated with notroarenes. *J. Comp. Pathol.*, **103**:37-48. 1990.
- Tsakamura, M.; Nakamura, E.; Yoshi, S.; Amano, H. Therapeutic effect of a new antibacterial substance, Ofloxacin (DL 8280) on pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **131**:352-356. 1985.
- Turrens, J.F.; Newton, C.L.; Zhong, L.; Hernandez, F.R.; Whitfield, J. Docampo, R. Mercaptopyridine N-oxide, an NADH-fumarate reductase inhibitor, blocks *Trypanosoma cruzi* growth in culture and in infected myoblasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, **175**:217-221. 1999.
- Urbina, J.A. Chemotherapy of chagas' disease and leishmaniasis: the last 25 years. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, (suppl.) **93**:80. 1998.
- Urbina, J.A.; Lazard, K. Aguirre, T.; Piras, M.M.; Piras, R. Antiproliferative effects and mechanism of action of ICI 195,739, a novel bis-triazole derivative, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**: 730-735. 1991.

- Urbina, J.A.; Payares, G.; Molina, J.; Sanoja, C.; Liendo, A.; Lazard, K.; Piras, M.M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P.; Ryley, J.F. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science*, **273**:969-971. 1996b.
- Urbina, J.A.; Vivas, J.; Lazard, K.; Molina, J.; Payares, G.; Piras, M.M.; Piras, R. Antiproliferative Effects of $\Delta^{24(25)}$ Sterol Methyl Transferase Inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* Studies. *Chemotherapy*, **42**:294-307. 1996a.
- Urbina, J.A.; Vivas, J.; Visbal, G.; Contreras, L.M. Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by $\Delta^{24,25}$ sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **73**:199-210. 1995.
- Viotti, R.; Vigliano, C.; Armenti, H.; Segura, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am. Heart. J.*, **127**:151-162. 1994.
- Wayne, L.G. Dynamics of submerged growth of *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and microaerophilic conditions. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **114**:807-811. 1976.
- Wayne, L.G., Lin, K-Y. Glyoxylate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infect. Immun.*, **37**:1042-1049. 1982.
- Wentland, M.P.; Leshner, G.Y.; Reuman, M.; Gruett, M.D.; Singh, B.; Aldous, S.C. Mammalian topoisomerase II inhibitory activity of 1-cyclopropyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-7-(2,6-dimethyl-4-pyridinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid and related derivatives. *J. Med. Chem.*, **36**:2801-2809. 1993.
- Williams, D.L.; Waguespack, C.; Eisenach, K.; Crawford, J.T.; Portaels, F.; Salfinger, M.; Nolan, C.M.; Abe, C.; Sticht-Groh, V.; Gillis, T.P. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**:2380-2386. 1994.
- Witzig, R.S., Franzblau, S.G. Susceptibility of *Mycobacterium kansasii* to ofloxacin, sparfloxacin, clarithromycin, azithromycin, and fusidic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**:1997-1999. 1993.
- World Health Organization. The World Health Report. Life in the 21st century. A vision for all. Geneva. p. 92-93. 1998.
- Yajko, D.M.; Madej, J.J.; Lancaster, M.V.; Sanders, C.A.; Cawthon, V.L.; Gee, B.; Babst, A.; Hadley, W.K. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **33**:2324-2327. 1995.
- Yew, W.W.; Chau, C.H. Drug-resistant tuberculosis in the 1990s. *Eur. Resp. J.*, **8**:1184-1192. 1996.
- Zhang, J.; Heym, H.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. The catalase-peroxidase gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358**: 591. 1992.

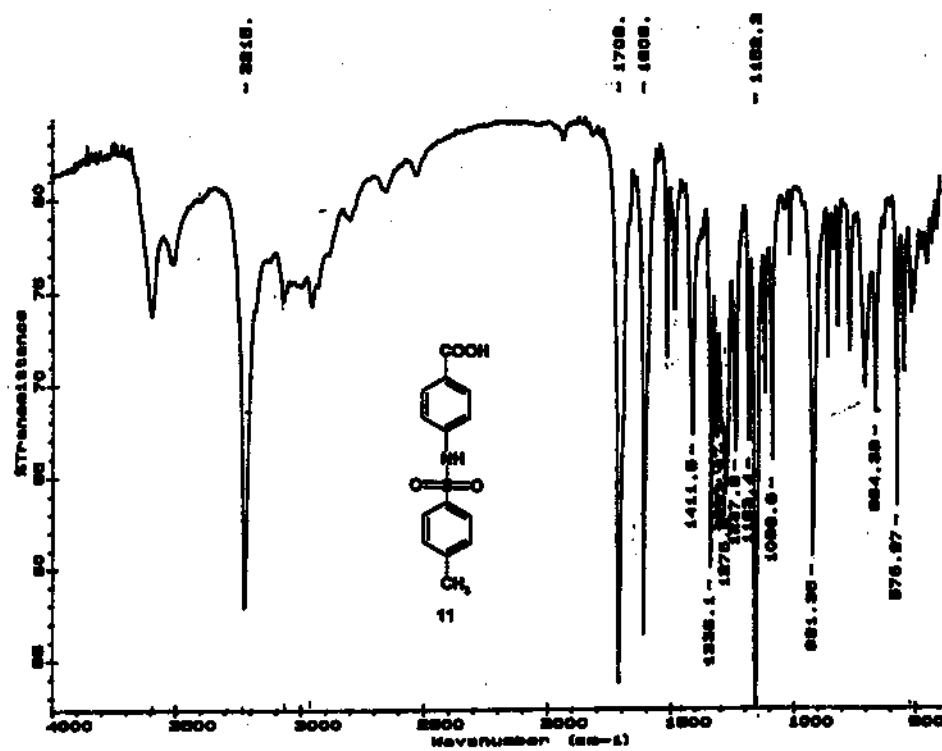


Figura 12 – Espectroscopia no IV do composto 11 (KBr cm^{-1}).

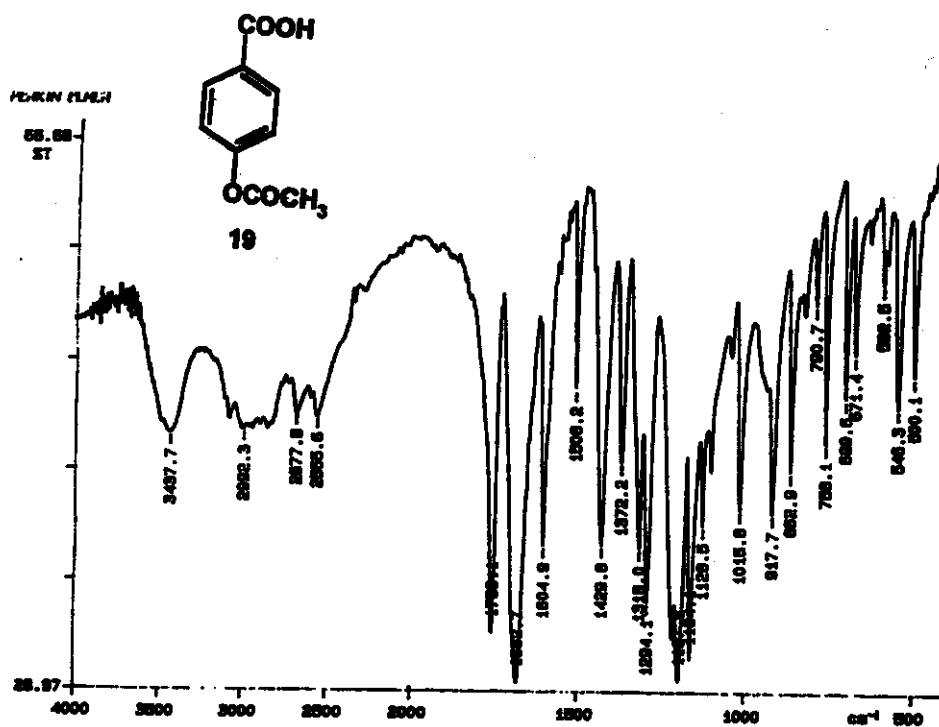


Figura 13 – Espectroscopia no IV do composto 19 (KBr cm⁻¹).

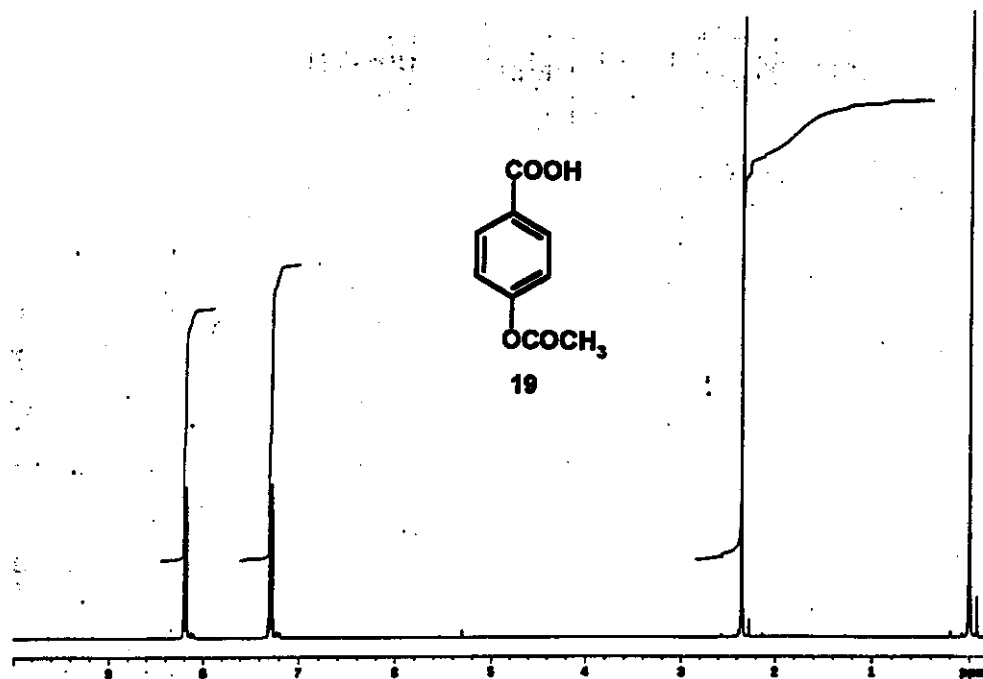


Figura 14 – Espectro de RMN¹H do composto 19 (300 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

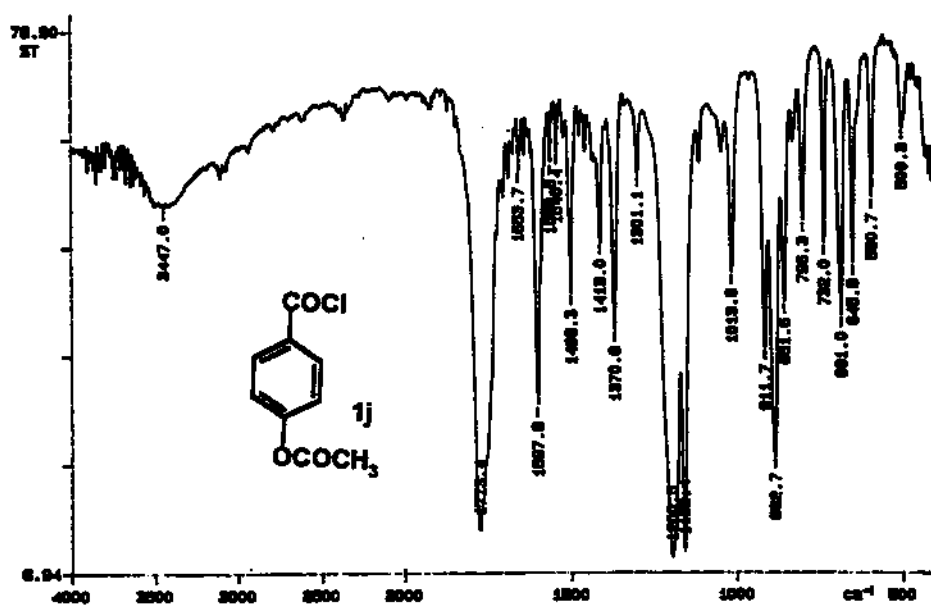


Figura 15 - Espectroscopia no IV do composto 1j (filme cm^{-1}).

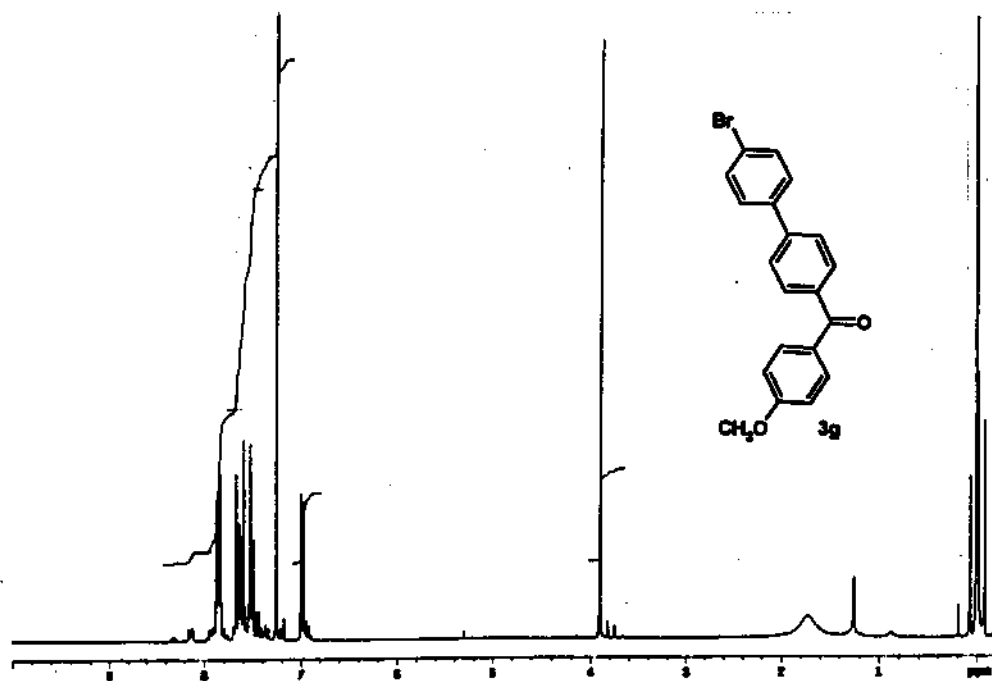


Figura 16 - Espectro de RMN^1H do composto 3g (300 MHz, CDCl_3/TMS , δ).

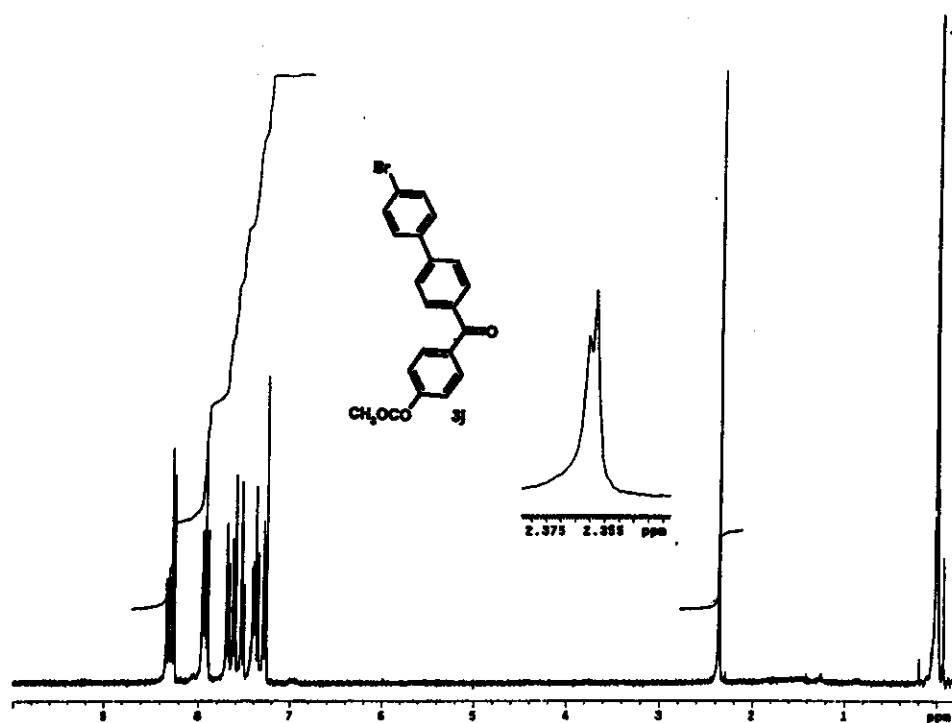


Figura 17 - Espectro de RMN¹H do composto 3j (300 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

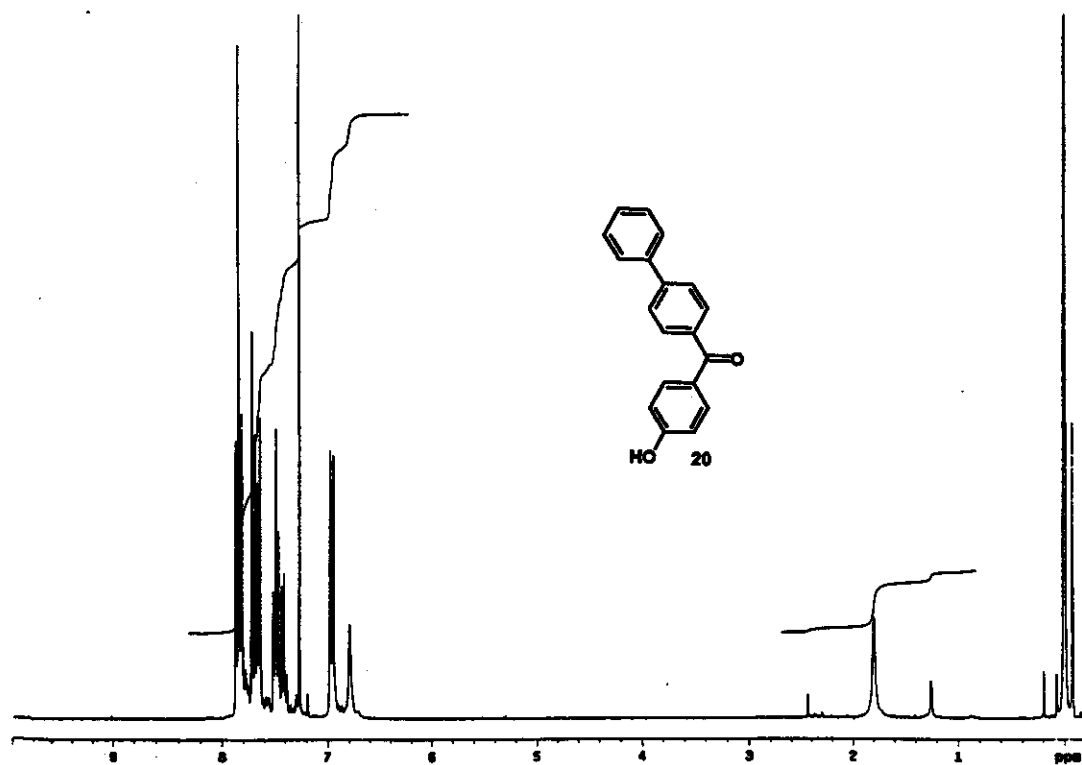


Figura 18 - Espectro de RMN¹H do composto 20 (300 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

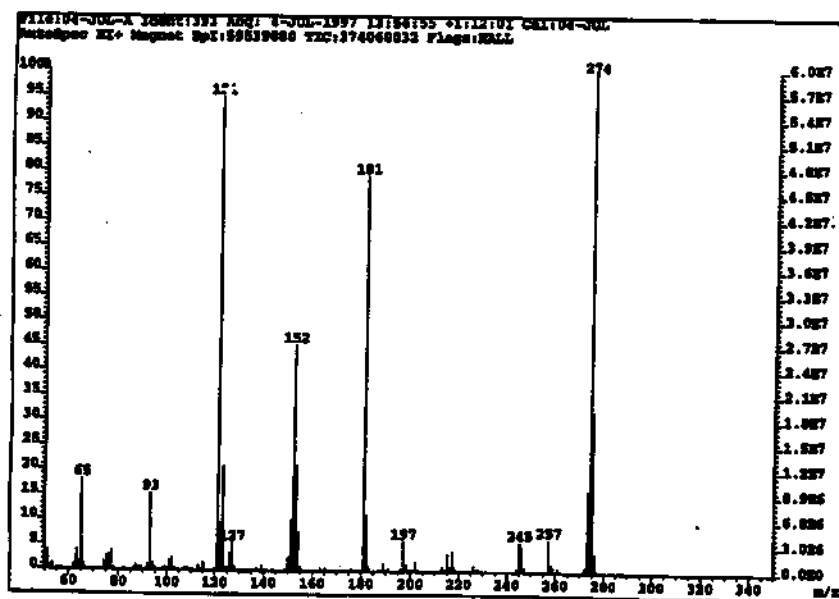


Figura 19a - Espectrometria de massa do composto 20 (EI - 70 eV).

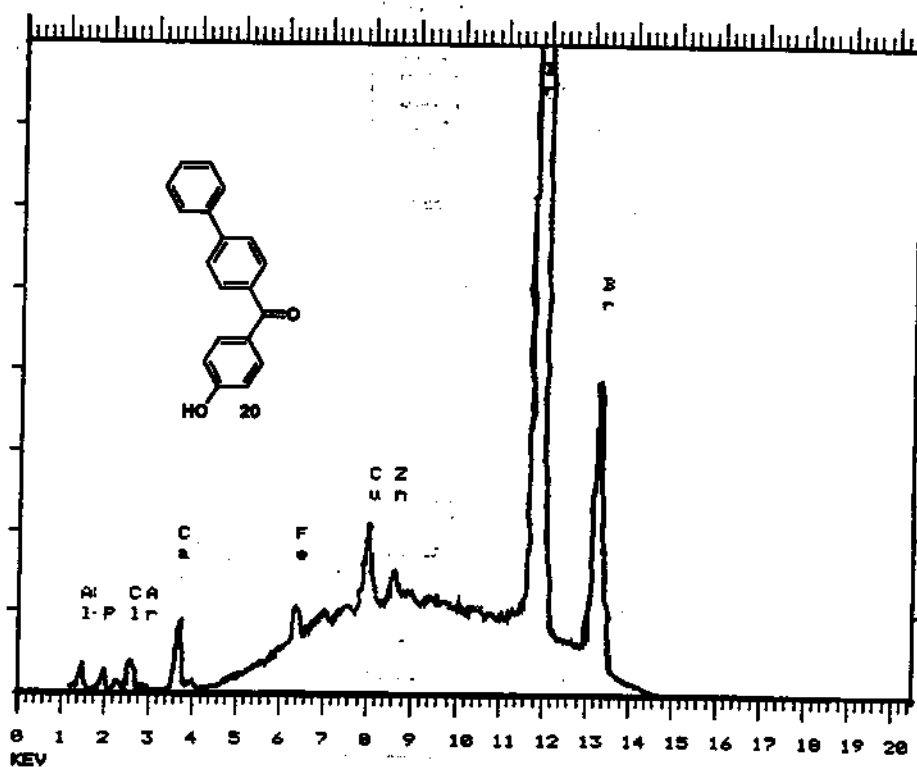


Figura 19b - Fluorescência de Raio-X do composto 20.

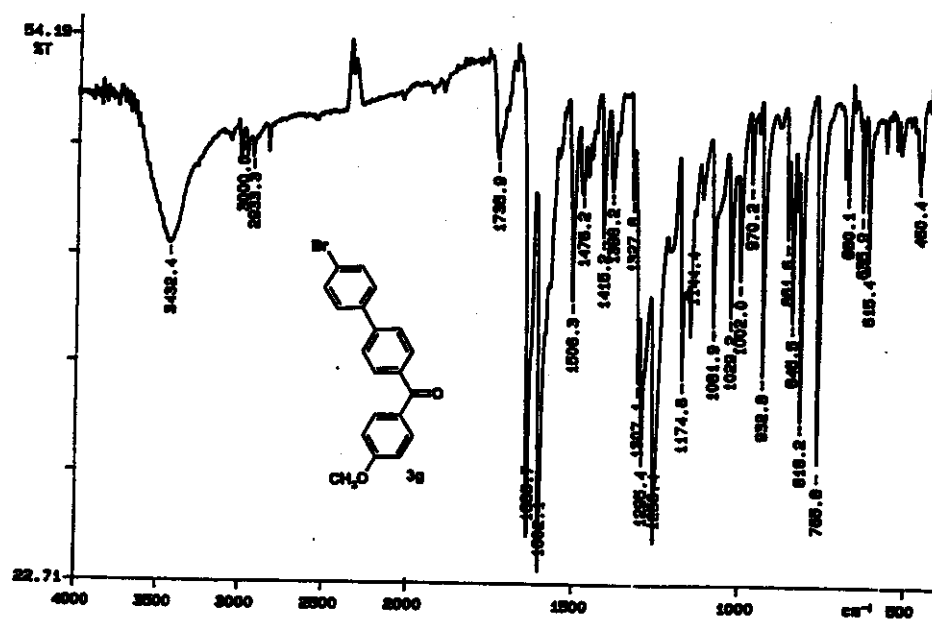


Figura 20a – Espectroscopia no IV do composto 3g (KBr cm⁻¹).

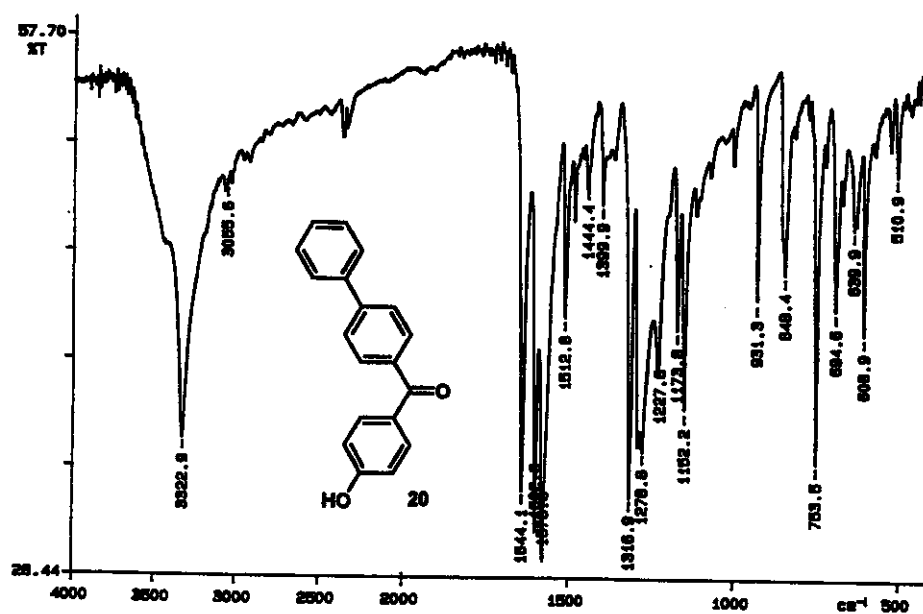


Figura 20b - Espectroscopia no IV do composto 20 (KBr cm⁻¹).

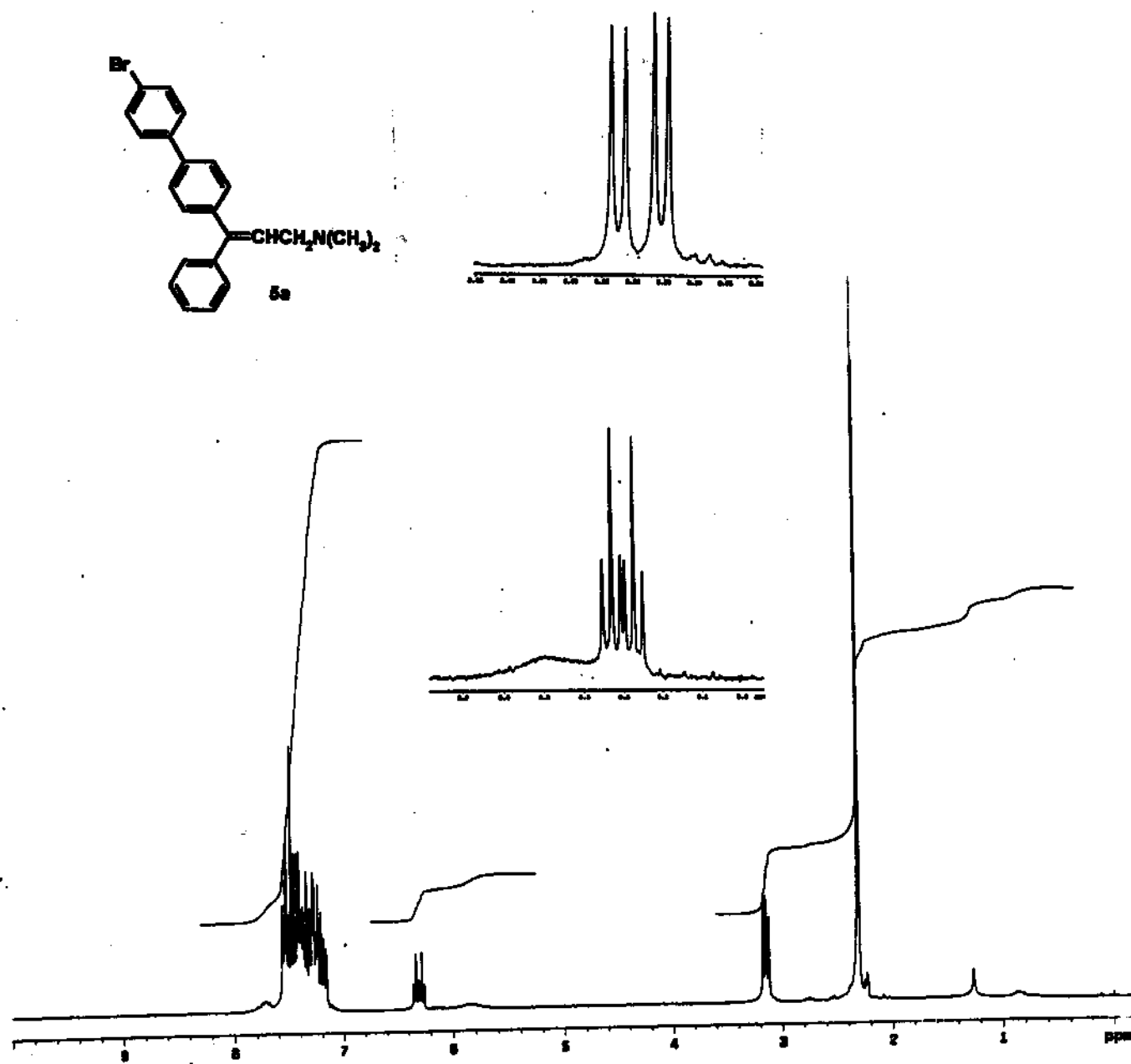


Figura 21 - Espectro de RMN¹H do composto 5a (500 MHz; CDCl₃/TMS, δ).

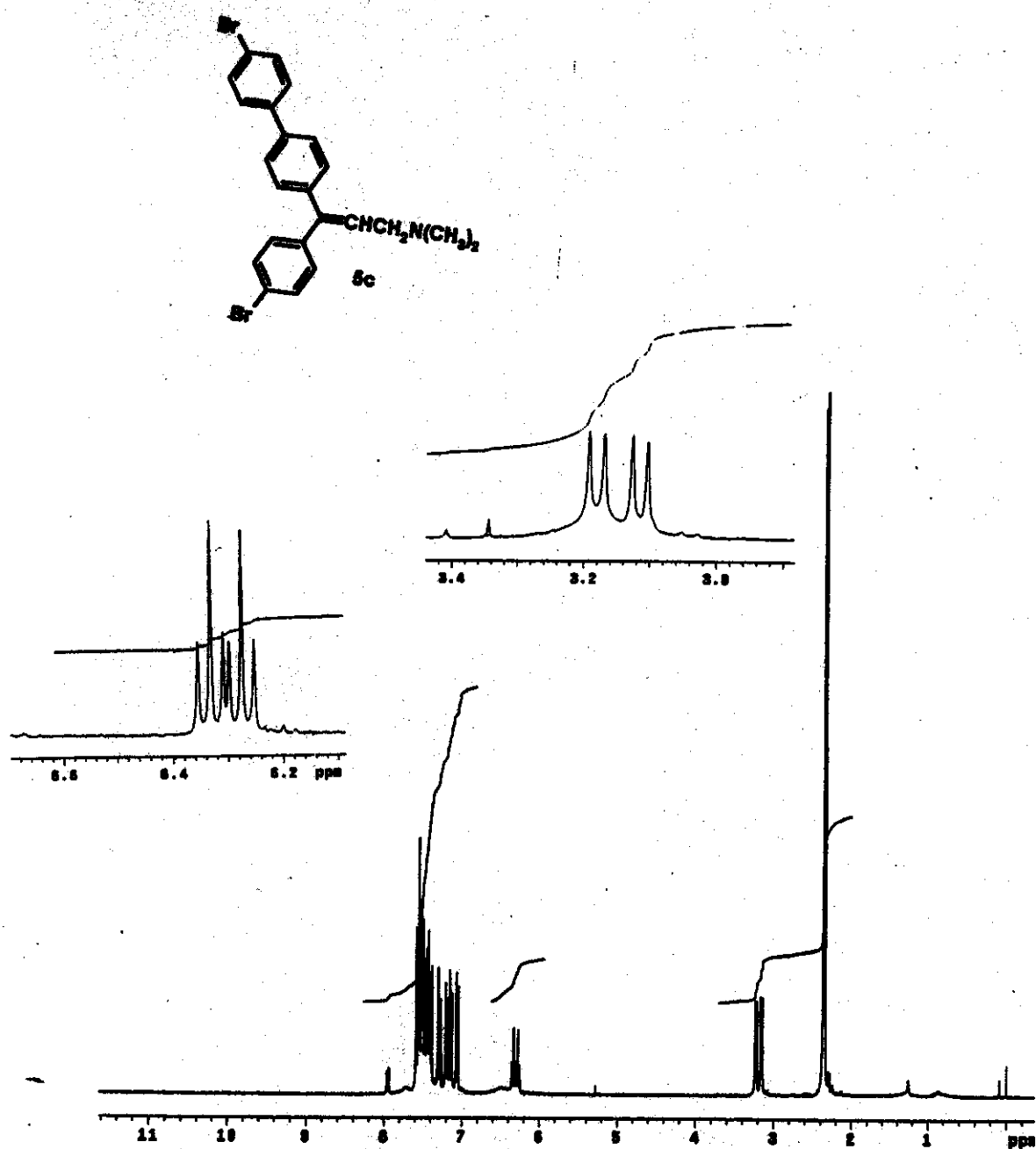


Figura 22 - Espectro de RMN^1H do composto **5c** (500 MHz; CDCl_3/TMS , δ).

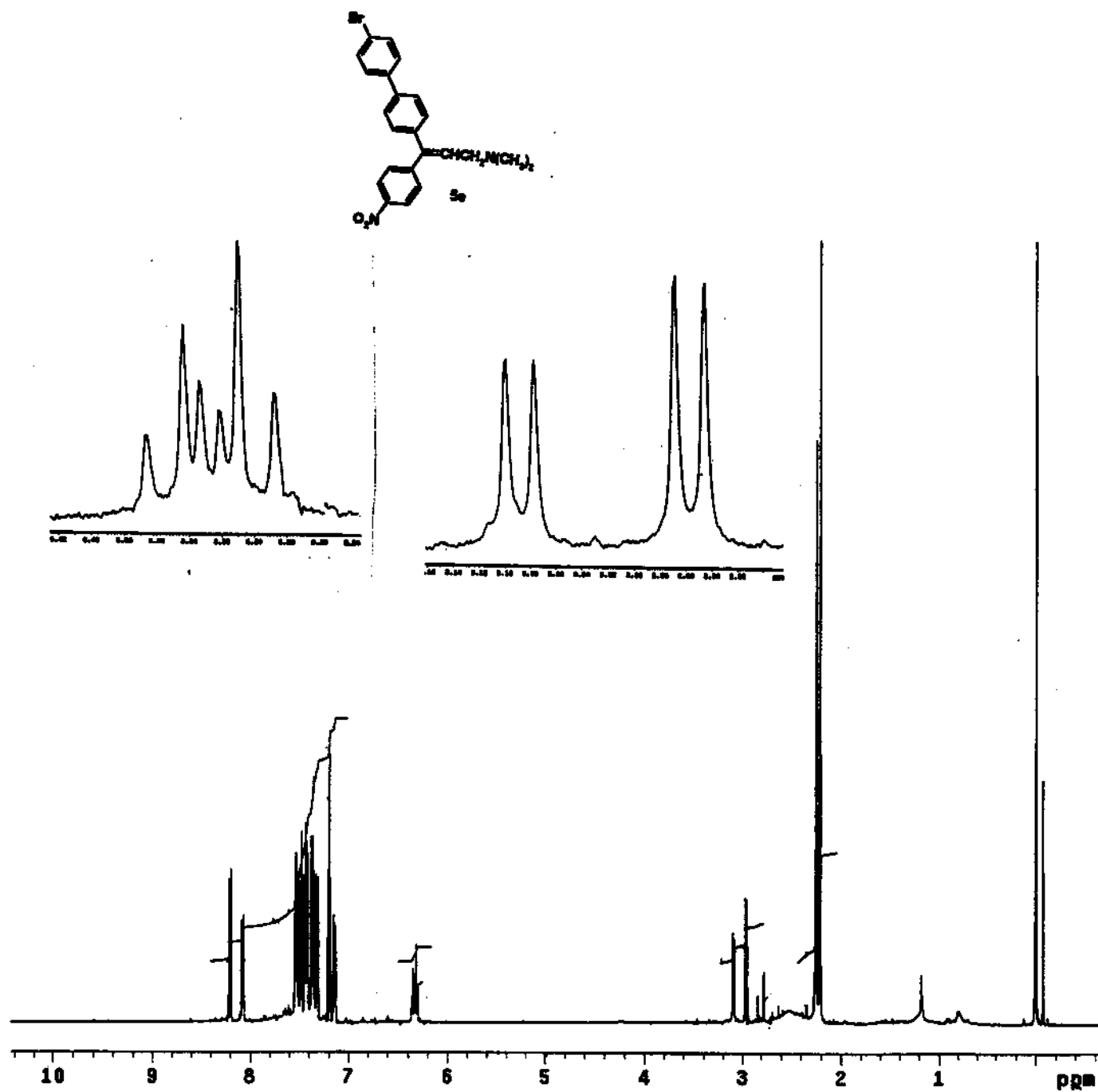


Figura 23 - Espectro de RMN^1H do composto **5c** (500 MHz; CDCl_3/TMS , δ).

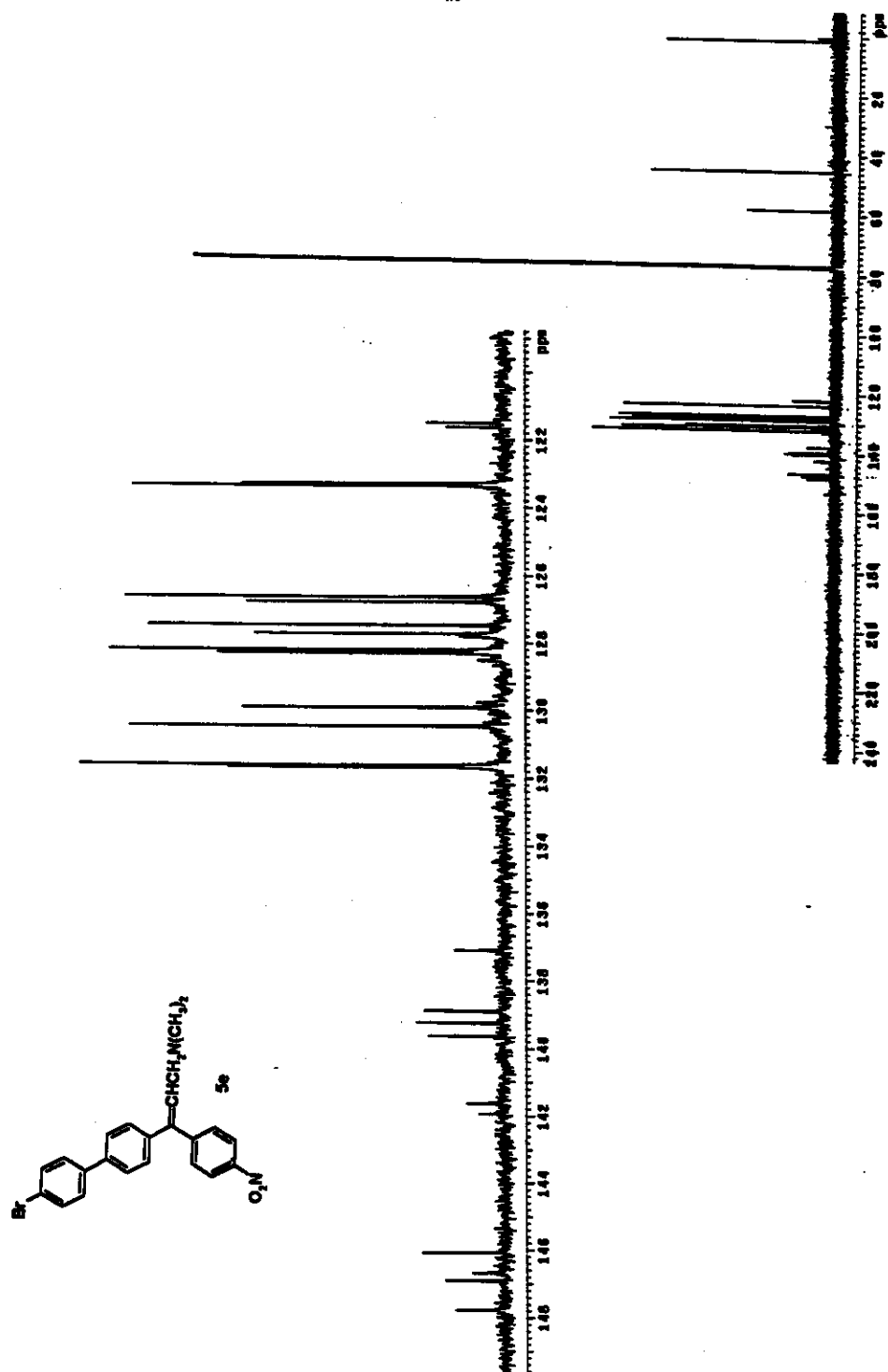


Figura 24 - Espectro de RMN¹³C do composto 5e (125 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

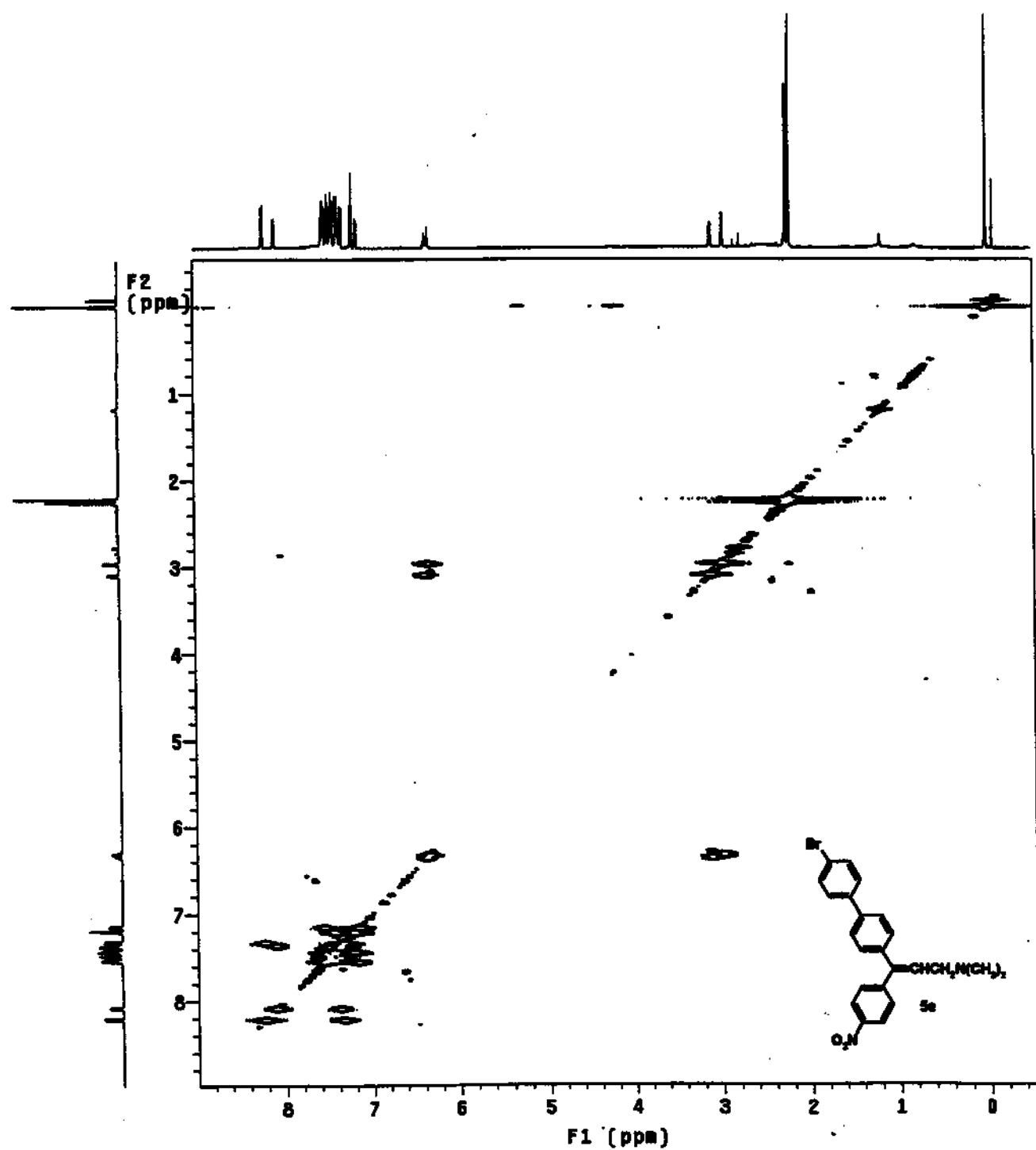


Figura 25 - Gráfico de Contorno COSY do composto **5e**.

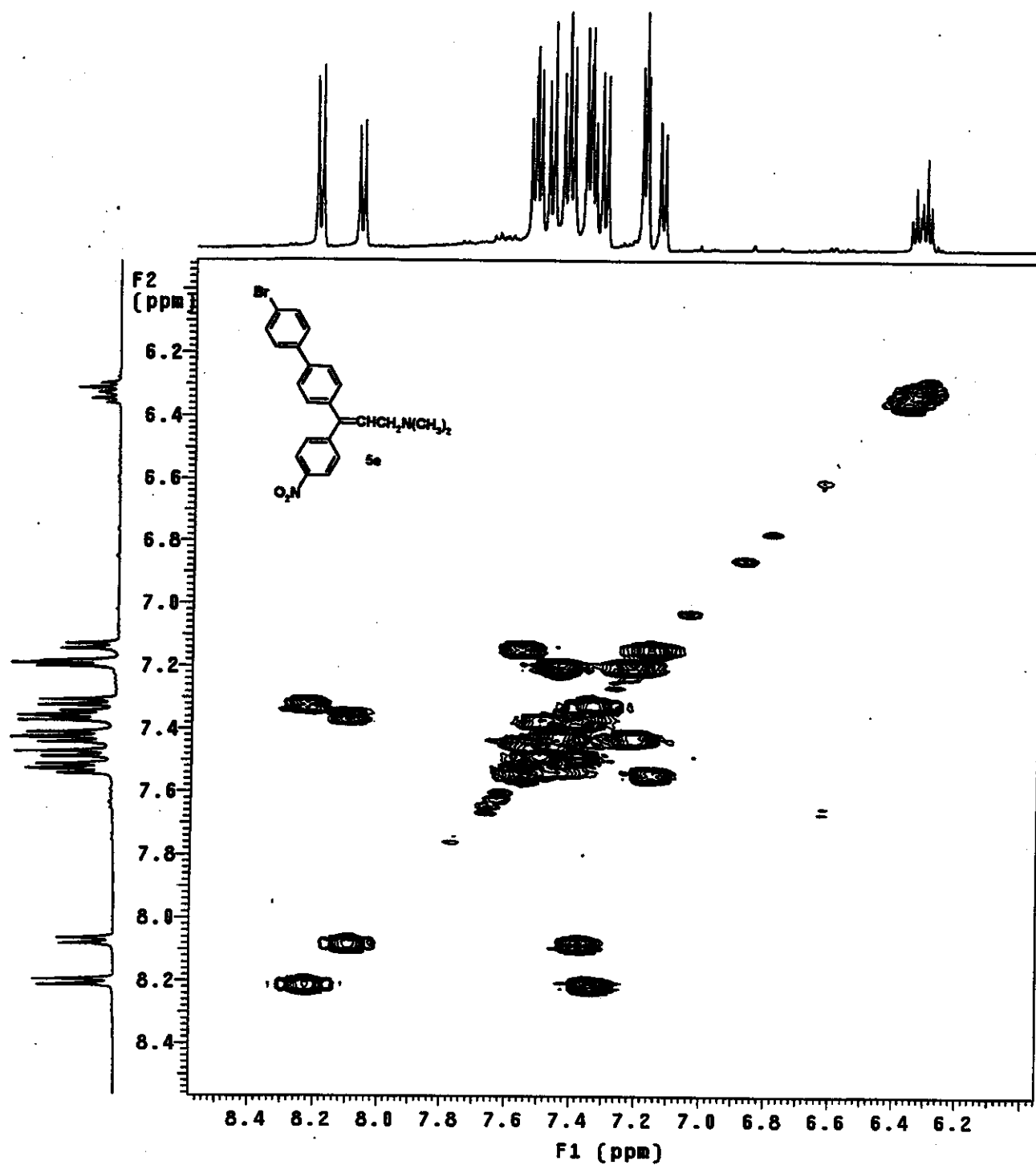


Figura 26 - Expansão do gráfico de Contorno COSY do composto **5e**.

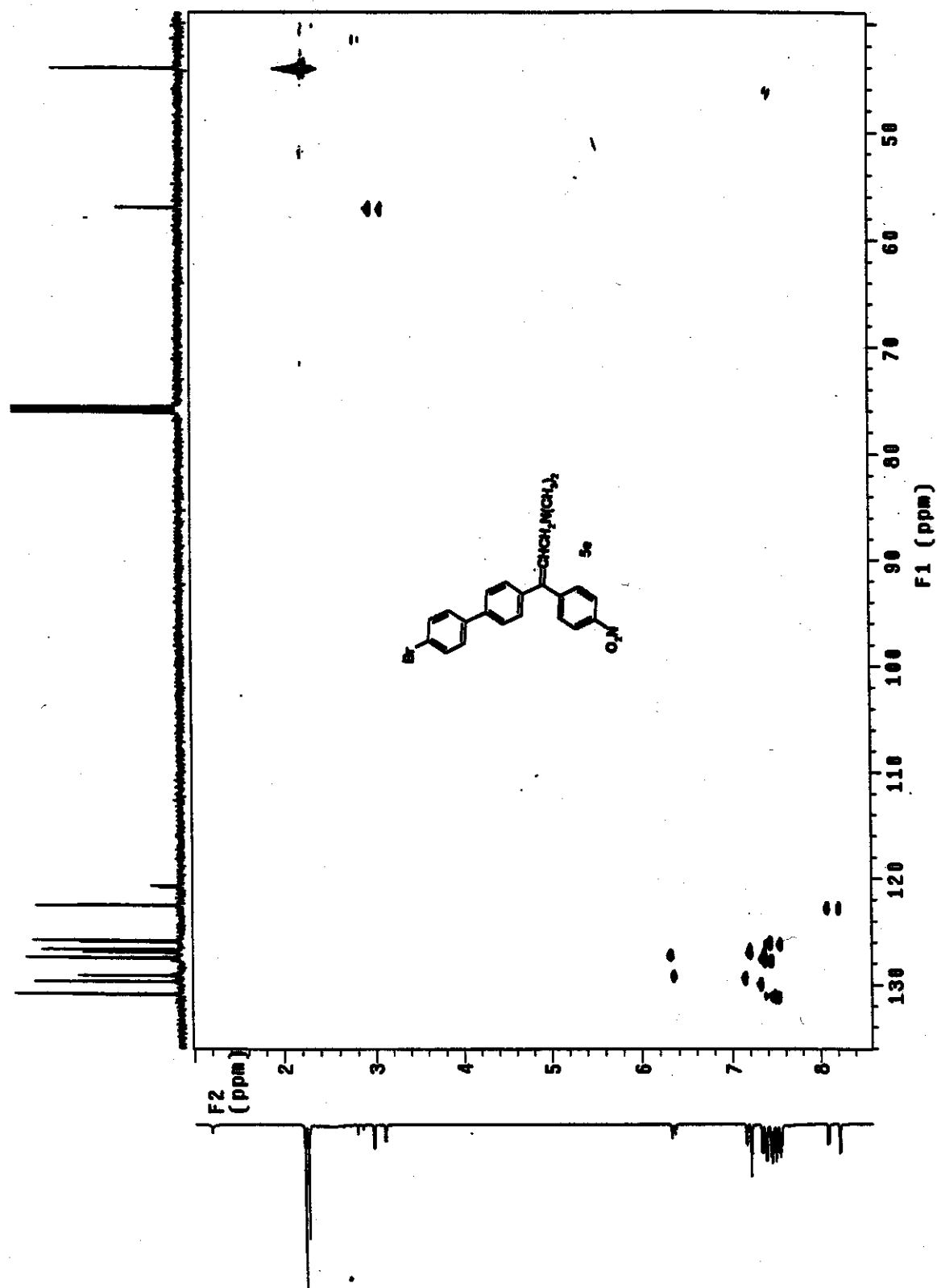


Figura 27 - Gráfico de Contorno HMQC do composto 5e.

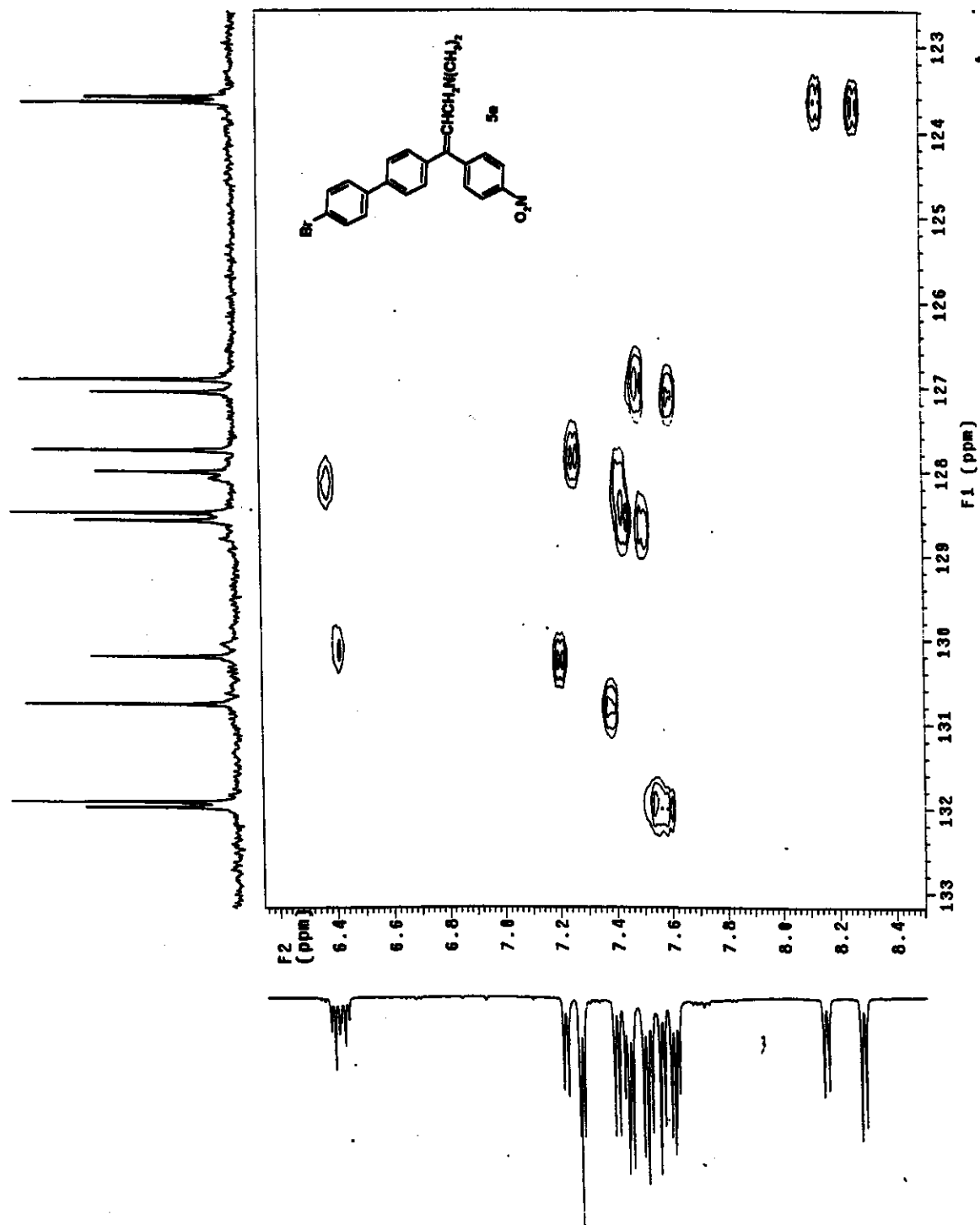


Figura 28 - Expansão do gráfico de Contorno HMQC do composto 5e.

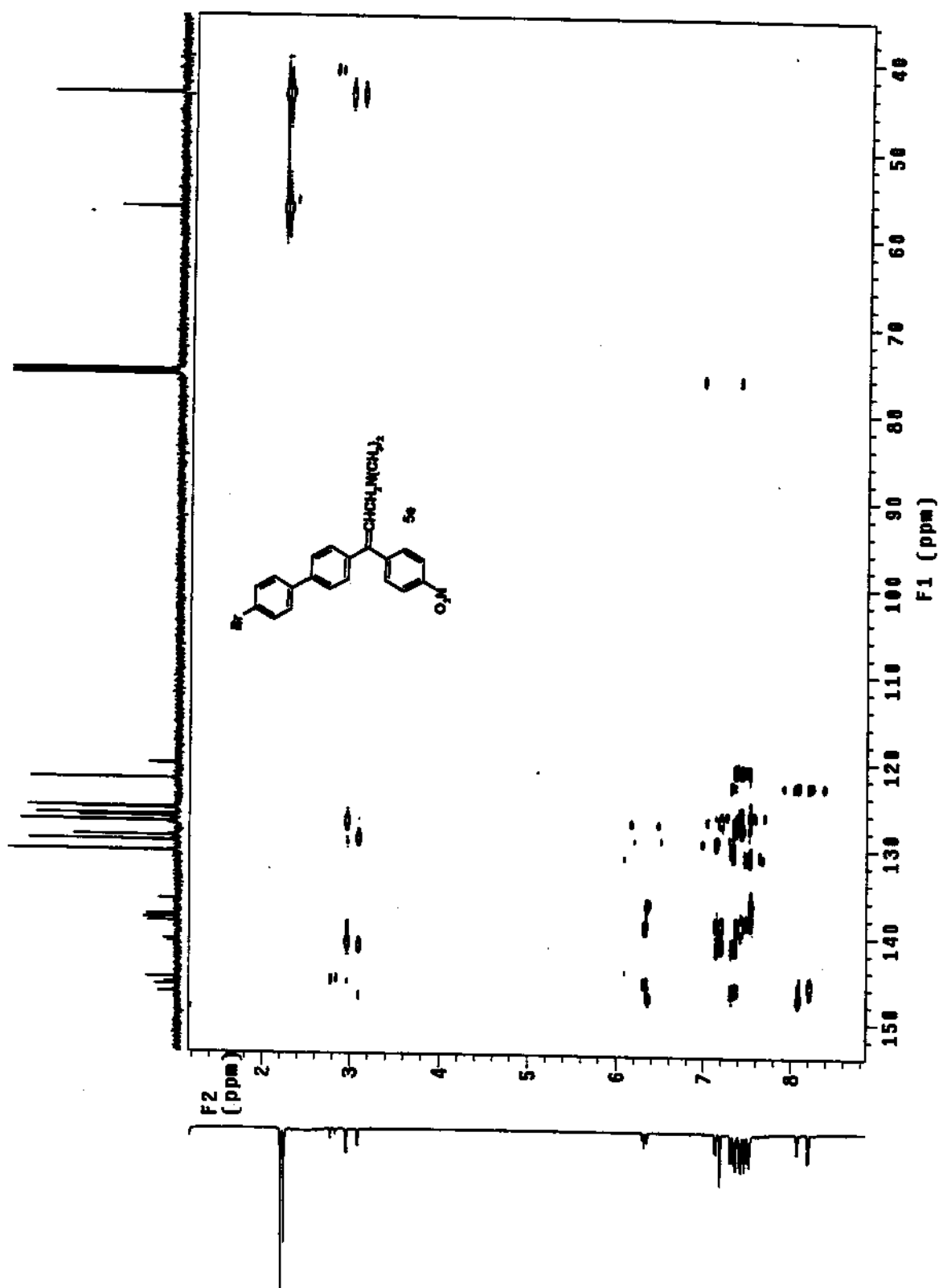
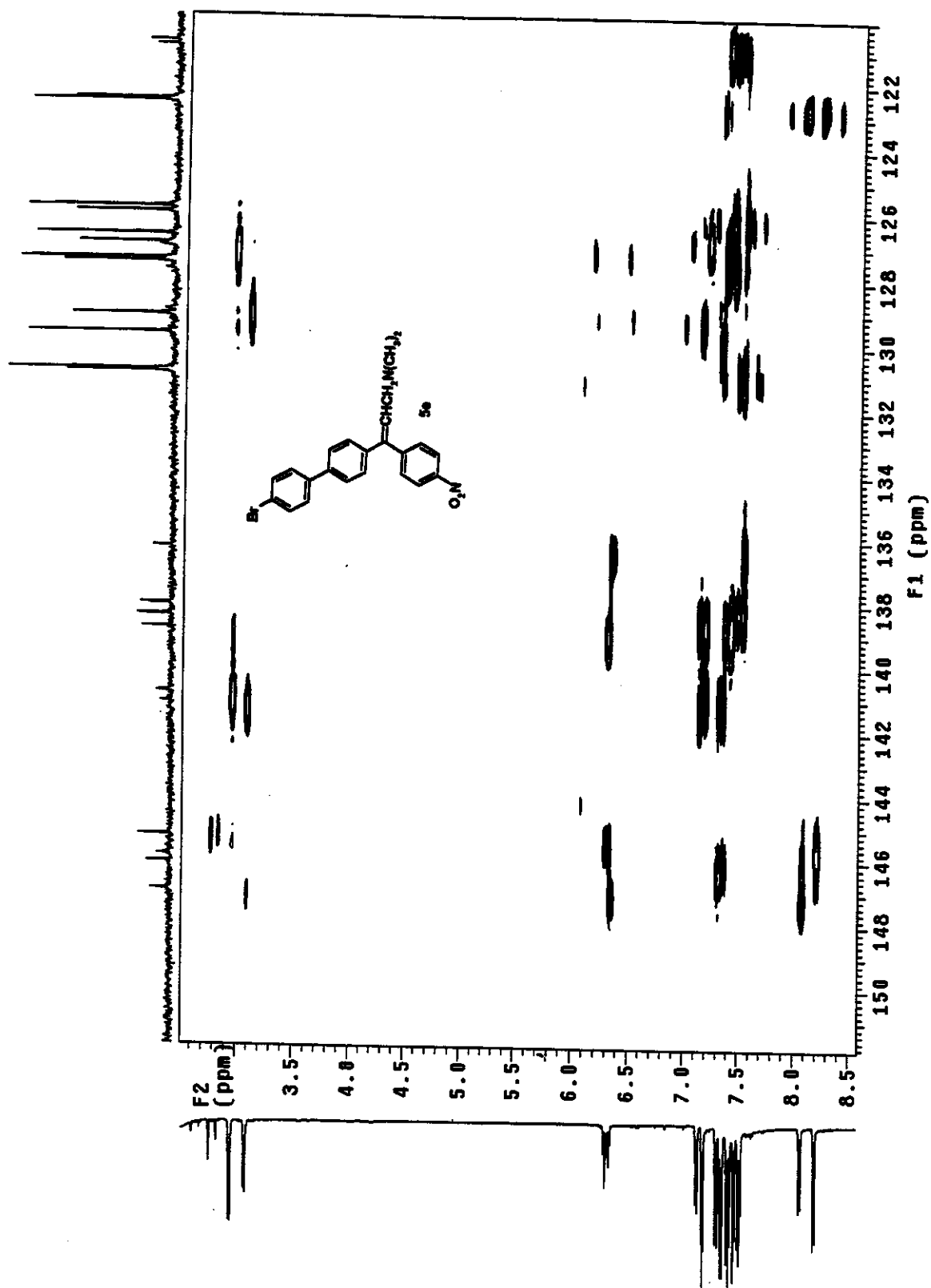


Figura 29 - Gráfico de Contorno HMBC do composto 5e.



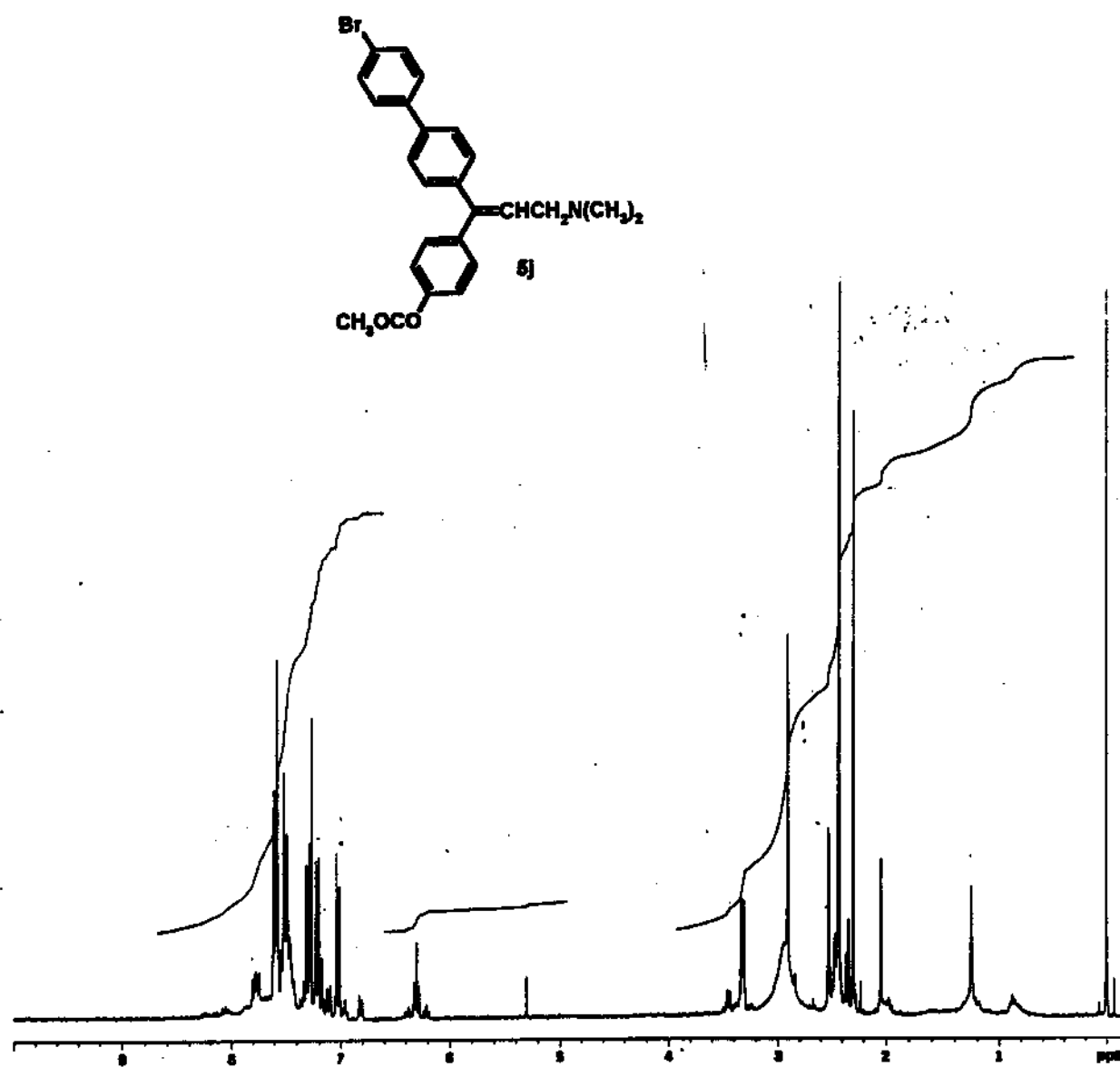


Figura 31 - Espectro de RMN^1H do composto **5j** (500 MHz; CDCl_3/TMS , δ).

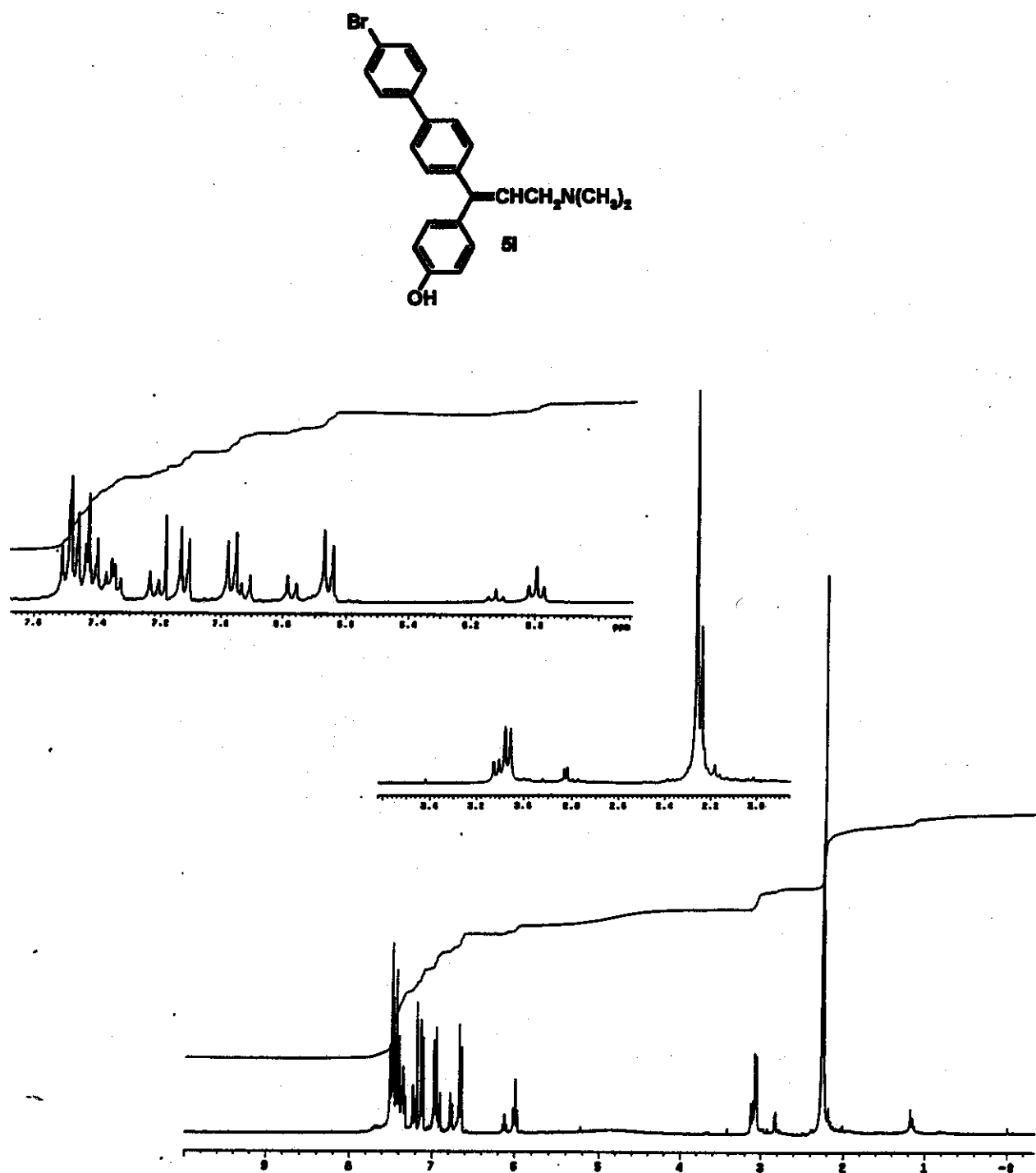


Figura 32 - Espectro de RMN¹H do composto 5I (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ).

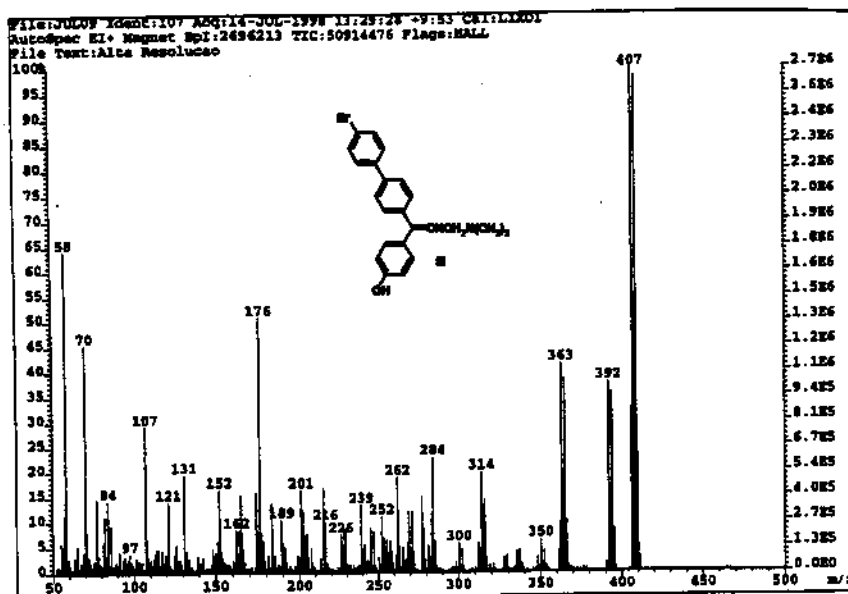


Figura 33a - Espectrometria de massa do composto 5I (EI - 70 eV).

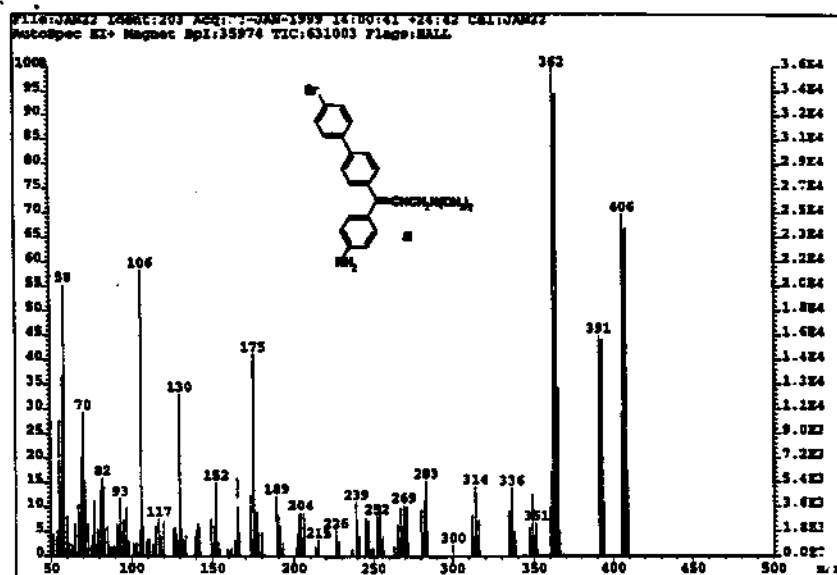


Figura 33b - Espectrometria de massa do composto 5i (EI - 70 eV).

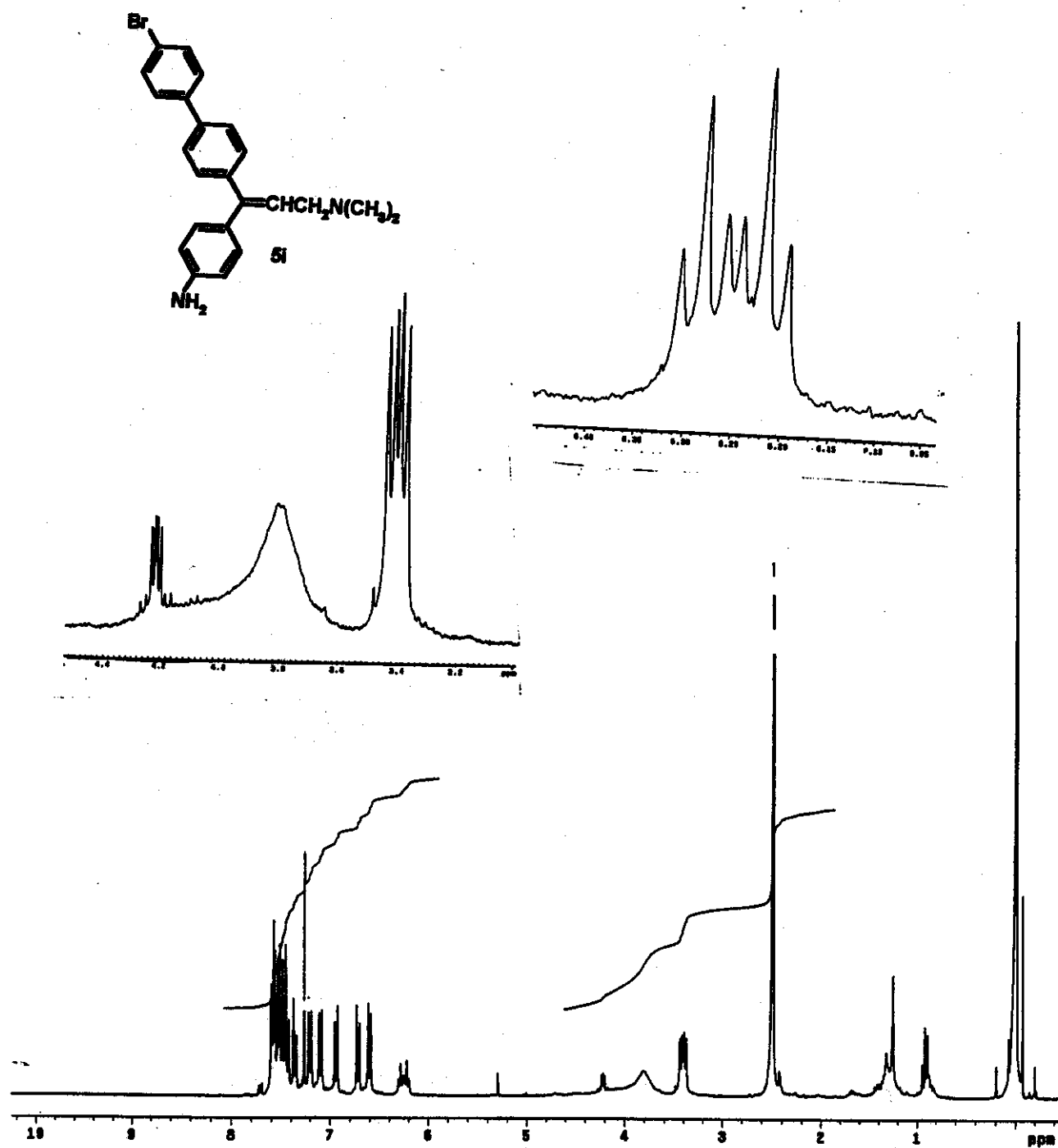


Figura 34 - Espectro de RMN^1H do composto **5i** (300 MHz; CDCl_3/TMS , δ).

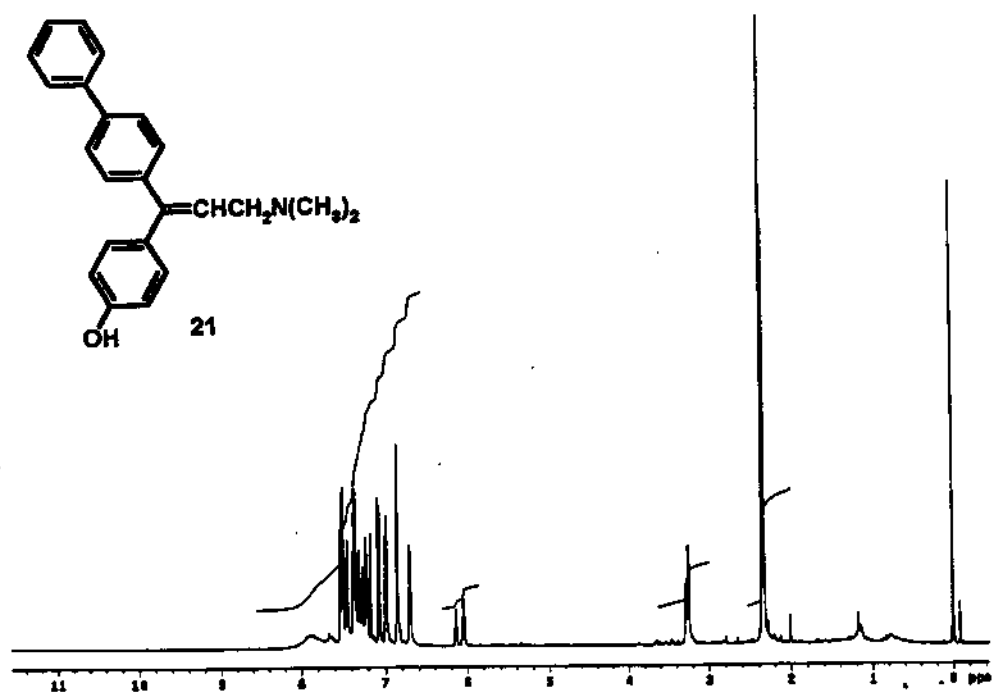


Figura 35a- Espectro de RMN¹H do composto 21 (500 MHz; CDCl₃/TMS, δ).

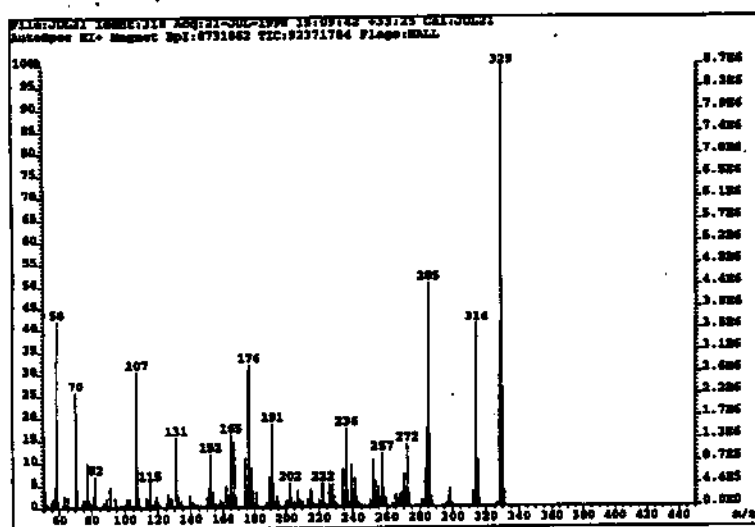
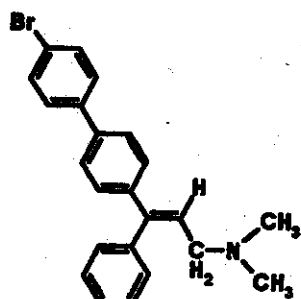


Figura 35b - Espectrometria de massa do composto 21 (EI - 70 eV).



5aE

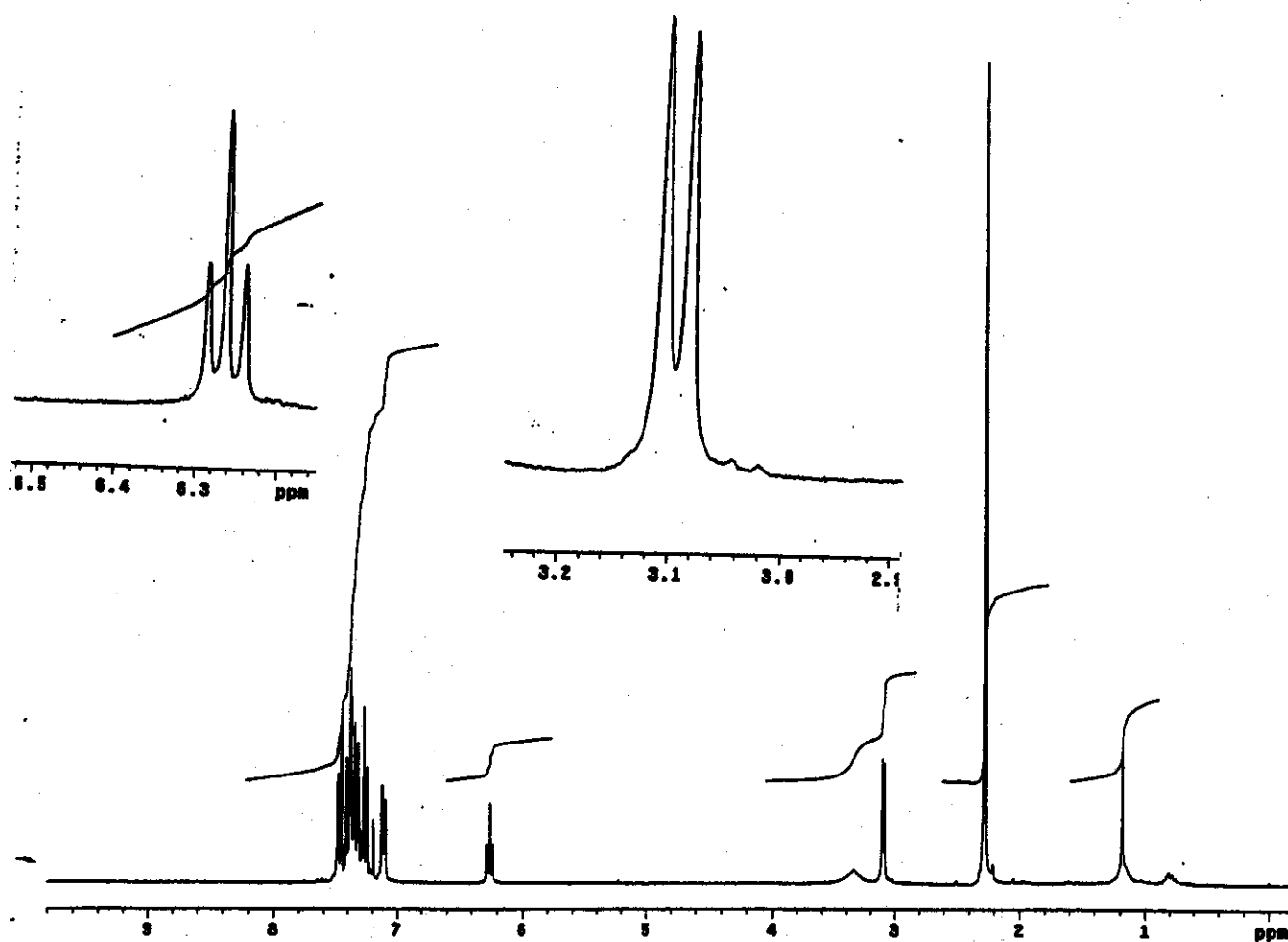


Figura 36 - Espectro de RMN^1H do composto 5aE (300 MHz, CDCl_3/TMS , δ).

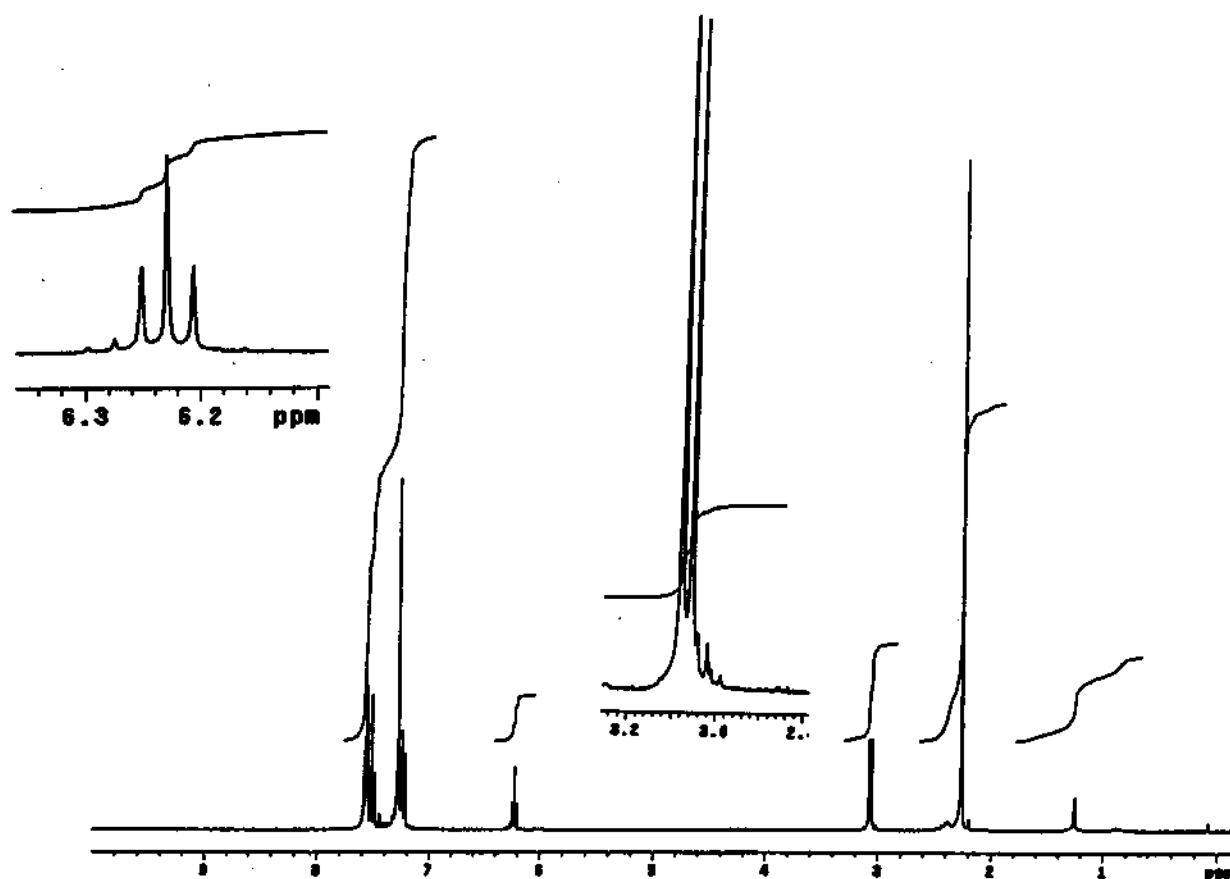
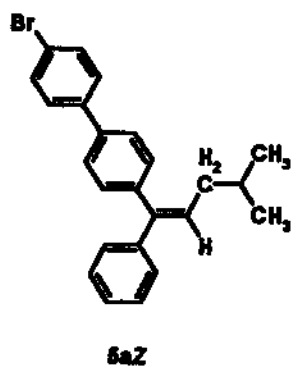


Figura 37 - Espectro de RMN¹H do composto 5aZ (300 MHz, CDCl₃/TMS, δ).

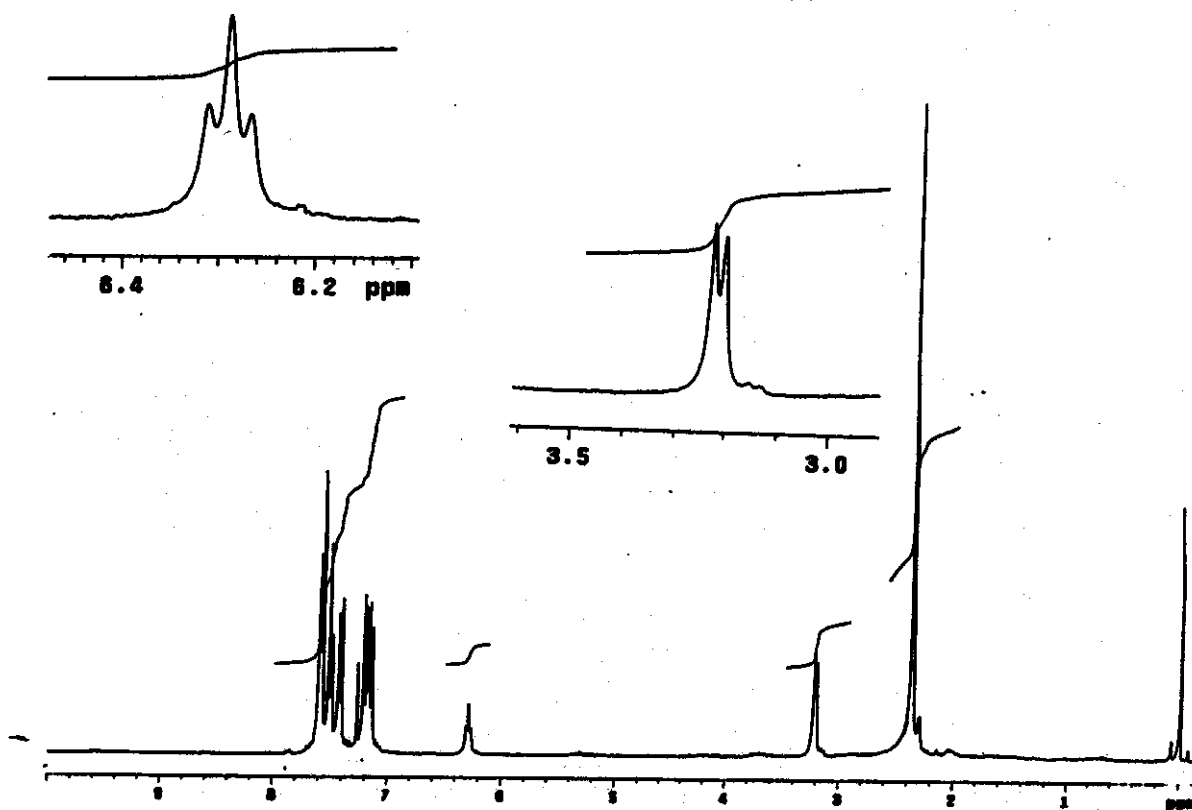
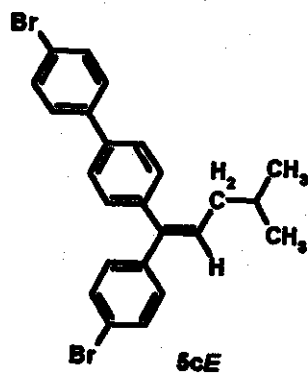


Figura 38 - Espectro de RMN¹H do composto 5cE (300 MHz; CDCl₃/TMS, δ).

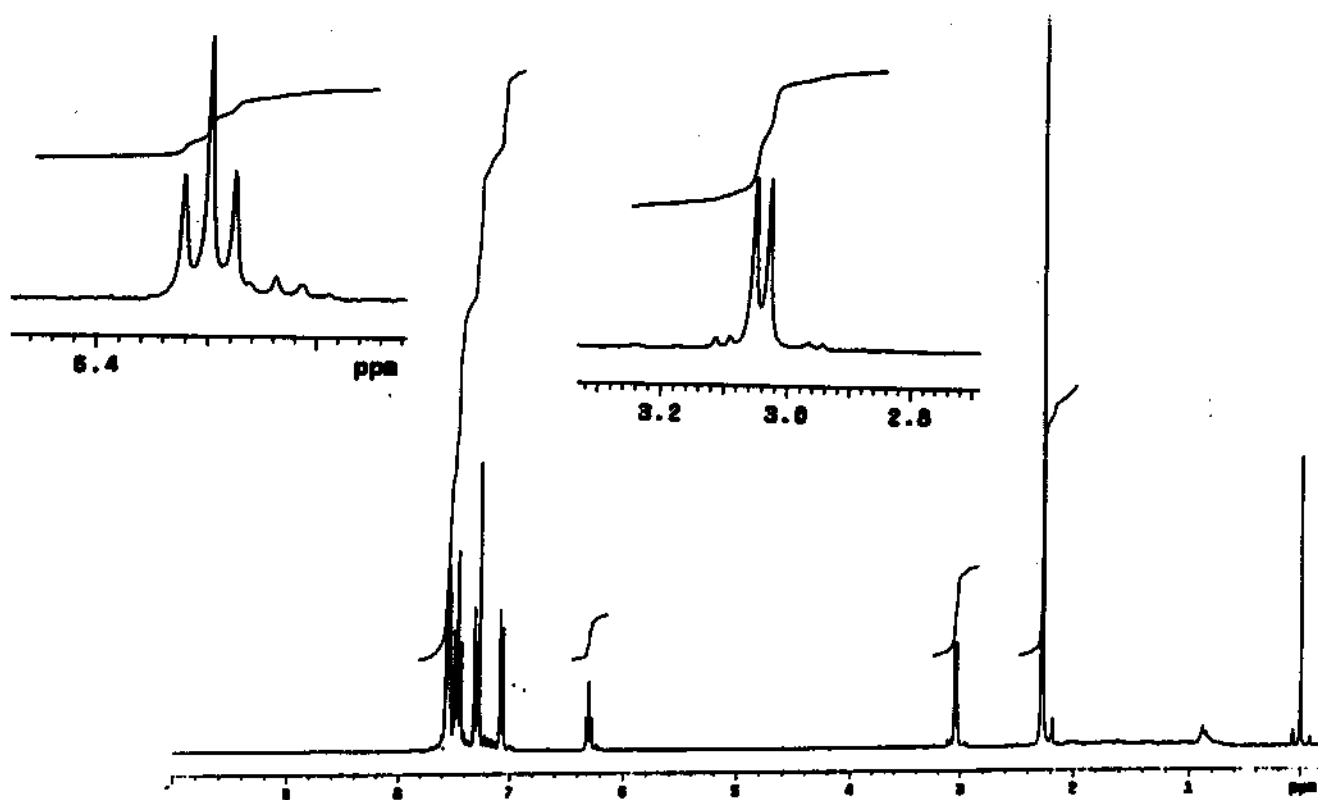
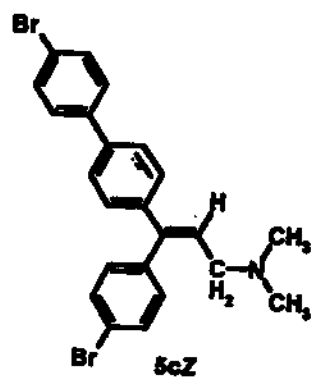


Figura 39 - Espectro de RMN^1H do composto **5cZ** (300 MHz; CDCl_3/TMS , δ).