

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA - CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**“Avaliação do potencial tripanocida de diaminas, diaminas
de ferroceno e derivados de 1,4-naftoquinonas em cepas de
Trypanosoma brucei”**

Angela María Arenas Velásquez

Araraquara
2013

Angela María Arenas Velásquez

“Avaliação do potencial tripanocida de diaminas, diaminas de ferroceno e derivados de 1,4-naftoquinonas em cepas de *Trypanosoma brucei*”

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

**Araraquara
2013**

Angela María Arenas Velásquez

“Avaliação do potencial tripanocida de diaminas, diaminas de ferroceno e derivados de 1,4-naftoquinonas em cepas de *Trypanosoma brucei*”

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 25 de Fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

Profª. Dra. Márcia Graminha
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro
Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

DADOS CURRICULARES

Nome: Angela María Arenas Velásquez

Nome em citações bibliográficas: VELÁSQUEZ, A. M. A.; ARENAS VELÁSQUEZ, A. M.

Sexo: Feminino

Filiação: Julio Ernesto Arenas Vásquez e Dora Elisa Velásquez Caicedo

Nascimento: 31/01/1984 – Bogotá – Colômbia.

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
Departamento de Ciências Biológicas
Rodovia Araraquara - Jaú Km 01 - 14800-902, SP - Brasil.
Laboratório de Imunologia
Telefone: (16) 3301-6950
URL do home page: <http://www.fcfar.unesp.br>

E-mail para contato: avellangel@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2011 Mestrado em Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Título: Avaliação do potencial tripanocida de benzil diaminas, diaminas de ferroceno e derivados de 1,4-naftoquinonas em cepas de *Trypanosoma brucei brucei*.

Orientador: REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI

Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Áreas do conhecimento: *Parasitologia*

2000 - 2005 Graduação em Química. UNIVERSIDAD DEL VALLE, UNIVALLE GRALTA, Colômbia.

Título: Clonación y Localización de una Beta Anhidrasa Carbónica a Partir del Vector Africano de Malaria (*Anophles gambiae*) y del Vector Suramericano de Fiebre Amarilla (*Stegomyia aegypti*).

Orientador: Maria del Pilar Corena; Co-orientador: Adalberto Sanchez.

Formação complementar

2012 - 2012 Curso de curta duração em Citometria de Fluxo. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2012 - 2012 Curso de curta duração em Tópicos Avançados em Biofarmácia e Farmacocinética. Red biofarma, REDBIOFARMA, Espanha.

2011 - 2011 Curso de curta duração em ANÁLISE FORENSE. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.

2011 - 2011 Curso de curta duração em AVANCES EN GENÉTICA FORENSE. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Atuação profissional

1. PLASTIC FILMS INTERNACIONAL – PLAFILM. Vínculo institucional.

2008 - 2011 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: PRODUCCION, Carga horária: 50, Regime: Dedicação exclusiva.

2. LICEO JUAN PABLO II - JUAN PABLO II. Vínculo institucional.
2005 - 2006 Vínculo: PROFESSOR, Enquadramento funcional: PROFESSOR AREAS
QUIMICA E BIOLOGIA, Carga horária: 48, Regime: Dedicção exclusiva.

Produção bibliográfica

Apresentação de trabalho e palestra

1. RODRIGUES, D. F., ARENAS VELÁSQUEZ, A. M., SALGUEIRO, L., CAVALEIRO, C., MARTINS, G., MAGALHAES, N., SANTOS, L., MARTINS, M., CICARELLI, R.M.B., MOREIRA, R. Chemical composition and trypanocidal activity evaluation of essential oils from *Hedychium coronarium* against *Trypanosoma brucei* strains, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho). *Referências adicionais: Portugal/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Faculty of Sciences of Lisbon; Cidade: Lisboa; Evento: 43rd International Symposium on Essential Oils; Inst.promotora/financiadora: Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centro de Biotecnologia vegetal - Fundação da Faculdade de Ciências de Lisboa.*
2. KOHATSU, A. A. N., SILVA, F. A. J., ARENAS VELÁSQUEZ, A. M., RODRIGUES, D. F., CHIARI, B., ALMEIDA, G., FRANCISCO, A. I., ANDREA, S., ROSA, J., VARGAS, M. D., ISSAC, V. L., CICARELLI, R. M.B. Evaluation of the susceptibility of epimastigote strains from *T. cruzi* to ferrocenyl diamines, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho). *Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Caxambu, Minas Gerais; Evento: XXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XXXIX Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Parasitologia.*
3. ARENAS VELÁSQUEZ, A. M., RODRIGUES, D. F., SILVA, F. A. J., CHIARI, B., ALMEIDA, G., ISSAC, V. L., FRANCISCO, A. I., VARGAS, M. D., CICARELLI, R. M. B. Evaluation of the Trypanocidal activity of diamines and ferrocenyl diamines against *Trypanosoma brucei* strains, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho) *Palavras-chave: Trypanosoma brucei, Ferrocenyl Diamines. Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio magnético; Local: Hotel Intercontinental – Rio de Janeiro; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.*
4. ARENAS VELÁSQUEZ, A. M., SILVA, F. A. J., RODRIGUES, D. F., KOHATSU, A. A. N., CHIARI, B., ALMEIDA, G., ISSAC, V. L., FRANCISCO, A. I., VARGAS, M. D., CICARELLI, R. M. B. Evaluation of the trypanocidal activity of 1,4-naphthoquinones against *Trypanosoma brucei* strains, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho). *Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Caxambu, Minas Gerais; Evento: XXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XXXIX Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Parasitologia.*
5. SILVA, F.J.A., RODRIGUES, D. F., VELÁSQUEZ, A. M. A., KOHATSU, A. A. N., REGASINI, L. O., SILVA, D. H. S., CICARELLI, R.M.B. Evaluation of Trypanocidal activity of *Distictella mansoana*, *Jacaranda puberula* and *Stizophyllum perforatum* extracts on *Trypanosoma cruzi* Y strain, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho). *Áreas do conhecimento: Parasitologia. Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Sociedade de Medicina e Cirurgia; Cidade: São José do Rio Preto; Evento: FAMERP - UTMB: Emerging Infections in the Americas - common interests and collaboration between Brazil and*

USA; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

6. MARTINS, G., GUIMARAES, F., SILVA, F. A. J., VELÁSQUEZ, A. M. A., RODRIGUES, D. F., KOHATSU, A. A. N., ALMEIDA, A. E., PLANETA, C. S., CICARELLI, R.M.B., MOREIRA, R. Trypanocidal activity of fruits extracts of *Solanum lycocarpum* St. Hill. on *Trypanosoma brucei* strain, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Referências adicionais: *Áustria/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: University of Graz; Cidade: Graz; Evento: 13th International Congress of the Society for Ethnopharmacology; Inst.promotora/financiadora: International Society for Ethnopharmacology.*

7. MARTINS, G., MAGALHAES, N., SILVA, F. A. J., VELÁSQUEZ, A. M. A., RODRIGUES, D. F., KOHATSU, A. A. N., PLANETA, C., CICARELLI, R.M.B., MOREIRA, R. Trypanocidal activity of fruits extracts of *Solanum lycocarpum* St. Hill. on *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* strains, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Referências adicionais: *Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Grand Hyatt; Cidade: New York; Evento: International Congress on Natural Products Research; Inst.promotora/financiadora: ICNPR.*

8. ARENAS VELÁSQUEZ, A. M., Garcia, G., JIMENEZ, E., CEBALLOS, C., CUENCA, C., SANTORO, A., SANCHEZ, A., CORENA, M. P., LINSER, P. J. Beta Anhidrasa Carbónica a Partir del Vector Africano de Malaria (*Anopheles gambiae*) y del Vector Suramericano de Fiebre Amarilla (*Stegomyia aegypti*), 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Referências adicionais: *Colômbia/Espanhol. Meio de divulgação: Impresso; Local: Universidad del Quindío; Cidade: Armenia; Evento: VII Congreso de Estudiantes de Química y II Simposio de Química Aplicada; Inst.promotora/financiadora: Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad del Quindío.*

9. VELÁSQUEZ, A. M. A., García, G., CEBALLOS, C., CUENCA, C., JIMENEZ, E., SANTORO, A., SANCHEZ, A., CORENA, M. P., LINSER, P. J. Clonación y Localización de una Beta Anhidrasa Carbónica a Partir del Vector Africano de Malaria (*Anopheles gambiae*) y del Vector Suramericano de Fiebre Amarilla, 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Palavras-chave: *Aedes aegypti*, Anhidrasa Carbonica Beta, *Anopheles gambiae*. Referências adicionais: *Colômbia/Espanhol. Meio de divulgação: Vários; Local: Universidad Autonoma de Occidente; Cidade: Santiago de Cali; Evento: XL Congreso Nacional de Ciencias Biológicas; Inst.promotora/financiadora: Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas.*

10. VELÁSQUEZ, A. M. A., García, G., CUENCA, C., JIMENEZ, E., CEBALLOS, C., SANTORO, A., SANCHEZ, A., CORENA, M. P., LINSER, P. J. Clonación y Localización de una Beta Anhidrasa Carbónica a Partir del Vector Africano de Malaria (*Anopheles gambiae*) y del Vector Suramericano de Fiebre Amarilla, 2005. (Simpósio, Apresentação de Trabalho). Referências adicionais: *Colômbia/Espanhol. Meio de divulgação: Vários; Local: Universidad del Cauca; Cidade: Popayán; Evento: V Simposio Investigación en Ciencias Biológicas; Inst.promotora/financiadora: Asociacion Colombiana de Ciencias Biológicas.*

Demais produções bibliográficas

1. MARTINS, G., MAGALHAES, N., SILVA, F. A. J., VELÁSQUEZ, A. M. A., RODRIGUES, D. F., KOHATSU, A. A. N., PLANETA, C. S., CICARELLI, R. M. B., MOREIRA, R. Trypanocidal activity of fruits extracts of *Solanum lycocarpum* St. Hill. on *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* strains. *Resumo Planta Medica*. 333

Seventh Avenue New York, N: Thieme, 2012. (Outra produção bibliográfica).
Referências adicionais: Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Vários. Home page: <https://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/10.1055/s-0032-1320513>

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Pôster / Painel no (a) 43 International Symposium on Essential Oils, 2012. (Simpósio). Chemical composition and trypanocidal activity evaluation of essential oils from *Hedychium coronarium* against *Trypanosoma brucei* strains.
2. Apresentação de Pôster / Painel no(a) SBPz, 2012. (Congresso). Evaluation of the susceptibility of epimastigote strains from *T. cruzi* to ferrocenyl diamines.
3. Apresentação Oral no (a) XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 2012. (Congresso). Evaluation of the Trypanocidal activity of diamines and ferrocenyl diamines against *Trypanosoma brucei* strains.
4. Apresentação de Pôster / Painel no(a) XXVIII Brazilian Annual Meeting of Applied Research on Chagas Disease, XVI Brazilian Annual Meeting of Applied research on Leishmaniasis and III Latin American Congress on Travel Medicine, 2012. (Congresso). Evaluation of the trypanocidal activity of diamines and ferrocenyl diamines against *Trypanosoma brucei* strains.
5. Apresentação de Pôster / Painel no(a) SBPz, 2012. (Congresso). Evaluation of the trypanocidal activity of 1,4-naphthoquinones against *Trypanosoma brucei* strains.
6. Apresentação de Pôster / Painel no (a) 13 International Congress of the Society for Ethnopharmacology, 2012. (Congresso). Trypanocidal activity of fruits extracts of *Solanum lycocarpum* St. Hill on *Trypanosoma brucei* strain.
7. Apresentação de Pôster / Painel no (a) International Congress on Natural Products Research, 2012. (Congresso). Trypanocidal activity of fruits extracts of *Solanum lycocarpum* St. Hill on *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* strains.
8. II Congresso Farmacêutico da UNESP, 2012. (Congresso).
9. Congresso Farmacêutico: Atuação do Farmacêutico na Indústria de Bens de Consumo, 2012. (Seminário).
10. Congresso Farmacêutico: Assistência Farmacêutica, 2012. (Seminário).
11. I SEMANA INTERNACIONAL DE FITOTERAPIA - UNESP- FACULDADE DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, 2012. (Outra).
12. IV Workshop All Pharma Junior - Oportunidades do Mundo Farmacêutico, 2011. (Outra).
13. Workshop: Uso de recursos da biodiversidade e sua transferência, 2011. (Outra).
14. 35a SEMANA DA QUÍMICA, 2011. (Outra).
15. Apresentação Oral no(a) XL CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS, 2005. (Congresso). Clonación y Localización de una Beta Anhidrasa Carbónica a Partir del Vector Africano de Malaria (*Anopheles gambiae*) y del Vector Suramericano de Fiebre Amarilla (*Stegomyia aegypti*).
16. Apresentação de Poster / Painel no(a) V SIMPOSIO INVESTIGACION EN CIENCIAS BIOLOGICAS. BIOLOGIA, SALUD Y ETICA, 2005. (Simposio). Clonación y Localización de una Beta Anhidrasa Carbónica a Partir del Vector Africano de Malaria (*Anopheles gambiae*) y del Vector Suramericano de Fiebre Amarilla (*Stegomyia aegypti*).
17. Apresentação de Pôster / Painel no(a) XXXII CONGRESO SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGIA, 2005. (Congresso). Clonación y Localización de

una Beta Anhidrasa Carbónica a Partir del Vector Africano de Malaria (*Anopheles gambiae*) y del Vector Suramericano de Fiebre Amarilla (*Stegomyia aegypti*).

18. Apresentação de Pôster / Painel no (a) II SIMPOSIO DE QUIMICA APLICADA. VII CONGRESO DE ESTUDIANTES DE QUIMICA, 2005. (Congreso). Clonación y Localización de una Beta Anhidrasa Carbónica a Partir del Vector Africano de Malaria (*Anopheles gambiae*) y del Vector Suramericano de Fiebre Amarilla (*Stegomyia aegypti*).

19. Apresentação (Outras Formas) no (a) X ENCUENTRO NACIONAL DE ESTUDIANTES DE QUIMICA, 2004. (Encontro). Clonación y Localización de una Beta Anhidrasa Carbónica a Partir del Vector Africano de Malaria (*Anopheles gambiae*) y del Vector Suramericano de Fiebre Amarilla (*Stegomyia aegypti*).

20. VI CONGRESO NACIONAL ESTUDIANTIL DE QUIMICA PURA Y APLICADA, 2003. (Congresso).

Organização de evento

1. VELÁSQUEZ, A. M. A. I SEMANA INTERNACIONAL DE FITOTERAPIA DE ARARAQUARA - SP, 2012. (Outro, Organização de evento). *Áreas do conhecimento: FITOTERAPIA. Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários.*

2. ARENAS VELÁSQUEZ, A. M. XL Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, 2005. (Congresso, Organização de evento). *Referências adicionais: Colômbia/Espanhol. Meio de divulgação: Impresso.*

3. ARENAS VELÁSQUEZ, A. M. VI CONGRESO NACIONAL ESTUDIANTIL DE QUIMICA PURA Y APLICADA, 2003. (Congresso, Organização de evento). *Áreas do conhecimento: Química, Referências adicionais: Colômbia/Espanhol. Meio de divulgação: Vários.*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus pelas oportunidades que me dá cada dia, por me dar força, paciência e perseverança; por cuidar de minha família em minha ausência e pela felicidade concedida neste tempo.

Aos meus pais, Dora e Mauro, por serem meu motor, ensinarem-me a lutar pelos meus sonhos, fazendo de mim uma pessoa com a capacidade de decidir e por brindarem-me as ferramentas para sair ao mundo e fazer as coisas certas.

Aos meus familiares e amigos na Colômbia, os quais não podem acompanhar-me agora, momento no qual começa a ser realidade parte de minhas metas. A minha avó María e minha irmã Dora, a meus sobrinhos Cristopher e Gabriela por brindar-me seu apoio à distância...

“Tal vez en el dinero encuentres un poco de felicidad, en las amistades encuentres alegrías, en las medicinas la cura para tu enfermedad, pero el amor solo lo encontraras en tu familia”...

A Elsa Maria Materon por sua longa amizade, por incentivar-me neste caminho, por persistir na ideia de que o Brasil tinha para mim grandes oportunidades para me fazer melhor profissional...

“Cuando crezcas, descubrirás que ya defendiste mentiras, te engañaste a ti mismo o sufriste por tonterías. Si eres un buen guerrero, no te culparás por ello, pero tampoco dejarás que tus errores se repitan”...

A minhas amigas e colegas na Colômbia, especialmente a Debora Cobo Naundorf que sempre está “on-line” para me ajudar e dar-me forças...

“El espíritu olvida todos los sufrimientos cuando la tristeza tiene compañía y amistad que la consuele”...

Agradeço também a todos os companheiros e amigos de Araraquara que dia a dia me fortaleceram, apoiaram e compartilharam comigo alegrias e tristezas, logrando que eu me sentisse como em casa; obrigada a Islene, Anayza, Olivia, Michel, Bea, Pri, Jessica, Kelly... Enfim, a todas as pessoas que fizeram parte da construção deste trabalho de algum modo, seja dentro de um laboratório ou do lado de fora, sempre me apoiando e me incentivando...

“Sê

Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,

Sê um arbusto no vale, mas sê

O melhor arbusto à margem do regato.

Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.

Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva

E dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser uma estrada,

Sê apenas uma senda,

Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.

Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...

Mas sê o melhor no que quer que seja”...

Pablo Neruda

E, finalmente, ao Willian Campos Ribeiro, muitas são as palavras que poderiam descrever a felicidade que você me brinda e a vontade que você me desperta para melhorar em todos os aspectos da minha vida... mas tem uma frase que resume tudo e que você ajudou-me a construir...

“Mi Fe en todas las cosechas del futuro se afirma en el presente... porque Eu amo tudo por inteiro e não pela metade”...

Obrigada!

AGRADECIMIENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, pela confiança, incentivo e apoio. Obrigada por ter compartilhado os seus conhecimentos profissionais. Muito obrigada pela oportunidade!

Agradeço ao Instituto de Química e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP pela oportunidade de desenvolver este trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto;

Aos funcionários da pós-graduação e da biblioteca, pelos serviços prestados e pela atenção;

Ao Marco Túlio Alves da Silva, por sua colaboração e ensino nas técnicas;

À equipe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, em especial ao Danilo Rodrigues pelo trabalho em conjunto, a amizade, as conversas e os gratos momentos; às colegas, Flávia Silva e Lis Velosa, pelo auxílio técnico e pela amizade, a Andrea, Bianca, Cris e Danilo B. por fazer do laboratório um lugar agradável.

À equipe da Profa. Dra. Vera Lucia Isaac pelo trabalho em conjunto no desenvolvimento do trabalho, em especial a Bruna Chiari pela colaboração com as HepG2, paciência e apoio técnico.

*“La imaginación
es más importante que el conocimiento”*
Albert Einstein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 TRIPANOSSOMÍASE AFRICANA OU DOENÇA DO SONO	19
1.1.1 Ciclo biológico.....	19
1.1.2 Diagnóstico clínico e laboratorial	21
1.1.3 Sintomatologia e terapêutica.....	21
1.2 FERROCENO	24
1.3 1,4-NAFTOQUINONAS.....	26
1.4 CIS E TRANS-SPLICING.....	28
1.5 INTERFERÊNCIAS NA FORMAÇÃO DE RNA DA α -TUBULINA	31
1.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
2 OBJETIVO.....	33
2.1 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 MATERIAIS.....	34
3.1.1 Cultura dos parasitas.....	34
3.1.2 Derivados de diaminas de ferroceno e 1,4-naftoquinonas	35
3.2 MÉTODO COLORIMÉTRICO DE MTT.....	36
3.3 CÁLCULO DO SAFETY INDEX (SI)	39
3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	39
3.5 REAÇÃO DE RT-PCR UTILIZANDO O KIT 3' RACE SYSTEM FOR RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS	41
3.5.1 Visualização dos produtos da reação de PCR em Gel de agarose 1,5%.....	45
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DE DIAMINAS DE FERROCENO E 1,4-NAFTOQUINONAS.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 IC ₅₀ DOS DERIVADOS DE BENZIL DIAMINAS E DIAMINAS DE FERROCENO.....	47
4.2 DERIVADOS DE 1,4-NAFTOQUINONAS	53
4.3 ALTERAÇÕES NA PRODUÇÃO DOS RNAs DA REAÇÃO DE TRANS-SPLICING	58
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
6 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS	67

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo biológico da transmissão da doença do sono.....	20
Figura 2. Processos de óxido-redução envolvendo o ferroceno no meio biológico (NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo; GSH: glutatona).....	25
Figura 3. Formação do correspondente radical-ânion ou diânion da quinona pela capacidade de aceitar 1 ou 2 elétrons, e a suas propriedades ácido-base.....	27
Figura 4. Comparação entre os mecanismos de <i>cis</i> (A) e <i>trans-splicing</i> (B). As duas reações de transesterificação se mostram na figura. Os sítios 5' (GU) e 3' (AG) de <i>splice</i> e a sequência BP estão indicadas. BP: <i>Branch point</i> ; PPT: <i>Polypyrimidine tract</i> ; SL: <i>Spliced leader</i> ; SS: <i>Splice site</i>	29
Figura 5. Sínteses de derivados de benzil diaminas e diaminas de ferroceno com possível atividade tripanocida.	35
Figura 6. Sínteses de derivados de 1,4-naftoquinonas com possível atividade tripanocida.	36
Figura 7. Teste colorimétrico (MTT). A. Microscópio para contagem do número de parasitas em câmara de Neubauer; B. Homogeneização das substâncias em DMSO; C. Diluição das substâncias; D. Montagem da placa (parasitas + substância); E. Incubação da placa de 96 poços por 24 horas em BOD; F. Aplicação do MTT/PMS; G. Visualização final da placa após a adição de SDS-HCl; H. Leitura da absorbância no espectrofotômetro (Leitor de placa de ELISA); I. Cálculo do IC ₅₀ com software Origin 7.0.....	37
Figura 8. Curva de crescimento de <i>T. brucei</i> 427. Azul: cultura de parasitas tratadas com a pentamidina, fármaco utilizado no tratamento da doença do sono. Vermelho: cultura de parasitas não tratadas.....	40
Figura 9. Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional da reação de <i>trans-splicing</i> . Para avaliação do processamento da α -tubulina, TS2 se liga em outra região do éxon de α -tubulina, enquanto TS1 anela-se tanto no SL éxon quanto no éxon de α -tubulina (α -tub). TS3 e TS4 anelam-se na região intergênica e no éxon ainda não processados do transcrito de α -tubulina (pré- α -tub). <i>E</i> e <i>I</i> são as siglas para éxon e região intergênica, respectivamente.	42
Figura 10. Sequência da alfa tubulina não processada (pré- α -tub, 218 bp). Número de acesso: NC_008409. PPT: <i>track</i> de polipirimidina, SS: sítio de <i>splicing</i>	43
Figura 11. Sequência alfa tubulina processada (α -tub, 871 bp). Número de acesso: NC_008409. PPT: <i>track</i> de polipirimidina, SS: sítio de <i>splicing</i>	44
Figura 12. Sequência de nucleotídeos do gene 7SL RNA (123 bp) de Trypanosoma (105-536 7SL) e da fita não codificadora do fragmento <i>AluI</i> DNA de kTB273 utilizada por Michaelis e colaboradores (1992) para a clonagem do gene 7SL.....	44
Figura 13. Diminuição da atividade tripanocida da série de derivados de diaminas de ferroceno e benzil diaminas com IC ₅₀ menor do que a pentamidina.	51
Figura 14. Diminuição da atividade tripanocida da série de derivados de 1,4-naftoquinonas com IC ₅₀ menor ou próximo da pentamidina.	58
Figura 15. Gel de agarose 1,5% com BrEt. A) Amplificação da forma processada da alfa-tubulina (α -tub; TS1/TS2) utilizando o <i>Adapter Primer</i> . 1. <i>GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder</i> (Fermentas); 2. Diamina de ferroceno (Fc); 3. Pentamidina (Pent.); 4. Sem substância (C+) 5. Derivado de 1,4-naftoquinona (Naft.); SL: 6. Fc; 7. Pent.; 8. C+; 9. Naft.; pré- α -tub: 10. Fc; 11. Pent.; 12. C+; 13. Naft. B) Amplificação das formas não processadas de <i>Spliced Leader</i> - SL (7SL_S/7SL_AS) e pré- α -tub (TS3/TS4) utilizando o <i>Random Hexamer Primer</i> . 1. <i>GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder</i> (Fermentas); 2. C+; 3. Pent.; 4. Fc; 5. Naft.; 6. C+; 7. Pent.; 8. Fc; 9. Naft.; 10. Controle negativo. As setas indicam aumento (↑) e diminuição (↓) da forma do mRNA maduro da α -tub. O tamanho das bandas está indicado.....	59

Figura 16. A) Gel de agarose 1,5% com BrEt. 1. *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas); *Spliced Leader (7SL_S/7SL_AS)*: 2. Sem substância (Controle +), 3. Pentamidina, 4. Diamina de ferroceno, 5. Derivado de 1,4-naftoquinona; α -tub (processada, TS1/TS2): 6. Sem substância, 7. Pentamidina, 8. Diamina de ferroceno, 9. Derivado de 1,4-naftoquinona; pré- α -tub (não processada, TS3/TS4): 10. Sem substância, 11. Pentamidina, 12. Diamina de ferroceno, 13. Derivado de 1,4-naftoquinona; 14. Controle negativo (TS1/TS2). B) Detalhe dos produtos obtidos na figura A indicando aumento ($\uparrow$) ou diminuição ($\downarrow$) dos RNAs amplificados, comparativamente ao controle (C+). C+: Controle positivo - cultura não tratada; Pent.: Cultura tratada com pentamidina; Fc: Cultura tratada com derivado de diamina de ferroceno; Naft.: Cultura tratada com derivado de 1,4-naftoquinona. 60

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resumo dos sintomas da doença do sono e dos fármacos disponíveis para o tratamento dos diferentes estágios da doença.....	22
Tabela 2. Informação geral dos fármacos utilizados para o tratamento da doença do sono. *suramina também é utilizada no estágio II da doença.....	23
Tabela 3. Características das cepas de <i>Trypanosoma brucei</i> utilizadas.	34
Tabela 4. Iniciadores utilizados na reação de RT-PCR.	41
Tabela 5. Atividade tripanocida e índice de segurança de benzil diaminas e diaminas de ferroceno. ^a IC ₅₀ (μM), ^b SI: <i>Safety Index</i> , os valores de SI>10 (PASSERINI, 2008) observam-se em negrito.	48
Tabela 6. Atividade tripanocida e índice de segurança de derivados de 1,4-naftoquinonas. ^a IC ₅₀ (μM), ^b SI: <i>Safety Index</i> , os valores de SI>10 observam-se em negrito (PASSERINI, 2008), NA: não apresentou atividade.	54
Tabela 7. Atividade antioxidante de derivados de diamina de ferroceno e 1,4-naftoquinonas.....	63
Tabela 8. Comparação entre o derivado de diamina de ferroceno e 1,4-naftoquinona com potencial atividade tripanocida.	65

Resumo

Trypanosoma brucei é o agente etiológico da tripanossomíase africana ou doença do sono, transmitida por dípteros do gênero *Glossina*, conhecidos como moscas tsé-tsé. O diagnóstico e tratamento da doença não são satisfatórios, uma vez que para o tratamento está disponível um número de drogas altamente tóxicas e com um efeito limitado, pois dependem da fase da doença, das condições fisiológicas do hospedeiro, da suscetibilidade e variabilidade genética da cepa. Além do alto custo, o tratamento é potencialmente perigoso e está limitado ao surgimento de resistência generalizada aos fármacos utilizados. O diagnóstico é limitado à associação dos sintomas com a doença, muitas vezes é confundido com outras doenças pelo que o paciente não recebe o tratamento adequado. Por isso, tem-se a necessidade de buscar novos fármacos com melhor atividade tripanocida. Neste trabalho, avaliou-se a atividade tripanocida de 38 compostos diferentes e inéditos, como N1,N2-dibenziletano-1,2-diamina (cloridratos de benzil diaminas), N1-benzil,N2-metilferroceniletano-1,2-diamina (cloridratos de diaminas de ferroceno), 2-metoxi/hidroxi-3-(1-alquenil)-1,4-naftoquinonas e seus derivados 2-amina-1,4-naftoquinonas contra as cepas 427 e 29-13 de *T. brucei*. A eficácia dos compostos foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]. Os resultados encontrados foram similares aos das atividades metabólicas das células (parasitas e/ou células HepG2 - linhagem de células de hepatoma, usada como modelo para simular funções hepáticas humanas *in vitro*), sendo o IC₅₀ (metade da concentração inibitória máxima) calculado por regressão linear para cada composto. Da série anterior, o composto cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina e 2-metoxi-3-(2-feniletetil)-1,4-naftoquinona apresentaram a melhor atividade tripanocida e índice de segurança e, portanto, foram utilizados para avaliar as alterações na produção dos mRNAs na reação de *trans-splicing* usando como modelo o gene da α -tubulina de *T. brucei*; encontrando que ambos os compostos interferem na produção dos mRNAs. Adicionalmente, realizou-se a avaliação da atividade antioxidante destes dois compostos.

Palavras chaves: *Trypanosoma brucei*, doença do sono, diaminas de ferroceno, 1,4-naftoquinonas, MTT, *trans-splicing*, α -tubulina.

ABSTRACT

Trypanosoma brucei is the etiologic agent of sleeping sickness (Human African Trypanosomiasis [HAT]), transmitted by flies of *Glossina* genus, known as *tsetse* flies. The diagnostic and treatment of this disease are not satisfactory, since the treatment uses many toxicity drugs with limited effects, because depend on the stage of the disease, morphological diversity, heterogeneous biological behaviour, different clinical courses and the virulence appears to be an intrinsic property of each strain and high genetic variability. Besides the high cost, the treatment is potentially dangerous and limited the emergence of widespread drug resistance. The diagnosis is limited to the association of symptoms with the disease, is often confused with other diseases so the patient does not receive adequate treatment. Thus, the development of new research is necessary in order to generate new drugs with trypanocidal activity. In this work, we evaluated the trypanocidal activity of 38 inedited compounds of *N1,N2*-dibenzylethane-1,2-diamine hydrochlorides, *N1*-benzyl,*N2*-methyferrocenylethane-1,2-diamine hydrochlorides, 2-metoxy/hydroxy-3-(1-alquenyl)-1,4-naphtoquinones and amine derivatives of this compounds (2-amine-1,4-naphtoquinones) against 427 and 29-13 *T. brucei* parasite strains. The efficacy of these compounds was also measured using the reduction of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. The results were similar to the metabolic activity of cells (parasites and/or HepG2 - hepatoma cell line used as a model to simulate human hepatic functions *in vitro*), being the IC₅₀ (half of the maximum inhibitory concentration) calculated by linear regression for each sample. The compounds N-(ferrocenylmetyl)-N'-(4-metoxybenzyl)ethane-1,2-diamine) hydrochlorides and 2-metoxy-3-(2-phenylethenyl)-1,4-naphtoquinone were the best trypanocidal activity and safety index. Therefore, these compounds were use in the study of mRNAs alteration production in the trans-splicing reaction with *T. brucei* α -tubulin gene as a model. Where we found both compounds interfere in the production of mRNAs. Additionally, we made the evaluation of antioxidant activity of this compound.

Key words: *Trypanosoma brucei*, sleeping sickness, ferrocenyl diamines, 1,4-naphtoquinones, MTT, trans-splicing, α -tubulina.

1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças causadas por protozoários atingem milhões de pessoas no mundo, afetando países que não possuem infraestrutura ou recursos para realizar um combate efetivo contra estas doenças, denominadas de doenças negligenciadas.

Durante muitos anos, vários pesquisadores no mundo tem somado esforços para desenvolver diversas maneiras para combater essas doenças, estudando:

- i) os parasitas causadores das doenças,
- ii) os efeitos apresentados nos seres humanos pelo contágio e
- iii) a forma de evitar a transmissão por meio de vetores.

A prevenção das doenças parasitárias depende da associação de diversos fatores que envolvem medidas ecológicas e sanitárias e o emprego de fármacos mais eficazes e seguros (FRAYHA et al., 1997).

Para que os tratamentos sejam eficazes, é necessário possuir um conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia dos parasitas. Aproveitando o avanço tecnológico e científico, tornou-se possível a realização de diversos processos encaminhados ao planejamento de fármacos com o intuito de atingir alvos específicos e essenciais nos parasitas, procurando minimizar os efeitos colaterais das substâncias no homem. Portanto, neste trabalho, avaliaram-se várias séries de substâncias inéditas, derivados de benzil diaminas, diaminas de ferroceno, 2-metoxi/hidroxí-1,4-naftoquinonas e 2-amino-1,4-naftoquinonas, que apresentaram atividade tripanocida em cepas de *Trypanosoma brucei*.

Realizou-se também a avaliação da atividade destes derivados na reação de *trans-splicing* dos parasitas utilizando como modelo o gene da α -tubulina, para averiguar os possíveis mecanismos de ação destes compostos no processamento de RNAs nos tripanossomatídeos. Adicionalmente, avaliou-se a atividade antioxidante destes compostos para elucidar seu possível poder como agente oxidante.

1.1 Tripanossomíase Africana ou Doença do Sono

A tripanossomíase africana ou doença do sono, descoberta por David Bruce na África em 1894, é causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Em 1902, após a observação de tripanossomos no sangue de um paciente pelo cirurgião R. M. Forde, J. E. Dutton identificou e descreveu o *T. gambiense* (atualmente *T. b. gambiense*). Mais tarde, em 1910, o *T. rhodesiense* (atualmente *T. b. rhodesiense*) foi descrito por Stevens e Fantham. Inicialmente, subespécies relacionadas ao *Trypanosoma brucei brucei* foram associadas às doenças em gado, encontrando-se também em animais domésticos e selvagens, denominando a doença como Nagana (COX, 2004).

A Organização Mundial da Saúde, OMS, (WHO, da sigla em inglês para *World Health Organization*) reporta que *T. b. gambiense* causa 95% dos casos da doença do sono. Em 2009, após 50 anos de contínuos controles, o número de casos apresentados foi de aproximadamente 10.000 (WORLD..., 2012). Esta tendência foi mantida em 2010 com 7.139 novos casos. Atualmente estima-se que o número de casos é de 30.000. *Medecins Sans Frontieres* (MSF), organização médica internacional humanitária, atendeu mais de 1.700 pacientes com doença do sono em 2007. Cerca de 60 milhões de pessoas vivem em áreas de risco e estima-se que 70.000 estão infectadas (MSF, 2010).

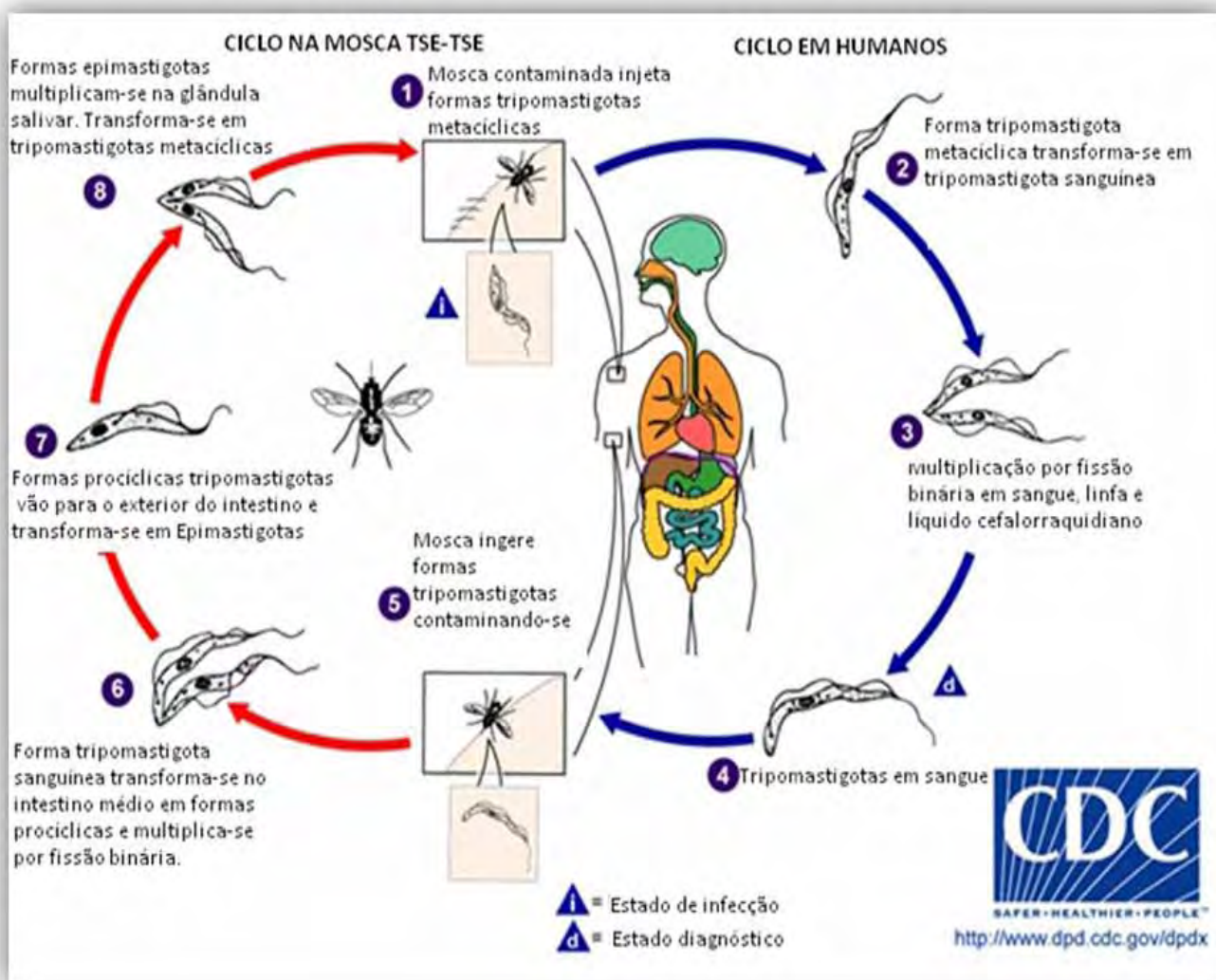
1.1.1 Ciclo biológico

A doença do sono é transmitida por dípteros do gênero *Glossina* conhecidos como moscas tsé-tsé. Após a picada do hospedeiro pela mosca, os tripanossomos metacíclicos são inoculados na corrente sanguínea, onde os parasitas se diferenciam na forma tripomastigota sanguínea, multiplicando-se por fissão binária e espalhando-se pela corrente sanguínea podendo atingir o sistema nervoso central (SNC). Na fase crônica da doença, os tripomastigotas presentes no SNC multiplicam-se e passam ao cérebro (PEREIRA; PÉREZ, 2003).

Outra mosca pode picar o hospedeiro ingerindo formas tripomastigotas, contaminando-se. As formas tripomastigotas diferenciam-se em formas procíclicas

dentro da mosca e logo em epimastigotas que se multiplicam na glândula salivar do inseto. Em seguida, essas formas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas e o ciclo inicia-se novamente, como apresentado na figura 1.

Figura 1. Ciclo biológico da transmissão da doença do sono.



Fonte: Adaptado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:AfrTryp_LifeCycle.gif (07/08/2012).

Os tripanossomos escapam da resposta imune do hospedeiro quando ocorre a produção de anticorpos devido às VSG (*Variant Surface Glycoprotein* - Glicoproteínas Variantes de Superfície). Cada célula expressa apenas uma VSG por vez dos mais de 1.000 genes que expressam estas proteínas presentes na membrana do parasita. No hospedeiro, o sistema imunológico detecta grande parte dos parasitas que expressam a glicoproteína dominante destruindo-os, mas não a parcela que permutou as proteínas em questão. Os sintomas são temporariamente

interrompidos, porém, como os parasitas que apresentam glicoproteínas distintas em sua membrana não são afetados pelos anticorpos, acabam por multiplicar-se, dando origem a uma nova onda parasitêmica e sintomática. Novamente, ocorre a produção de anticorpos contra a nova glicoproteína dominante que passam a destruir boa parte dos parasitas, deixando apenas os que já permutaram a glicoproteína novamente, e assim por diante (HORN; McCULLOCH, 2010).

1.1.2 Diagnóstico clínico e laboratorial

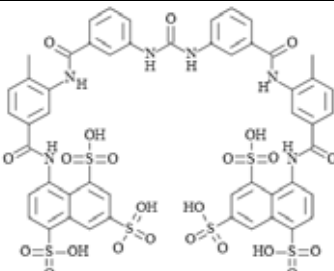
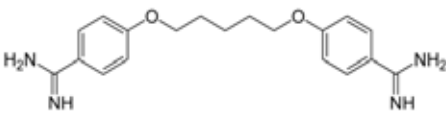
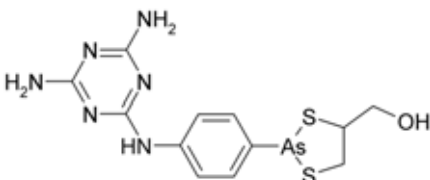
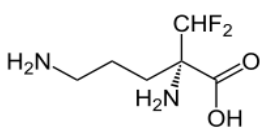
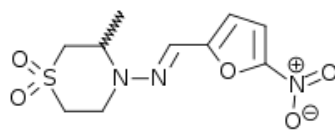
O diagnóstico da doença do sono é feito pela observação dos sinais clínicos, localização geográfica do paciente e exames laboratoriais. A determinação de *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense* é de fundamental importância para o tratamento. O diagnóstico laboratorial compreende os métodos parasitológicos: lâmina corada de sangue, em especial para *T. b. rhodesiense*, já que os pacientes com esta espécie possuem uma alta parasitemia em comparação com os pacientes com *T. b. gambiense*; lâmina corada de punção do gânglio, para *T. b. gambiense*; exame do fluido cérebro-espinhal para a fase crônica; testes imunológicos (Hemaglutinação, IFI e ELISA) e moléculares (PCR) (KENNEDY, 2004).

Com o aumento da resistência aos medicamentos, o diagnóstico e a determinação do estágio da doença são cruciais. A OMS recomenda realizar controles aos pacientes aos 3, 6, 12, 18 e 24 meses após o tratamento. Na coleta do fluido cérebro-espinhal, após a centrifugação, realiza-se a contagem de tripanossomos vs. glóbulos brancos, em que pacientes com 5 células/mL ou menos, após 6 meses do tratamento, não requerem mais testes. Pacientes com 50 células/mL ou mais tripanossomos presentes no fluido cérebro-espinhal são considerados com tratamento falido (BRUN; BLUM, 2012).

1.1.3 Sintomatologia e terapêutica

A sintomatologia da doença do sono pode ser variada, mas existem dois estágios clínicos que podem ser reconhecidos durante a infecção: o estágio hemolinfático inicial (estágio I) e o estágio encefálico tardio (estágio II). O resumo dos sintomas está apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Resumo dos sintomas da doença do sono e dos fármacos disponíveis para o tratamento dos diferentes estágios da doença.

SINTOMAS DA DOENÇA DO SONO	
ESTÁGIO I	ESTÁGIO II
• Tripanossomíase sistêmica, sem envolver o sistema nervoso central (SNC). • Invasão dos nódulos linfáticos • Febres irregulares • Sudoração noturna • Dor da cabeça • Anorexia • Inchaço do baço e fígado	• Tripomastigotas presentes em lóbulo frontal, ponte do tronco cerebral e medula. • Meningoencefalite • Apatia • Confusão • Fadiga • Perda de coordenação • Sonolência • Coma profundo
DIAGNÓSTICO	
• Difícil detecção • Anos contínuos até aparição da doença do sono (<i>T. b. gambiense</i>) • Curta duração, aproximadamente 1 ano (<i>T. b. rhodesiense</i>)	• Detecção imediata
MEDICAMENTOS UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO	
 suramina  pentamidina	suramina  melarsoprol  eflornitina  nifurtimox

Fonte: adaptado de Garcia (2001).

O tratamento no estágio I da doença do sono é realizado com suramina e pentamidina. Na fase neurológica o melarsoprol é ativo para *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* enquanto que a eflornitina só tem ação no *T. b. gambiense*, conforme pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2. Informação geral dos fármacos utilizados para o tratamento da doença do sono.
*suramina também é utilizada no estágio II da doença.

ESTÁGIO I			ESTÁGIO II*		
MEDICAMENTO	suramina*	pentamidina	eflornitina	melarsoprol	nifurtimox
PARASITAS	<i>T. rhodesiense</i>	<i>T. gambiense</i>	<i>T. gambiense</i>	<i>T. gambiense</i> <i>T. rhodesiense</i>	<i>T. gambiense</i>
EFETIVIDADE	> 90%	94%	> 80%	50%	< 90%
EFEITOS COLATERAIS	• Náuseas • Vômito • Prurido • Edema • Hepatite • Perda de consciência	• Náuseas • Vômito • Tremores • Febre • Hipotensão	• Anemia • Diarréia	• Náuseas • Vômito • Encefalopatia • Dermatite esfoliante	• Confusão • Tremor • Vertigem • Anorexia • Perda de peso
INFORMAÇÕES ADICIONAIS	• Intravenoso. Contraindicado para pacientes com insuficiência renal.	• Intramuscular. Indicado só no início do estágio II.	• Intravenoso e Oral. Não disponível no mercado. Uso prolongado.	• Intravenoso. Derivado do arsênio, tóxico. Deve-se combinar com prednisolona.	• Oral. Pacientes sem resposta ao melarsoprol.

Fonte: adaptado de Garcia (2001).

Além do alto custo, estes fármacos são altamente tóxicos e escassos; o tratamento é potencialmente perigoso e limitado e os parasitas apresentam resistência generalizada aos medicamentos (NOK, 2003; MONZOTE; GILLE, 2011; STICH et al., 2002).

O principal problema com o tratamento da doença do sono está no estágio II, em que os tripanossomos residem no fluido cérebro-espinhal. Neste estágio, os fármacos para o tratamento da doença têm que ter a habilidade de cruzar a barreira hematoencefálica. Só o melarsoprol (composto altamente tóxico baseado em arsênio) mostra a habilidade de cruzar a barreira hematoencefálica, além de possuir ação sobre as duas espécies, *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* (NOK, 2003).

Atualmente existem diversos compostos reportados na literatura que apresentam atividade antiviral, bactericida, anticancerígena, antimalárica, antifúngica, moluscicida e que também, tem demonstrado apresentar atividade

tripanocida (LEGROS et al., 2002; CAMARA et al., 2008; FRANCISCO; VARGAS, 2010; SHIBATA et al., 2011; LÓPEZ et al., 2011). Várias destas moléculas são derivados de diaminas e naftoquinonas, portanto estes tipos de moléculas podem ser utilizadas como base para o desenvolvimento e estudo de novos derivados com atividade tripanocida como é o nosso caso, no qual foram avaliadas umas séries de compostos do tipo benzil diaminas, diaminas de ferroceno e derivados de 1,4-naftoquinonas.

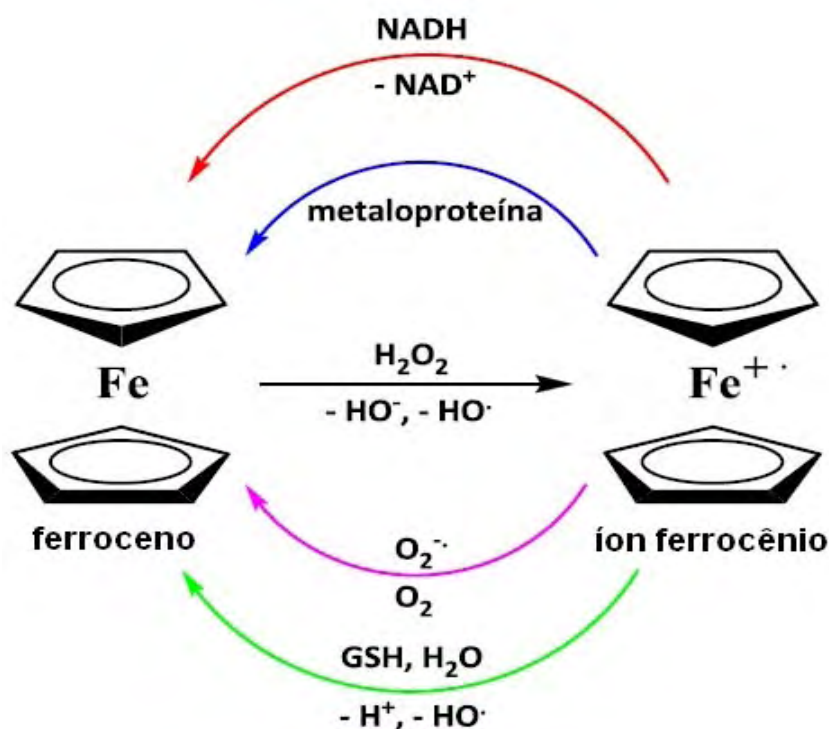
1.2 Ferroceno

Diversos autores referem que a adição de metais de transição nas estruturas de alguns fármacos melhora a atividade biológica dos compostos (JAOUEN; VESSIERES, 1993; SCHATZSCHNEIDER; METZLER-NOLTE, 2006).

Este é o caso do ferroceno (VAN STAVEREN; METZLER-NOLTE, 2004), um composto não tóxico e estável (BIOT et al., 1997) que pode ser denominado por $\text{di}(\eta^5\text{-ciclopentadienil})$ ferro (II), composto no qual o metal de transição, neste caso o ferro, está ligado a dois anéis aromáticos (ciclopentadienil, benzeno ou cicloheptatrienil). O átomo de ferro está entre os dois anéis e perpendicularmente ao plano dos anéis. Todos os elétrons na camada de valência do ferroceno estão pareados sendo oxidados na forma do cátion ferrocênio. O cátion ferrocênio pode formar radicais hidroxila que causam dano no DNA, sendo este o responsável pelo efeito citotóxico do sal de ferroceno, embora o mecanismo exato de citotoxicidade não tenha sido estudado em detalhe. O grupo ferrocenil também possui afinidade para ligar-se a nucleotídeos do DNA pelo grupo fosfato (NAVARRO et al., 2004). Pode-se sugerir que o ferroceno não afeta diretamente o DNA e que o ataque seja devido à formação de espécies reativas de oxigênio, como os radicais livres hidroxila formados pela redução do grupo ferrocenil (NEUSE, 2005).

A utilização do grupo ferrocenil (Fc, derivado do ferroceno) como grupo farmacofórico vem sendo bastante explorada, já que exhibe interessantes propriedades de oxi-redução, as quais se devem à sua capacidade de sofrer oxidação reversível, com a geração de espécies do tipo cátion-radical-íon ferrocênio (agente redutor), como apresentado na figura 2.

Figura 2. Processos de óxido-redução envolvendo o ferroceno no meio biológico (NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo; GSH: glutatona).



Fonte: adaptado de Francisco; Vargas (2010, p. 123).

A redução do íon ferrocênio a ferroceno no meio biológico pode ocorrer por diversos caminhos:

- i) pela ação controladora do pH do ânion radical superóxido, gerado fotoliticamente, sendo este convertido no sistema a O_2 ;
- ii) pela oxidação de metaloproteínas, tais como plastocianina ou ferrocitocromo c e do NAD a NAD^+ ;
- iii) por meio da formação do radical hidroxila na presença da glutatona, GSH (FRANCISCO; VARGAS, 2010).

A adição do grupo ferrocenil em fármacos com atividade contra o câncer de mama melhora a atividade citotóxica desses compostos nas células cancerígenas (NEUSE, 2005; HILLARD et al., 2006; HEILMANN et al., 2008) pela formação de complexos com a Topoisomerase II o que leva à morte das células neoplásicas. Isto acontece porque o grupo ferrocenil (derivado do ferroceno) é oxidado no meio biológico pelo peróxido de hidrogênio na presença da enzima peroxidase, formando complexos conhecidos como complexos de transferência de carga com proteínas com grupos doadores, tal como o triptofano (SAI-KRISHNA et al., 2005), mostrando

também que apresenta atividade antimicrobacteriana - *Mycobacterium tuberculosis* (RALAMBOMANANA et al., 2008) e antimalárica - *Plasmodium* spp. (BIOT et al., 1997; DOMARLE et al., 1998; DELHAES et al., 2001). Atualmente existem compostos contendo o grupo ferrocenil que podem ter atividade antimalárica. Um exemplo é a ferroquina, que inibe o crescimento do *Plasmodium falciparum*, o qual foi gerado como resultado da observação de que o parasita apresentava resistência à cloroquina. Como o parasita requer de sangue para viver, a estratégia foi combinar a cloroquina com ferroceno, que contém o ferro necessário para produzir hemoglobina. Porém, a ferroquina é muito mais eficaz que a cloroquina e não permite o desenvolvimento de resistência (FRANCISCO; VARGAS, 2010).

Neste trabalho, avaliou-se uma série de compostos inéditos derivados de benzil diaminas e diaminas de ferroceno que apresentaram atividade tripanocida nas cepas de *T. brucei* 427 e 29-13. Encontrando-se resultados interessantes com as diaminas de ferroceno. Utilizou-se o composto com melhor atividade tripanocida e índice de segurança (SI: *safety index*) maior que 10 para avaliar sua possível interferência no mecanismo de *trans-splicing* no parasita, usando como modelo o gene α -tubulina de *T. brucei*.

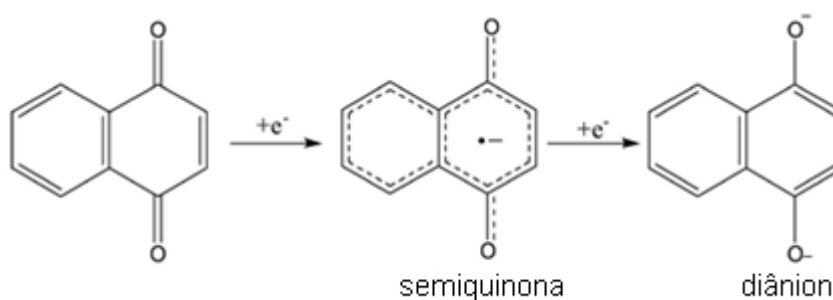
1.3 1,4-naftoquinonas

Outros compostos amplamente estudados com atividade biológica sobre diversos parasitas como *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp. e *Toxoplasma* spp. são as naftoquinonas (TEIXEIRA et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2006; SALMON-CHEMIN et al., 2001).

Em geral, as quinonas (incluindo as naftoquinonas) são substâncias de grande interesse em variados estudos farmacológicos devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, destacando-se como: antiparasitários (ex. *P. falciparum*, *Schistosoma* sp.) (KAPADIA et al., 2001; SILVA et al., 2003; LIMA et al., 2002), antibacterianos, anticancerígenos (FRANCISCO et al., 2010) e antifúngicos (LÓPEZ et al., 2011).

As naftoquinonas estão presentes em várias famílias de plantas e servem como ligação vital na cadeia de transporte de elétrons nas vias metabólicas, participando em múltiplos processos biológicos oxidativos (PINTO; De CASTRO, 2009). Além disso, as naftoquinonas possuem como característica estrutural dois grupos carbonila na posição 1,4 e com menor frequência na posição 1,2 e 1,3 no anel de naftaleno. A atividade biológica das estruturas encontra-se associada às suas propriedades de óxido-redução e ácido-base, explicada com base na capacidade de aceitar 1 ou 2 elétrons para formar seu correspondente ânion-radical ou diânion. Estas propriedades dependem diretamente de sua estrutura química e da natureza eletrônica dos grupos que substituem o núcleo naftoquinona. Tem sido descrito que a toxicidade destas moléculas é ocasionada por dois mecanismos principais: i) geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou ii) mediante a formação de aductos com macromoléculas como o DNA e as proteínas. Em condições fisiológicas, as naftoquinonas podem experimentar uma redução não enzimática. Ao ganhar 1 elétron, mediante a transferência eletrônica de um radical apropriado, é gerada a semiquinona, uma espécie de moderada toxicidade, conforme apresenta a figura 3 (LOPÉZ et al., 2011).

Figura 3. Formação do correspondente radical-ânion ou diânion da quinona pela capacidade de aceitar 1 ou 2 elétrons, e a suas propriedades ácido-base.



Fonte: López et al., (2011, p. 13).

A toxicidade das naftoquinonas e seus derivados também está relacionada com a lipofilicidade dos substituintes do anel farmacóforo da 1,4-naftoquinona quando estes interagem com a membrana celular microbiana ou com ácidos nucleicos mediante a intercalação de sua parte 1,4-naftoquinona entre os pares de bases da dupla hélice do DNA, com a consequente inibição na replicação e

transcrição, ambos processos envolvidos em funções determinantes na viabilidade celular. Outras pesquisas centram-se no mecanismo de ação da cadeia respiratória mitocondrial dos parasitas sensíveis entre o citocromo B e o C1 do complexo III. (LÓPEZ et al., 2011).

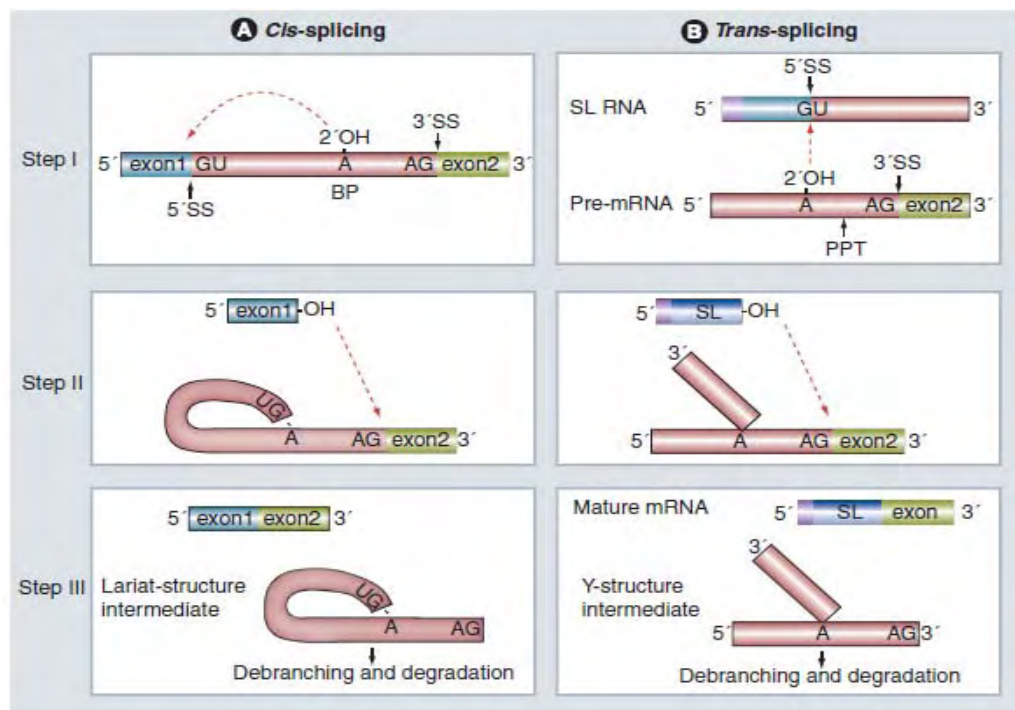
Vários derivados das naftoquinonas apresentam atividade antimalárica contra *P. falciparum* (KAPADIA et al., 2001). Outros parasitas susceptíveis a naftoquinonas são *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp. e *Toxoplasma* spp. Derivados de 1,4-naftoquinona com substituição 2 e 3 por diferentes aminas apresentam atividade contra *Trypanosoma cruzi*. A naftoquinona hidroxilada 2-hidroxi-3-(1-propen-3-fenil)-1,4-naftoquinona reporta-se com atividade antiparasitária contra *Toxoplasma gondii* (LÓPEZ et al., 2011).

Neste trabalho, avaliou-se uma série de compostos inéditos derivados de 2-metoxi/hidroxi-1,4-naftoquinona e 2-amino-1,4-naftoquinona que apresentaram atividade tripanocida nas cepas de *T. brucei* 427 e 29-13. O composto da série que apresentou melhor atividade tripanocida e índice de segurança (SI: *safety index*) foi utilizado para avaliar sua possível interferência no mecanismo de *trans-splicing* no parasita usando o gene α -tubulina de *T. brucei* como modelo.

1.4 *Cis e Trans-splicing*

A maioria dos genes eucarióticos são expressos na forma de um mRNA precursor, chamado de pré-mRNA, que é convertido em um mRNA maduro pelo mecanismo de *splicing*. Nos eucariotos, cada sequência que codifica para uma proteína é transcrita independentemente, contendo a(s) sequência(s) de íntrons, regiões não codificadoras que serão removidas, e éxons, sequências codificadoras que serão unidas durante o *cis-splicing*. Em tripanossomatídeos os RNAs são processados por um mecanismo não usual denominado *trans-splicing*. As regiões de dois transcritos separados (em lugar de um único pré-mRNA) são unidas de modo que todo o mensageiro maduro inicia com a mesma sequência (aproximadamente 40 nucleotídeos), denominada *spliced leader* (SL) (NILSEN, 1995; TSCHUDI; ULLU, 1990; PERIS et al., 1997; STURM; CAMPBELL, 1999; STURM et al., 1999), como se mostra na figura 4.

Figura 4. Comparação entre os mecanismos de *cis* (A) e *trans-splicing* (B). As duas reações de transesterificação se mostram na figura. Os sites 5' (GU) e 3' (AG) de *splice* e a sequência BP estão indicadas. BP: *Branch point*; PPT: *Polypyrimidine tract*; SL: *Spliced leader*; SS: *Splice site*.



Fonte: Michaeli (2011, p. 460).

Cis-splicing ocorre em duas reações de transesterificação, executadas a partir de um complexo macromolecular conhecido como spliceosomo; uma maquinaria de ribonucleoproteínas, compostas de cinco ribonucleoproteínas (U1, U2, U4/U6 e U5 snRNPs, nomeados de acordo com o snRNA associado) e mais cerca de 300 proteínas associadas (MAYER; FLOETER-WINTER, 2005).

Trans-splicing é uma reação intermolecular de processamento de RNA, onde duas moléculas distintas de RNA são unidas para formar um RNA mensageiro maduro. Nesta reação forma-se uma estrutura Y intermediária análoga ao *lariat* (estrutura em forma de laço) gerado no *cis-splicing* (MICHAELIS, 2011). Os principais componentes da reação no *trans-splicing* são o pré-mRNA, transcritos de forma policistrônica, e um pequeno RNA, chamado de SL (*spliced leader*) RNA, os quais se encontram em moléculas distintas. A sequência que representa a extremidade 5' do SL RNA associa-se ao 3' *splice site* para formar o RNA maduro (ULLU; TSCHUDI 1995). Esta reação de *splicing* intermolecular conserva muitas das

reações do *cis-splicing*, inclui o sítio doador-aceitador (GU–AG) e requer da região de polipirimidina como sítio aceitador (MAYER et al., 2012). A primeira evidência deste tipo de processamento foi obtida em 1982, quando se observou que uma sequência idêntica de 39 nucleotídeos estava sempre presente na extremidade 5' de muitos transcritos de diferentes glicoproteínas de superfície de *Trypanosoma brucei* (ULLU; TSCHUDI 1995).

Em trabalhos realizados no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Parasitas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara, técnicas de PTP-tag foram utilizadas para o estudo de genes que codificam para proteínas hipotéticas de *T. brucei*, sendo possível imunoprecipitar as proteínas: U5-15k, U5-102k, Tb11.02.0465, Tb10.6k15.0680 e Tb927.2.3400, envolvidas no complexo U5 snRNP do *trans-splicing* (AMBROSIO et al., 2009; SILVA et al., 2011). Os clones podem servir de ferramenta de estudo sobre atividade de compostos naturais, semi-naturais e sintéticos nos tripanossomos. Outra abordagem para visualizar possíveis alvos terapêuticos pode ser avaliando interferências no processamento dos RNAs das diversas proteínas envolvidas na reação de *trans-splicing*; uma reação de RT-PCR semi-quantitativa demonstrou que ao longo da indução com doxaciclina o nível do transcrito processado de α -tubulina (banda de aproximadamente 750 pb - α -tub) diminuiu e o da forma não processada (banda de aproximadamente 150 pb - pré- α -tub) foi acumulado (SILVA, 2009).

O processamento de mRNAs pelo mecanismo de *trans-splicing* é uma via exclusiva dos tripanossomatídeos e constitui um potencial alvo terapêutico. Estudos da reação de *trans-splicing* em *T. cruzi*, utilizando sistemas de células permeáveis, demonstraram que o composto hidroximetilnitrofuranol, um nitrofurano capaz de inibir a tripanotiona redutase, leva a uma diminuição nos níveis de mRNAs em *T. cruzi*, sugerindo possível interferência deste composto no processamento de mRNAs (AMBRÓSIO et al., 2004; BARBOSA et al., 2007) sem afetar o processamento de mRNAs das células hospedeiras, que ocorre via *cis-splicing*.

Com base nestes dados, neste trabalho avaliaram-se as alterações no mRNA da α -tubulina do parasita após seu tratamento com os diferentes compostos testados que apresentaram atividade tripanocida.

1.5 Interferências na formação de RNA da α -Tubulina

Os protozoários da família dos tripanossomatídeos possuem dois importantes grupos de microtúbulos que constituem o flagelo do parasita e os microtúbulos subpeliculares. Estes últimos estão distribuídos por todo o corpo celular e encontram-se imediatamente abaixo da membrana plasmática. Os microtúbulos desenvolvem um papel fundamental na manutenção e câmbios na distribuição espacial que estão envolvidos nos processos de diferenciação celular que ocorrem ao longo do ciclo de vida dos tripanossomatídeos. Os componentes principais dos microtúbulos são os heterodímeros de α e β tubulina. Estas proteínas exibem um papel importante na conformação da estrutura intracelular do parasita e nas mudanças da distribuição espacial envolvidas nos processos de diferenciação do ciclo de vida dos tripanossomatídeos (FIOCRUZ, 2012; SOUTO-PADRON et al., 1993). Têm-se citações na literatura nas quais os mecanismos de autorregulação dos mRNAs de α e β tubulina em *T. cruzi* afetam a meia-vida desses transcritos ao longo do ciclo de vida do parasita (SOUTO-PADRON et al., 1993). Portanto, consideram-se constitutivos os genes α -tubulina do parasita.

Assim, neste trabalho fizemos o seguinte questionamento: o processamento do mRNAs de α -tubulina pode ou não ser afetado pelo tratamento das formas procíclicas de *T. brucei* com os derivados das diaminas, diaminas de ferroceno e os derivados de 1,4-naftoquinonas que apresentaram atividade tripanocida?

A resposta encontrou-se avaliando as interferências na formação dos RNAs do transcrito da α -tubulina (forma processada) e da pré- α -tubulina (forma não processada) por meio da reação de RT-PCR geradas pelos compostos com atividade tripanocida testados neste trabalho, em que o gene α -tubulina foi utilizado como modelo de análises para avaliar a interação dos compostos na reação de *trans-splicing*.

1.6 Atividade Antioxidante

Um importante número de espécies de oxigênio altamente reativas, como o oxigênio $^1\text{O}_2$ e $\text{O}^{2\cdot-}$, $\text{OH}\cdot$, $\text{NO}\cdot$ e radicais livres alquil-peroxila, são produzidos geralmente no nosso organismo. Estes podem danificar lipídios, proteínas e DNA e intervir em processos de patogêneses e envelhecimento. De modo geral, os sistemas de defesa fisiológica frente ao dano gerado por estes radicais classificam-se em três categorias (RIVAS; GARCÍA, 2002):

—Antioxidantes que previnem a formação de radicais livres.

—Antioxidantes capturadores de radicais livres, que inibem a iniciação do processo oxidativo ou interferem no processo de propagação.

—Antioxidantes que atuam revertendo o processo de oxidação.

Antioxidantes são substâncias que reagem com radicais livres, impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo e a consequente destruição tegumentar. Entre os antioxidantes mais conhecidos estão às vitaminas, principalmente C e E, e os flavonóides. Por outro lado, existem vários agentes oxidantes, por exemplo, alcaloides capazes de formar radicais semiquinonas e quinonas, responsáveis pela citotoxicidade do alcalóide em vários tipos de células. Além dos alcalóides, muitas outras moléculas são capazes de interferir nos mecanismos de estresse oxidativo (CANSIAN et al., 2010).

Em nosso trabalho, realizou-se a avaliação da atividade antioxidante dos compostos com melhor atividade tripanocida aqui testados, para visualizar, deste modo, possíveis mecanismos de ação.

2 OBJETIVO

Avaliar a atividade tripanocida dos derivados de benzil diaminas, diaminas de ferroceno e 1,4-naftoquinonas em formas procíclicas de *T. brucei* e suas possíveis interferências na reação de *trans-splicing* utilizando o gene da α -tubulina como modelo.

2.1 Estratégias experimentais

- Avaliar a atividade tripanocida dos derivados de benzil diaminas, diaminas de ferroceno e 1,4-naftoquinonas em formas procíclicas das cepas 427 e 29-13 de *T. brucei* por meio do ensaio citotóxico colorimétrico MTT.

- Avaliar por meio da RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*) as alterações na produção do mRNA da α -tubulina (processada) e pré- α -tubulina (não processada) da cepa 427 de *T. brucei* tratada com os compostos que apresentaram a melhor atividade tripanocida e índice de segurança superior a 10.

- Avaliar a atividade antioxidante dos compostos utilizados na reação de RT-PCR que apresentaram atividade tripanocida e índice de segurança superior a 10.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Cultura dos parasitas

Utilizaram-se formas procíclicas de *T. brucei* 427 (CROOS; MANNING, 1973) e 29-13 (WIRTS; CLAYTON, 1995) para a realização dos experimentos por serem formas não infectantes e de fácil manutenção em cultura. Na tabela 3, encontram-se as diferenças entre as duas cepas.

Tabela 3. Características das cepas de *Trypanosoma brucei* utilizadas.

<i>Trypanosoma brucei</i> 427	<i>Trypanosoma brucei</i> 29-13
Cepa virulenta, isolada de uma ovelha em 1960.	Cepa baseada no tipo selvagem <i>T. brucei</i> 427 (geneticamente modificada).
Não completa o ciclo biológico no inseto - vetor. Encontra-se só na forma procíclica no intestino meio da mosca, porém não é transmitida pela mosca tsé-tsé aos humanos.	Criada pela clonagem de dois plasmídeos que contêm os promotores: 1) T7 RNA <i>polymerase</i> 2) Repressor da tetraciclina presentes no locus de α - β tubulina do DNA da cepa 427.
Usada para estudos de bioquímica, biologia molecular e celular do parasita.	Usada em técnicas de RNAi (para a interrupção da expressão de genes).
Variação antigênica, monomórfica, geneticamente manipulável, fácil cultivo e manutenção da cultura, não infecciosa em humanos.	Resistente a higromicina e geneticina.

Fonte: Peacock et al. (2008); Wirtz, Clayton. (1995).

Os parasitas foram cultivados em meio SDM-79 suplementado com 10% de soro fetal bovino (BRUN; SCHONENBERGER, 1979) a 28 °C com repiques diários para a manutenção da cultura. Quando as formas procíclicas entram na fase Log são congeladas a -80 °C com glicerol 10%.

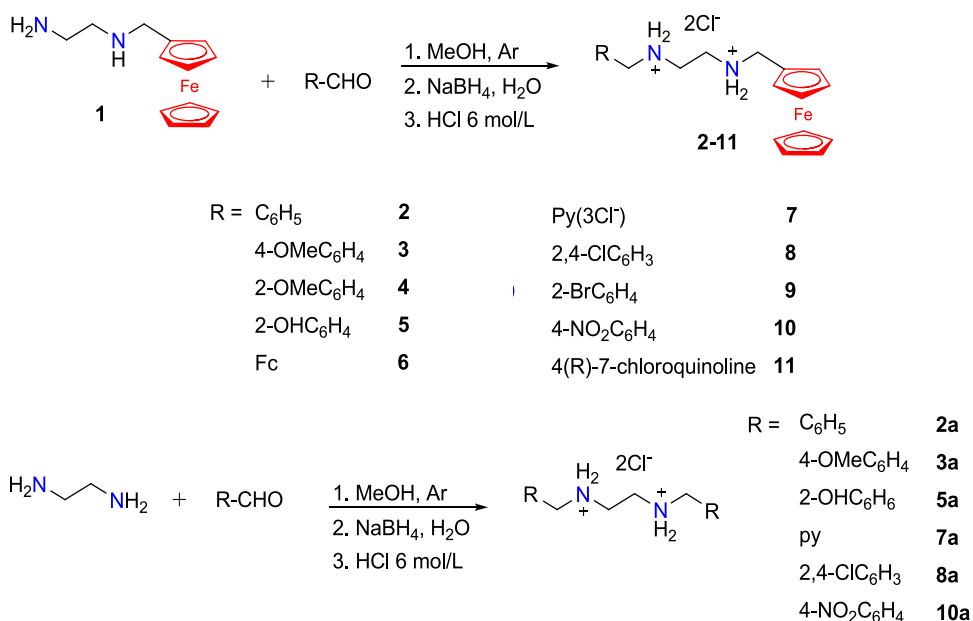
Para a realização do ensaio citotóxico do MTT, as culturas foram mantidas até a obtenção da fase exponencial de crescimento (1×10^6 parasitas/mL).

3.1.2 Derivados de diaminas de ferroceno e 1,4-naftoquinonas

Os derivados de benzil diaminas, diaminas de ferroceno e derivados de 1,4-naftoquinonas, moléculas inéditas sintetizadas no Laboratório de Síntese Organometálica do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense (UFF), cedidas pela Profa. Dra. Maria Domingues Vargas e sintetizadas pelo Prof. Dr. Acácio Ivo Francisco, foram diluídas em DMSO (dimetilsulfóxido) e utilizadas nas formas procíclicas de *T. brucei* (427 e 29-13) para ensaios de citotoxicidade, obtendo-se os IC₅₀ (Índice de Citotoxicidade) dos compostos.

Na ilustração a seguir (figura 5) apresenta-se de forma esquemática a síntese utilizada para a obtenção dos diversos derivados das benzil diaminas e diaminas de ferroceno testadas nas cepas de *T. brucei*.

Figura 5. Sínteses de derivados de benzil diaminas e diaminas de ferroceno com possível atividade tripanocida.

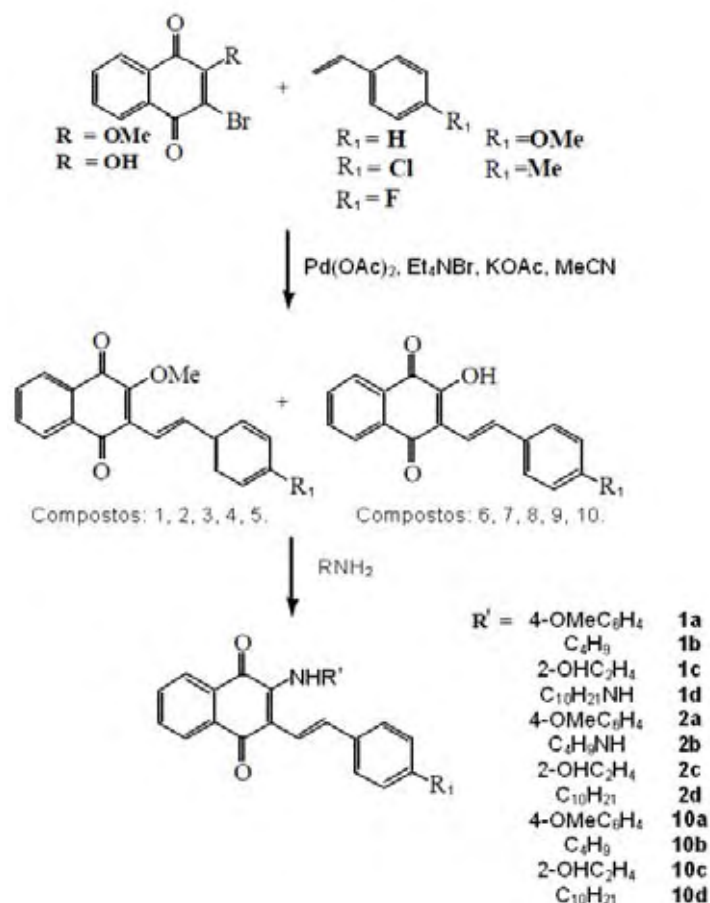


Fonte: Francisco, A. I. et al. Resultados não publicados.

As naftoquinonas sintetizadas foram obtidas por meio da reação de Heck da bromometoxilausona. A reação de Heck ocupa um lugar especial entre os tipos de reações catalisadas por paládio (HECK, 1968). Essa reação envolve iodetos e brometos de arila e é promovida por Pd(II) ou Pd(0), usualmente em temperaturas elevadas (GORDON, 2001). A continuação na figura 6 ilustra-se a síntese realizada

para a obtenção dos diversos derivados das 1,4-naftoquinonas e 2-amino-1,4-naftoquinonas testados nas cepas de *T. brucei*.

Figura 6. Sínteses de derivados de 1,4-naftoquinonas com possível atividade tripanocida.



Fonte: Adaptado de Muller et al. (2006); Francisco, A. I. et al. Resultados não publicados.

3.2 Método Colorimétrico de MTT

O método de MTT está baseado na habilidade das células vivas para reduzir o sal tetrazolium MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, em um produto colorido chamado *formazan*; este é produzido pela atividade da enzima succinato desidrogenase da mitocôndria. Esta metodologia foi baseada naquela descrita por Mosmann (1983) com modificação de Cotinguiba e colaboradores (2009), como apresentado na figura 7.

Figura 7. Teste colorimétrico (MTT). **A.** Microscópio para contagem do número de parasitas em câmara de Neubauer; **B.** Homogeneização das substâncias em DMSO; **C.** Diluição das substâncias; **D.** Montagem da placa (parasitas + substância); **E.** Incubação da placa de 96 poços por 24 horas em BOD; **F.** Aplicação do MTT/PMS; **G.** Visualização final da placa após a adição de SDS-HCl; **H.** Leitura da absorbância no espectrofotômetro (Leitor de placa de ELISA); **I.** Cálculo do IC₅₀ com software Origin 7.0.



Fonte: Adaptado de PASSERINI (p. 53, 2008).

Após diluições em DMSO, 3 μ L de cada substância (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 μ g/mL, respectivamente) foram adicionados a 97 μ L de meio SDM-79 contendo as formas procíclicas de *T. brucei*. A placa foi incubada em câmara úmida a 28 °C (BOD) por 24 horas. A seguir, adicionou-se 10 μ L de solução MTT/PMS (MTT 2,5 mg/mL e PMS 0,22 mg/mL, PMS, *Phenazine methosulfate*) em todos os poços e a placa novamente foi incubada, ao abrigo da luz por 75 minutos a 28 °C. Neste momento, ocorre à redução do sal tetrazolium MTT no produto colorido *formazan*. O PMS foi utilizado como um carregador intermediário de elétron para o realce do rendimento do *formazan* e a redução do período de incubação (DUTTA et al., 2005).

Adicionou-se 100 µL da solução SDS-HCl (Dodecil sulfato de sódio ao 10% em HCl 0,01N) para dissolver os cristais de *formazan*, incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA – BioRad) a 595 nm e os resultados foram obtidos em absorbância. A porcentagem de citotoxicidade (%C) foi calculada segundo a equação abaixo (MUELAS-SERRANO et al., 2000).

$$\% C = [(Gc - Gp)/Gc] \times 100$$

$$Gc = Ac - Am$$

$$Gp = Ap - Apm$$

sendo que, Gc representa o número de parasitas/mL nos poços controles e Gp o número de parasitas/mL detectados em diferentes concentrações da substância. Ac corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência da substância) com parasitas; Am representa ao valor da absorbância nos poços controle (na ausência da substância) sem parasitas; Ap, o valor da absorbância nos testes e Apm o valor da absorbância das diferentes concentrações da substância na ausência dos parasitas.

Foram realizados dois controles; um na ausência dos parasitas para cada poço teste na presença da substância e outro na ausência desta, mas contendo os parasitas. Os valores de IC₅₀ foram determinados a partir dos dados de absorbância obtidos a 595 nm após 24 h de reação, sendo o IC₅₀ calculado por regressão linear, utilizando o programa Origin 7.0, para cada composto (WASS, 2002). Todos os testes foram feitos em triplicata e como controle positivo foi incluída a pentamidina, usada no tratamento da tripanossomíase africana (BRAY et al., 2003).

O ensaio de citotoxicidade utilizando o método colorimétrico do MTT também foi realizado em células HepG2. Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a equipe da Profa. Dra. Vera Lúcia Isaac do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCF-UNESP, Campus de Araraquara. As células HepG2 são um tipo de linhagem celular de hepatoma humano usado como modelo para simular as funções hepáticas do organismo humano *in vitro*. Um dos aspectos mais interessantes desta linhagem celular é que mantém as capacidades biossintéticas normais das células do parênquima hepático, mostrando atividade na fase I e fase II

das enzimas, incluindo a enzima citocromo P450. Assim, esta linhagem celular exibe funções metabólicas similares ao fígado humano (SASSA et al., 1987; NATARAJAN; DARROUDI, 1991; CHIARI et al., 2012).

HepG2 foi cultivada em meio MEM (*Minimum Essential Media*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). A cultura foi mantida a 37 ± 2 °C em atmosfera de CO₂ a 5%. Entre 80% a 90% das células foram utilizadas para o desenvolvimento do ensaio do MTT. Os compostos foram testados em diferentes concentrações, solubilizados em meio MEM depois de prévia solubilização em DMSO. Em cada experimento foi testado um controle negativo (MEM com a respectiva concentração de DMSO em cada tratamento) e um controle positivo (DMSO em MEM a 10%). Todos os testes foram feitos em triplicata. Para evitar a interação dos compostos testados com o MTT, as células foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffer Saline*) após a adição da solução de MTT nas células, como sugerido por Brugginsser e colaboradores (2002).

3.3 Cálculo do *Safety Index* (SI)

Baseado nos resultados de IC₅₀ das células HepG2 (1) e dos parasitas (2), com a relação IC₅₀ (1)/ IC₅₀ (2) foi calculado o índice de segurança conhecido como *Safety Index* (SI) para cada uma das substâncias (LARGERON et al., 1999). Índices com valores superiores a 10 sugerem que o uso da substância pode ser considerado seguro (PASSERINI, 2008).

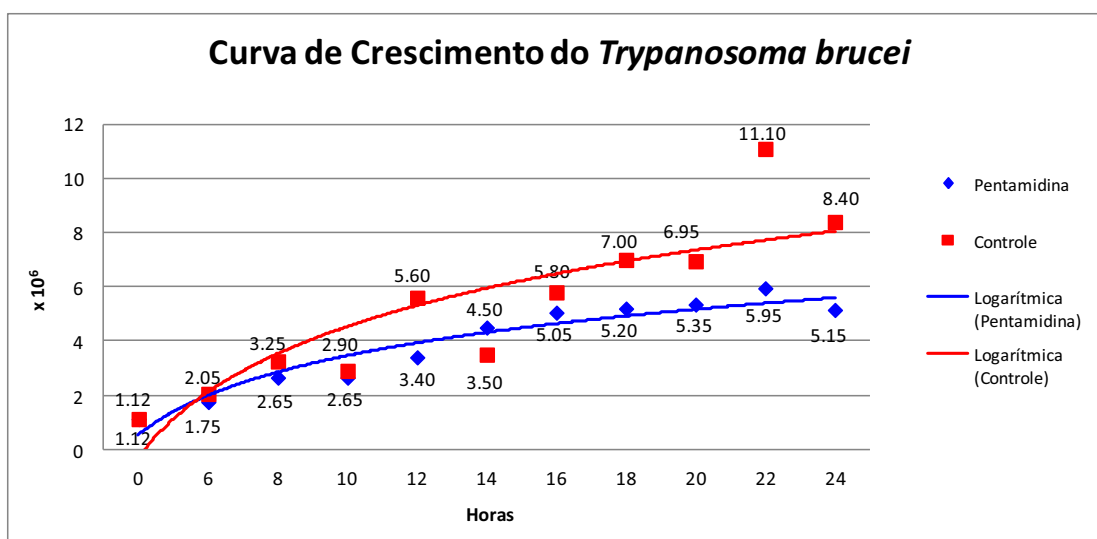
3.4 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada seguindo o método de extração de RNA-Trizol[®] de acordo com as especificações do fabricante. Culturas de cepas 427 de *T. brucei* com concentração de 5 a 10×10^6 parasitas foram tratadas com os compostos: 3, (Cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina), de diaminas de ferroceno, e 1, (2-metoxi-3-(2-feniletetil)-1,4-naftoquinona), derivado de 1,4-naftoquinona, e a pentamidina como controle.

Utilizaram-se como doses para o tratamento dos parasitas os valores de IC₅₀ obtidos para estes compostos na avaliação da atividade tripanocida, nas seguintes

concentrações: 0,36 μM para o derivado de diamina de ferroceno; 4,72 μM para o derivado de 1,4-naftoquinona e de 6,43 μM para a pentamidina. Realizou-se seguimento da cultura não tratada e tratada com pentamidina por 24 h para a determinação da hora na qual os parasitas foram susceptíveis ao tratamento com as substâncias, encontrando-se que no intervalo de 18 a 20 h de tratamento os parasitas diminuía seu crescimento e começavam a morrer, como se ilustra na figura 8.

Figura 8. Curva de crescimento de *T. brucei* 427. Azul: cultura de parasitas tratadas com a pentamidina, fármaco utilizado no tratamento da doença do sono. Vermelho: cultura de parasitas não tratadas.



Fonte: arquivo pessoal.

Após 20 h de tratamento com os diferentes compostos e a partir da mesma cultura inicial, o cultivo de parasitas tratadas e não tratadas, foi centrifugado e o *pellet* foi lavado com PBS 1X, depois se agregou 1 mL de Trizol e após 5 min, a temperatura ambiente, apresentou-se a dissociação completa das proteínas. Adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio, agitou-se e deixou em repouso por 3 min. Depois, centrifugou-se a 12,000 RPM por 15 min aparecendo duas fases, uma fase incolor que corresponde à fase aquosa, onde se encontrava o RNA e uma fase vermelha, que corresponde à fase fenol-clorofórmio, contendo o DNA. Adicionou-se 0,05 mL de isopropanol à fase aquosa para a precipitação do RNA total, após centrifugação o *pellet* foi resuspenso em etanol 100% e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização. Para a reação de RT-PCR o RNA total foi dissolvido em água livre de RNases (DEPC: dietilpirocarbonato) e incubado por 10 min a $57\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5 Reação de RT-PCR utilizando o kit 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends

O protocolo utilizado foi o mesmo descrito em Ambrósio et al. (2009), Silva (2009) e Silva et al. (2011). A reação de RT-PCR foi feita com 5 µg de RNA total extraído a partir de parasitas tratados e não tratados com os compostos após 20 h de tratamento. O kit 3' RACE de Invitrogen foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante para síntese do cDNA, em duas condições de trabalho, padrão e modificada.

Na condição padrão foi empregado o iniciador *Adapter Primer* (AP) presente no kit. Para a condição modificada, foi utilizado o *Random Hexamer Primer* (RH) (Fermentas) com o intuito de amplificar RNAs ainda não processados, em substituição ao *Adapter primer*. Foram realizadas várias reações com o intuito da padronização da técnica. As sequências de todos os iniciadores utilizados nos experimentos se encontram na tabela 4.

Tabela 4. Iniciadores utilizados na reação de RT-PCR.

<i>Adapter Primer</i>	5' – GGC CAC GCG TCG ACT ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T – 3'
<i>Random Hexamer Primer</i>	5' – NNN NNN – 3'
TS1(F)	5' – GTA CTA TAT TGA TGC GTG AGG C – 3'
TS2 (R)	5' – GAG AGT TGC TCG TGG TAG GC – 3'
TS3 (F)	5' – GTA AGT GGT GGT GGC GTA AG – 3'
TS4 (R)	5' –CAA TGT GGA TGC AGA TAG CC– 3'
7SL_S (F)	5' – TTG CTC TGT AAC CTT C – 3'
7SL_AS (R)	5' – TCT ACA GTG GCG ACC TCA AC – 3'

A composição final da reação de RT-PCR foi de 20 mM de Tris HCl (pH 8,4 a 22 °C); 50 mM de KCl; 2,5 mM de MgCl₂; 10 mM de DTT (*DL-dithiothreitol*); 500 nM de AP ou RH; 500 µM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 5 µg de RNA total.

Para a obtenção do cDNA utilizou-se 200 units/µL de SuperScript II RT (*Reverse Transcriptase*), provenientes com o kit.

Para a reação de *trans-splicing* foram empregados os iniciadores TS1 e TS2 para formas processadas de α-tubulina, utilizando cDNA obtido com AP; TS3 e TS4

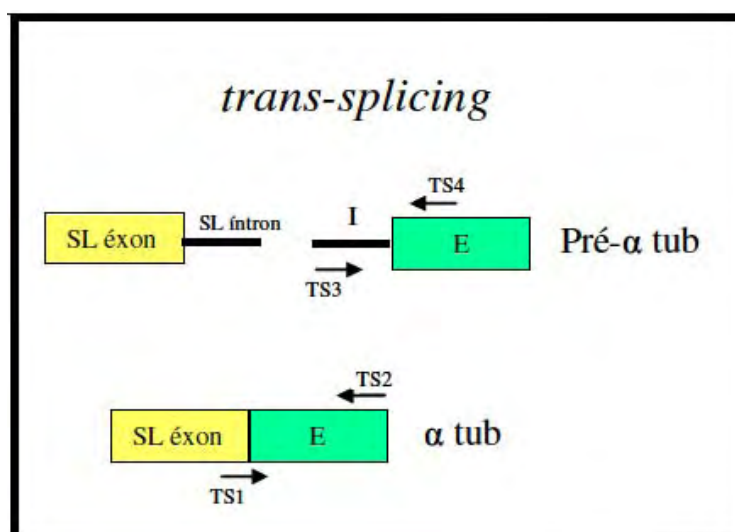
e 7SL_S e 7SL_AS para formas não processadas de α -tubulina utilizando cDNA obtido com RH (figura 9). Como controle da reação foi amplificado o transcrito de 7 SL RNA, utilizando os iniciadores 7SL_S e 7SL_AS, de acordo com Ambrósio et al. (2009), com as condições a seguir:

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
94	2 min e 30 seg	1X
94	45 seg	21X
53 (TS1/TS2; TS3/TS4) 44 (7SL-S/7SL_AS)	45 seg	
72	1 min	
72	5 min	1X
4	Tempo indeterminado	1X

A composição final da reação de PCR foi de 20 mM de Tris HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$; 2 μ M de TS1, TS2, TS3, TS4, 7SL_s ou 7SL_AS; 200 μ M de dATP, dCTP, dGTP, dTTP e 0,04 - 0,1 unit/ μ L de *Taq*-DNA polymerase (Invitrogen).

Para a reação de RT-PCR foi utilizado o termociclador *PTC-100TM Programmable Thermol Controller*, de *MJ Research, Inc.* e para a reação de *trans-splicing* utilizou-se o termociclador Veriti 96 well – AB (Applied Biosystems).

Figura 9. Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional da reação de *trans-splicing*. Para avaliação do processamento da α -tubulina, TS2 se liga em outra região do éxon de α -tubulina, enquanto TS1 anela-se tanto no SL éxon quanto no éxon de α -tubulina (α -tub). TS3 e TS4 anelam-se na região intergênica e no exón ainda não processados do transcrito de α -tubulina (pré- α -tub). E e I são as siglas para éxon e região intergênica, respectivamente.



Fonte: Silva (2009, p. 52).

A seguir, apresentam-se as sequências amplificadas na reação de RT-PCR para a forma não processada da alfa tubulina (pré- α -tub), forma processada da alfa tubulina (α -tub) e *spliced leader* (7SL) para o estudo da reação de *trans-splicing*. Observam-se os locais de anelamento dos iniciadores utilizados na reação de RT-PCR como se encontram na tabela 4. Trabalhou-se com as sequências como descrito em Ambrósio et al. (2009), Silva (2009) e Silva et al. (2011). Sequência complementar de *Alpha Tubulin* – Tb927.1.2400. *Trypanosoma brucei brucei* strain 927/4 GUTat10.1 chromosome 1, complete sequence. gi|115510984: *Trypanosoma brucei brucei* strain 927/4 GUTat10.1 chromosome 1, complete sequence. From: 583368 - to: 584723 (Alpha tubulin); from: 583000 - to: 585000 (Alpha tubulin with intergenic regions) do Genbank.

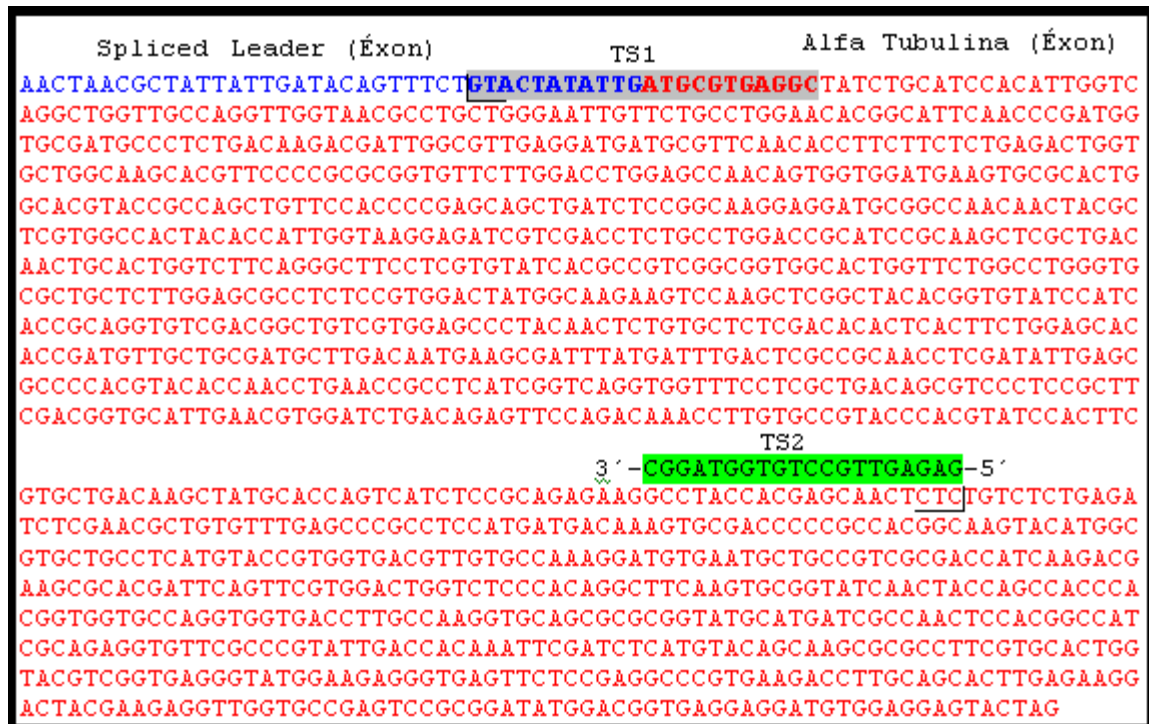
Figura 10. Sequência da alfa tubulina não processada (pré- α -tub, 218 bp). Número de acesso: NC_008409. PPT: *track* de polipirimidina, SS: sítio de *splicing*.



■ região intergênica ■ Alfa Tubulina (Éxon) ■ Primer TS3 (Forward)
■ Primer TS4 (Reverse)

Fonte: arquivo pessoal.

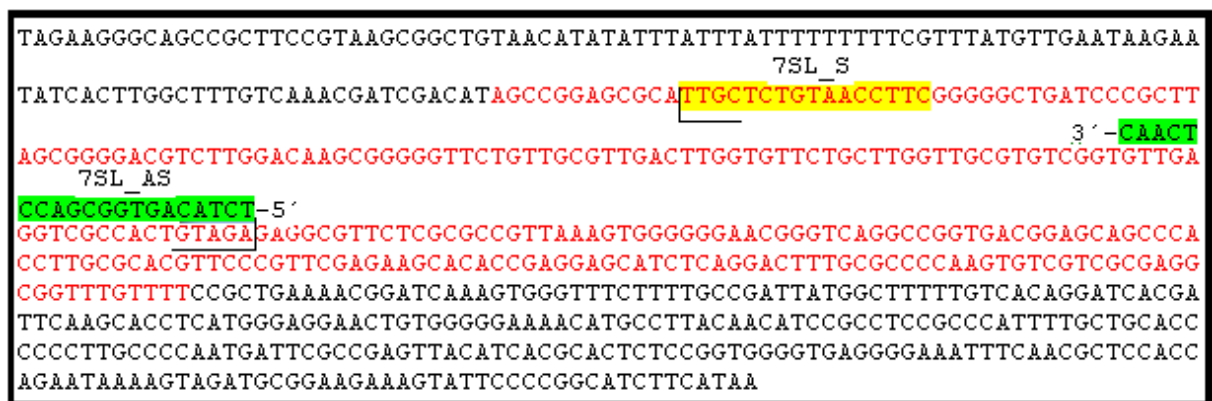
Figura 11. Sequência alfa tubulina processada (α -tub, 871 bp). Número de acesso: NC_008409.



■ Spliced leader (Éxon) ■ Alfa Tubulina (Éxon) ■ Primers TS1 (Forward)
■ Primer TS2 (Reverse)

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 12. Sequência de nucleotídeos do gene 7SL RNA (123 bp) de Trypanosoma (105-536 7SL) e da fita não codificadora do fragmento *AluI* DNA de kTB273 utilizada por Michaelis e colaboradores (1992) para a clonagem do gene 7SL.



■ Primers 7SL_S (Forward) ■ Primer 7SL_AS (Reverse) ■ Gene 7 SL RNA
■ Fragmento *AluI* DNA de kTB273 Trypanosoma

Fonte: adaptado de Michaelis et al. (1992, p. 57).

3.5.1 Visualização dos produtos da reação de PCR em Gel de agarose 1,5%

A eletroforese dos produtos obtidos na reação descrita em 3.4 foi realizada em gel de agarose 1,5% em TAE 1X (tris-acetato 40 mM pH 8,5; EDTA 2 mM). Tampão de 6X DNA Loading Dye – Blue (Thermoscientific) foi adicionado às amostras e a solução resultante foi aplicada em gel contendo 0,5 g/mL de brometo de etídeo (BrEt) (Gibco). O gel foi submetido à voltagem de 5 V/cm em tampão TAE 1X. Utilizou-se o peso molecular *GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder* (Fermentas).

Para a visualização do gel foi utilizado o equipamento *Multimage I Alpha Innotech* com ajuda do programa *Alpha Innotech* versão 3.0.

3.6 Avaliação da Atividade antioxidante de derivados de diaminas de ferroceno e 1,4-naftoquinonas

A avaliação da atividade antioxidante dos compostos, cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina (composto 3) e 2-metoxi-3-(2-feniletetil)-1,4-naftoquinona (composto 1) foi realizada com o uso do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), segundo metodologia descrita por Mensor et al., (2001) e Falcão et al., (2006), com modificações. Estes compostos foram utilizados por apresentarem alta atividade tripanocida e índice de segurança maior a 10. O intuito foi verificar se poderia ser que estes compostos tivessem outros tipos de atividade complementar à apresentada sobre o *trans-splicing*.

A partir de uma concentração fixa de 1 mg/mL para o composto 3 e de 5 mg/mL para o composto 1, preparou-se soluções em diferentes concentrações (de 0 a 200 µg/mL para o composto 3 e de 0 a 800 µg/mL para o composto 1), as quais adicionaram-se 200 µL de solução DPPH (0,004%). As soluções foram mantidas ao abrigo da luz e após 30 min foi determinada a absorbância a 515 nm. Observou-se mudança de coloração de violáceo intenso ao amarelo. O metanol foi utilizado como controle. O ensaio também foi realizado para a vitamina C, como padrão antioxidante, em diferentes concentrações. Os ensaios do DPPH para cada concentração foram realizados em triplicata.

A média das absorvâncias destas amostras foi usada como a absorvância máxima, servindo para o cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH (% de inibição) (MOLYNEUX, 2004).

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH} = \frac{(A_{\text{máx}} - A_{\text{teste}})}{A_{\text{máx}}} \times 100$$

em que $A_{\text{máx}}$ é a absorvância do DPPH em 515 nm na ausência de amostra (controle) e A_{teste} é a absorvância do DPPH em 515 nm na presença de amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

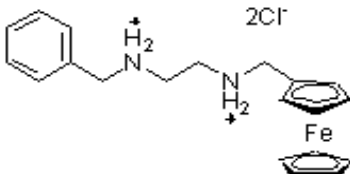
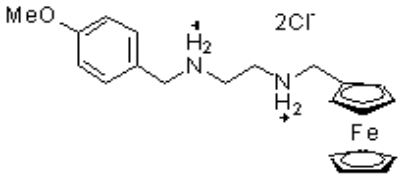
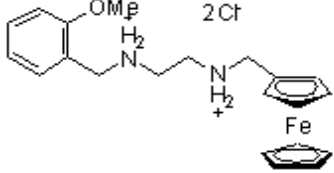
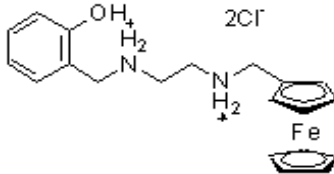
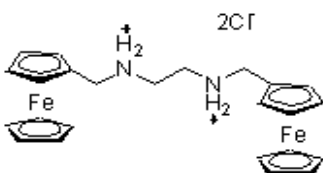
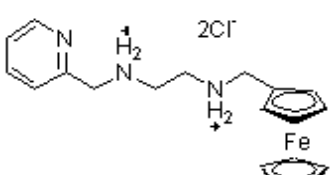
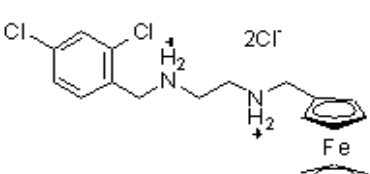
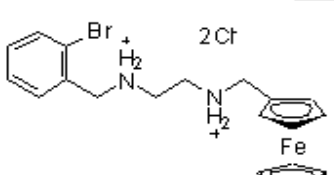
Com o intuito de procurar novos fármacos no controle da doença do sono, trabalhou-se com 38 diferentes compostos de caráter inédito derivados de benzil diaminas e diaminas de ferroceno do tipo N1,N2-dibenziletano-1,2-diamina (cloridratos de benzil diaminas) e N1-benzil,N2-metilferroceniletano-1,2-diamina (cloridratos de diaminas de ferroceno), respectivamente, e derivados de 1,4-naftoquinonas do tipo 2-metoxi/hidroxi-3-(1-alquenil)-1,4-naftoquinonas e as aminas destes derivados. Os compostos sintetizados no Laboratório de Síntese Organometálica do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense (UFF) foram avaliados pelo método colorimétrico (MTT) e padronizado frente a formas procíclicas das cepas 427 e 29-13 de *T. brucei*.

Devido às dificuldades experimentais do uso de formas infectantes de *T. brucei*, triagens iniciais de bibliotecas de compostos naturais ou sintéticos podem ser realizadas com as formas procíclicas, formas não infectantes, por serem de fácil cultivo, manuseio e manutenção para os ensaios; assim, apenas as substâncias que apresentarem alguma atividade tripanocida poderão ser consideradas para próximas etapas de estudo (PEACOCK et al., 2008; WIRTZ; CLAYTON, 1995).

4.1 IC₅₀ DOS DERIVADOS DE BENZIL DIAMINAS E DIAMINAS DE FERROCENO

A atividade tripanocida de cada composto testado pode ser analisada a partir do seu resultado de IC₅₀ (concentração do composto que mata 50% dos parasitas), comparativamente com o resultado da pentamidina, conforme a tabela 5.

Tabela 5. Atividade tripanocida e índice de segurança de benzil diaminas e diaminas de ferroceno. ^aIC₅₀ (μM), ^bSI: *Safety Index*, os valores de SI>10 (PASSERINI, 2008) observam-se em negrito.

Composto	Estrutura	IC ₅₀ ^a Células HepG2	IC ₅₀ ^a T. brucei 427	SI ^b T. brucei 427	IC ₅₀ ^a T. brucei 29-13	SI ^b T. brucei 29-13
diaminas de ferroceno		30,99	0,51	60,76	4,04	7,67
		18,60	0,36	51,67	0,82	22,68
		32,26	1,78	18,12	7,69	4,20
		34,49	1,27	27,16	5,33	6,47
		9,20	0,35	26,29	4,81	1,91
		85,45	7,46	11,45	10,00	8,55
		21,94	0,45	48,76	4,58	4,79
		26,20	0,41	63,90	1,13	23,19

benzil diaminas	10		22,68	2,28	9,95	3,56	6,37
	11		20,31	10,42	1,95	6,48	3,13
	2a		223,74	11,08	20,19	9,99	22,40
	3a		990,62	8,25	120,08	8,63	114,79
	5a		148,21	4,61	32,15	5,16	28,72
	7a		86,91	13,88	6,26	14,11	6,16
	8a		280,57	12,35	22,72	16,78	16,72
	10a		590,18	36,58	16,13	19,22	30,71
	pentamidina		159,71	6,43	24,84	6,43	24,84

De acordo com os valores de IC₅₀, todos os compostos foram menos tóxicos nas células HepG2 quando comparadas com os valores obtidos para os parasitas. De maneira geral, a série de diaminas de ferroceno mostrou um índice de citotoxicidade menor do que a pentamidina, fármaco utilizado no tratamento da doença do sono.

A cepa 427 (selvagem) mostrou-se mais sensível às diaminas de ferroceno do que a cepa 29-13 (geneticamente modificada), enquanto os compostos derivados das benzil diaminas não mostraram diferenças significativas. Isto pode ser devido à diferença genética estabelecida entre as cepas, já que a cepa 29-13 contém dois plasmídeos no seu DNA que contêm os promotores T7 RNA *polymerase* e o repressor da tetraciclina, conferindo-o maior resistência quando comparada com a cepa 427 do tipo selvagem (PEACOCK et al., 2008; WIRTZ; CLAYTON, 1995).

Comparando as diaminas de ferroceno (compostos 2 a 11) com os derivados de benzil diaminas (compostos 2a a 10a) pode-se observar que a substituição de um grupo benzil por um grupo ferrocenil provocou um aumento na atividade tripanocida das moléculas. Considerando que as diaminas ligam-se ao DNA nos lugares ricos em adenina e timina (AT), interrompendo a tradução e transcrição (LEGROS, 2002), e que o grupo ferrocenil tem propriedades de óxido-redução (FRANCISCO; VARGAS, 2010), pode-se concluir que esta última propriedade é a que poderia aumentar a atividade citotóxica dos derivados de diaminas de ferroceno em comparação com as benzil diaminas.

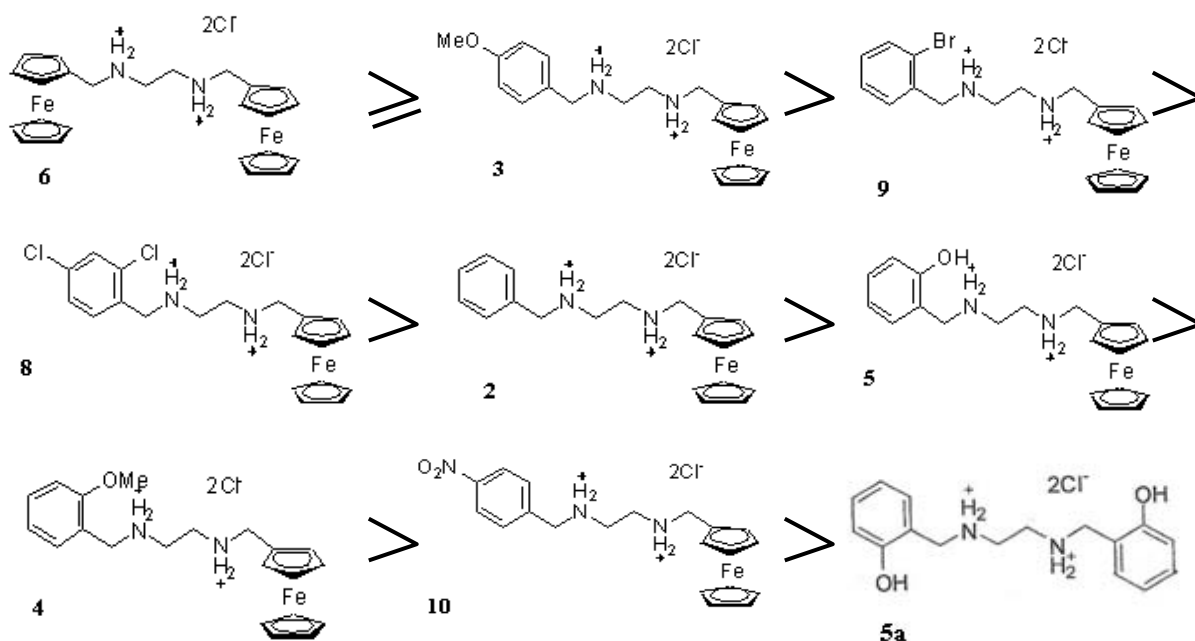
A combinação entre estrutura metálica e compostos orgânicos é uma estratégia interessante para criar novos princípios ativos contra a doença do sono. Isso porque o metal pode ser um veículo para a ativação do fragmento orgânico (ligante) como agente citotóxico ou o próprio composto metalorgânico pode reverter à resistência celular, já que os mecanismos de resistência que reconhecem um composto orgânico podem não reconhecê-lo quando coordenado a um metal (BERALDO, 2005). A mudança do estado de oxidação do metal influi no potencial redox, podendo confluir para um melhor ajuste das propriedades cinéticas e termodinâmicas do composto frente a um alvo biológico (FARRELL, 2003).

O índice de segurança maior do que 10 (destacados em negrito na tabela 5) significa que o composto pode ser promissor para futuros estudos (PASSERINI, 2008). Assim, os compostos 10, 11 e 7a mostraram não ser promissores para *T. brucei* 427 e os compostos 3, 9, 2a, 3a, 5a, 8a e 10a podem ser utilizados para estudos posteriores com a cepa *T. brucei* 29-13. Os seguintes compostos apresentaram os maiores valores de SI para a cepa 427 de *T. brucei* (selvagem): 3a

(SI: 120,08), 9 (SI: 63,90), 2 (SI: 60,76), 3 (SI: 51,67), 8 (SI: 48,76), 5a (SI: 32,15), 5 (SI: 27,16), 6 (SI: 26,29), 8a (SI: 22,72), 2a (SI: 20,19), 4 (SI: 18,12), 10a (SI: 16,13) e 7 (SI: 11,45). Dos compostos anteriores, apresentaram-se moléculas com maior atividade tripanocida que a pentamidina (IC_{50} : 6,43) para a cepa 427, tais compostos foram o 6 (IC_{50} : 0,35), 3 (IC_{50} : 0,36), 9 (IC_{50} : 0,41), 8 (IC_{50} : 0,45), 2 (IC_{50} : 0,51), 5 (IC_{50} : 1,27), 4 (IC_{50} : 1,78), 10 (IC_{50} : 2,28) e 5a (IC_{50} : 4,61). Dos compostos citados anteriormente, o que apresentou maior atividade tripanocida para as duas cepas de *T. brucei*, foi o composto 3 (cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina), com um IC_{50} de 0,36 e 0,82 para a cepa 427 e 29-13, respectivamente. Este composto foi eleito para a reação de RT-PCR e a avaliação da atividade antioxidante como descritas na seção 3.5 e 3.6 de materiais e métodos, respectivamente.

Observa-se, conforme apresentado na figura 13, a tendência na diminuição da atividade tripanocida desta série de compostos quando modificado o radical presente nos extremos da molécula de diamina.

Figura 13. Diminuição da atividade tripanocida da série de derivados de diaminas de ferroceno e benzil diaminas com IC_{50} menor do que a pentamidina.



Para a determinação da série anterior, utilizaram-se os valores de IC_{50} obtidos com a cepa 427, por ser do tipo selvagem. Embora os compostos 6 e 3 com IC_{50} de

0,35 μM e 0,36 μM , respectivamente, tenham apresentado concentrações muito próximas para a atividade tripanocida, apresentaram SI bastante diferentes (26,29 e 51,67 respectivamente). O composto 6 (IC_{50} de 9,20 μM) tem dois grupos ferrocenil e apresentou o dobro de citotoxicidade nas células HepG2, comparativamente ao composto 3 (IC_{50} de 18,60 μM), por essa razão, decidiu-se utilizar o composto 3 na reação de RT-PCR, devido ao alto custo da metodologia.

De acordo com a série descrita na figura 13, a toxicidade dos substituintes está correlacionada com os fatores eletrônicos, em que a atividade tripanocida depende da posição dos substituintes no anel benzil, os quais podem doar sua densidade eletrônica ao sistema aromático mediante uma ligação π , para estabilizar por ressonância o complexo sigma. Os grupos metoxi e hidroxil são grupos ativadores do anel aromático e cumprem com a propriedade descrita anteriormente, enquanto que o Cl e Br são grupos desativadores do anel e, por serem mais eletronegativos, a ligação C-halogênio está mais polarizada, onde o carbono suporta a parte positiva do dipolo. Esta polarização provoca uma diminuição da densidade eletrônica do anel aromático, contudo os halogênios possuem pares de elétrons isolados que podem doar sua densidade eletrônica mediante a formação de uma ligação π , o que permite estabilizar as cargas positivas adjacentes e o complexo por ressonância (WHELAND, 1944).

Sabe-se que o par ferroceno/ferrocênio (Fc/Fc^+) representa a reversibilidade de apenas um elétron, porém quando o ferroceno é acoplado a outros grupos pode ocorrer uma influência destes no comportamento redox devido à mudança de energia do nível HOMO (SZARKA et al., 2001), de modo que a reversibilidade pode ser reduzida significativamente (STEPRICKA et al., 1999). Estudos sobre a oxidação do ferroceno e seus derivados comprovam que, se o ferroceno for acoplado a grupos eletro-doadores, os derivados formados podem oxidar-se mais facilmente que o ferroceno, enquanto que estes derivados são mais resistentes à oxidação se o acoplamento for por grupos eletro-retiradores (COE et al., 1994).

De acordo com as propriedades biológicas mencionadas por vários autores (SAI-KRISHNA et al., 2005; NEUSE, 2005; FRANCISCO; VARGAS, 2010; MONZOTE; GILLE, 2011), diversos derivados de diaminas e diaminas de ferroceno

poderiam estar envolvidos nos mecanismos de estresse oxidativo dos parasitas. Estudos realizados com derivados de diaminas mostraram que estas tendem a concentrar-se na mitocôndria (LANTERI et al., 2008). Portanto, para a confirmação destas hipóteses, em nosso laboratório estão sendo desenvolvidos estudos de avaliação do metabolismo oxidativo de cepas de *T. cruzi* tratadas com derivados de diaminas de ferroceno. Os compostos, até o momento, apresentaram maior atividade tripanocida que o benzonidazol, utilizado no tratamento da doença de Chagas (KOHATSU, A. A. N. et al. Resultados não publicados). Espera-se que este resultado possa servir como ferramenta para elucidar também possíveis interações destes derivados de diaminas de ferroceno nos mecanismos de estresse oxidativo em *T. brucei*. O composto 3 também foi utilizado para a avaliação da atividade antioxidante como explicado na seção 3.6 de materiais e métodos.

Em suma, as diaminas de ferroceno mostraram ser bons candidatos para estudos posteriores em busca de fármacos com potencial tripanocida. Portanto, estudos do mecanismo de ação de diaminas de ferroceno em *T. brucei* e *T. cruzi* são muito importantes para melhorar os conhecimentos sobre estes compostos e fornecer ferramentas para o desenvolvimento de medicamentos menos tóxicos e com maior eficácia para tratar essas doenças.

4.2 DERIVADOS DE 1,4-NAFTOQUINONAS

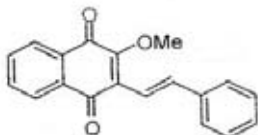
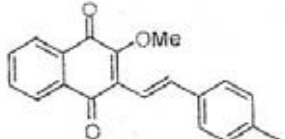
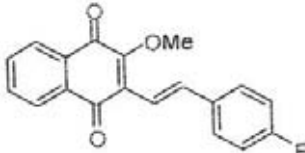
Alguns autores explicam que a atividade citotóxica das naftoquinonas poderia estar associada com fatores como a inibição das topoisomerases, possíveis intercalações com o DNA e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em um processo conhecido como ciclo redox de quinonas (CAMARA et al., 2008). Compostos que contêm o grupo quinona são conhecidos por exibir atividade antitumoral, tripanocida, moluscicida, fungicida e antimalárica (FRANCISCO et al., 2010).

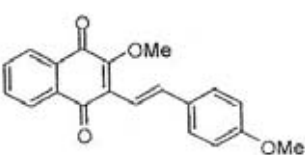
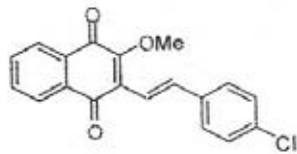
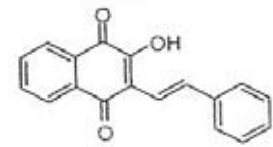
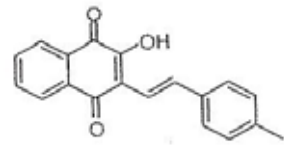
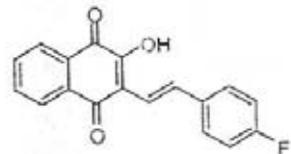
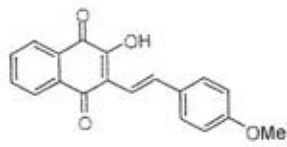
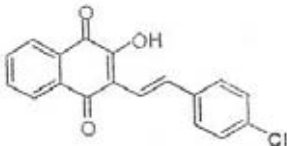
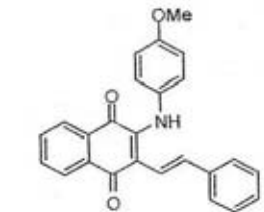
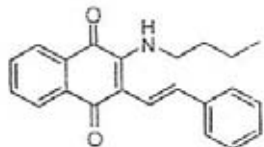
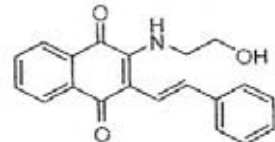
A atividade biológica das naftoquinonas está associada geralmente à habilidade de aceitar 1 ou 2 elétrons. Os diferentes substituintes ou grupos funcionais que podem unir-se ao anel quinona podem atrair ou doar elétrons modificando as propriedades redox destas moléculas (FRAGOSO et al., 2010) que

também poderia estar envolvida com sua atividade tripanocida. Geralmente a tendência é que as quinonas mais eletrofílicas tenham maior atividade biológica e quanto menos lipofílica, menor o índice de citotoxicidade (PINTO; De CASTRO, 2009).

Devido à procura urgente de novos agentes antimaláricos, encontrou-se que as naftoquinonas tem capacidade inibitória contra *Plasmodium falciparum*. Como resultado desta observação, as publicações de novas moléculas com estrutura de 1,4-naftoquinona foram aumentando, assim como os compostos 2-amino-1,4-naftoquinona imina. Estas moléculas são ativas contra diversas espécies de *Plasmodium* spp. (LÓPEZ et al., 2011). Descreve-se que os derivados 2-amino-1,4-naftoquinona e 4-amino-1,2-naftoquinona apresentam uma atividade maior contra *P. falciparum* comparada com os derivados 2-hidroxi-1,4-naftoquinona e quinonas diméricas (KAPADIA et al., 2001). Sob esta premissa, os compostos apresentados na tabela 6 foram sintetizados no Laboratório de Síntese Organometálica do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense (UFF), avaliados pelo método colorimétrico (MTT) e padronizados frente a formas procíclicas das cepas 427 e 29-13 de *T. brucei*, como descrito na seção 3.2.

Tabela 6. Atividade tripanocida e índice de segurança de derivados de 1,4-naftoquinonas. ^aIC₅₀ (μM), ^bSI: *Safety Index*, os valores de SI>10 observam-se em negrito (PASSERINI, 2008), NA: não apresentou atividade.

Composto		Estrutura	IC ₅₀ ^a Células HepG2	IC ₅₀ ^a <i>T.</i> <i>brucei</i> 427	S.I. ^b <i>T.</i> <i>brucei</i> 427	IC ₅₀ ^a <i>T.</i> <i>brucei</i> 29-13	S.I. ^b <i>T.</i> <i>brucei</i> 29-13
2-metoxi/hidroxi-1,4-naftoquinonas	1		>68,89	4,72	>15	8,13	>8,47
	2		>65,72	5,65	>11,63	7,79	>8,43
	3		56,70	10,99	5,16	17,68	3,2

4		427,61	26,57	16,09	37,12	11,52
5		>61,58	6,93	>8,89	6,77	>9,10
6		>217,16	12,99	>16,71	9,99	>21,73
7		>620,03	42,33	>14,65	34,41	>18,01
8		>67,96	7,95	>8,55	12,3	>5,52
9		>587,64	55,21	>10,64	57,36	>10,25
10		315	42,51	7,41	31,73	9,92
1a		>52,44	8,15	>6,43	1,41	>37,20
1b		---	285,78	---	NA	---
1c		133,05	26,99	4,93	2,91	45,72

1d		---	NA	---	NA	---
2a		>50,58	4,8	>10,54	9,3	5,43
2b		---	NA	---	32,42	---
2c		136,93	18,09	7,57	22,65	6,05
2d		---	206,15	---	NA	---
10a		---	106,33	---	172,19	---
10b		86,93	12,27	7,04	16,67	5,21
10c		127,53	25,3	5,04	52,37	2,43
10d		---	NA	---	NA	---
pentamidina		159,71	6,43	24,84	6,43	24,84

De acordo com os valores de IC₅₀ obtidos para a série de derivados de 1,4-naftoquinona, observou-se de um modo geral que os compostos 1 a 10 (derivados 2-metoxi/hidroxi-1,4-naftoquinona) apresentaram melhor atividade

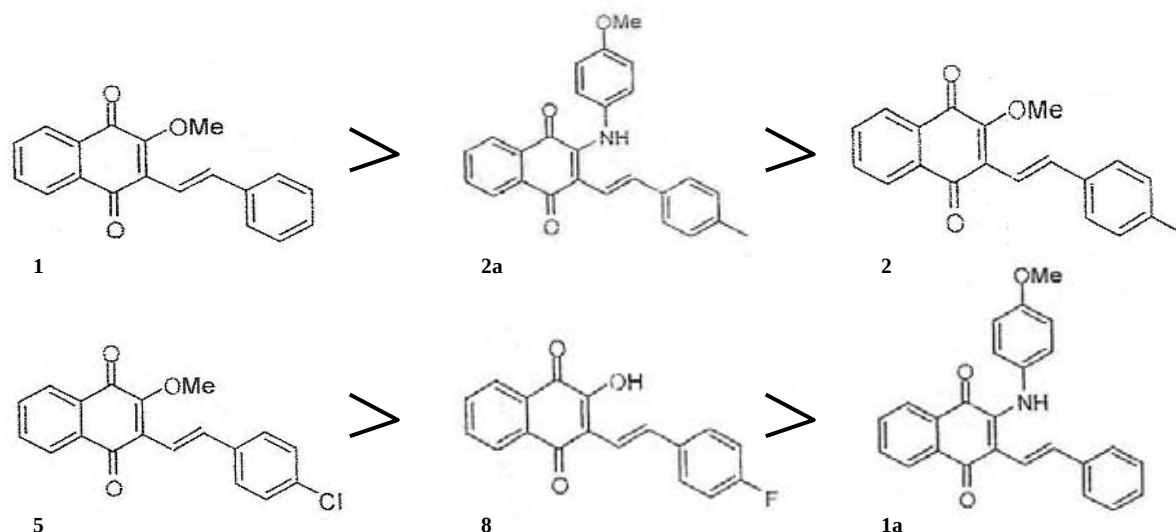
tripanocida que seus derivados 2-amino-1,4-naftoquinona (1a a 10d); isso poderia estar relacionado aos diferentes tipos de interações destas moléculas com o DNA ou com outras espécies envolvidas nos mecanismos de estresse oxidativo (NEVES et al., 2010) devido ao carácter electrofílico de seus substituintes.

Os derivados 2-metoxi-1,4-naftoquinona e 2-hidroxi-1,4-naftoquinona apresentaram maior atividade tripanocida quando comparados com os derivados 2-amino-1,4-naftoquinona que mostraram uma menor atividade, provavelmente por ser menos polares, como resultado da presença de cadeias lipofílicas, exibindo valores maiores de IC_{50} sendo alguns geralmente inativos (compostos 1b, 1d, 2b, 2d, 10a e 10d), sugerindo que a posição da cadeia e a diminuição da polaridade do grupo ligado ao átomo de nitrogênio diminui o efeito citotóxico dos compostos. Em adição, pode-se considerar que nos compostos 1d, 2b, 2d e 10d, dos derivados 2-amino-1,4-naftoquinona, as cadeias alifáticas presentes podem contribuir com a diminuição da citotoxicidade ou ausência de atividade devido aos possíveis impedimentos estéricos que evitam a intercalação dos anéis aromáticos da naftoquinona com o DNA, RNA ou proteínas (LÓPEZ, 2011). Sem a intercalação destes anéis, os grupos carbonílicos não conseguem interagir com o DNA.

No caso dos outros derivados 2-amino-1,4-naftoquinona que apresentaram atividade nas duas cepas, atribui-se esta atividade à presença de grupos desativadores do anel, como o cloro, que é eletronegativo e produz um aumento na polaridade da molécula (composto 10b), todavia que é capaz de doar sua densidade eletrônica para estabilizar o sistema aromático.

Os compostos 1, 2 e 2a apresentaram valores de IC_{50} menores e outros compostos como 5, 8 e 1a apresentaram valores próximos à pentamidina. Lembrando que compostos com valores de IC_{50} menores à pentamidina, fármaco utilizado no tratamento da doença do sono, são bons candidatos para o desenvolvimento de mais estudos. Em seguida, observa-se a tendência na diminuição da atividade tripanocida desta série de compostos como segue na figura 14.

Figura 14. Diminuição da atividade tripanocida da série de derivados de 1,4-naftoquinonas com IC₅₀ menor ou próximo da pentamidina.



As moléculas tem em comum grupos ativadores do anel naftoquinona na posição 2, que possuem um par de elétrons isolados capazes de estabilizar a estrutura por ressonância.

Com relação aos valores de citotoxicidade obtidos para as células HepG2, o intervalo do IC₅₀ entre os compostos 1a e 2a, derivados 2-amino-1,4-naftoquinona com maior atividade tripanocida, foi de $50 \pm 2 \mu\text{M}$, em que o composto 2a foi desta série o único que apresentou um valor de SI > 10. Dos compostos 1, 2, 4 e 8 obteve-se um intervalo de valores de IC₅₀ para as células HepG2 de $65 \pm 5 \mu\text{M}$, dos quais o composto 1 (2-metoxi-3-(2-feniletênil)-1,4-naftoquinona) foi o que apresentou maior atividade tripanocida (IC₅₀: $4,72 \mu\text{M}$), com SI > 15. Este composto foi utilizado na reação de RT-PCR para avaliar a interferência deste composto na reação de *trans-splicing* utilizando como modelo o gene da α -tubulina de *T. brucei* e também foi usado na avaliação da atividade antioxidante.

4.3 ALTERAÇÕES NA PRODUÇÃO DOS RNAs DA REAÇÃO DE *trans-splicing*

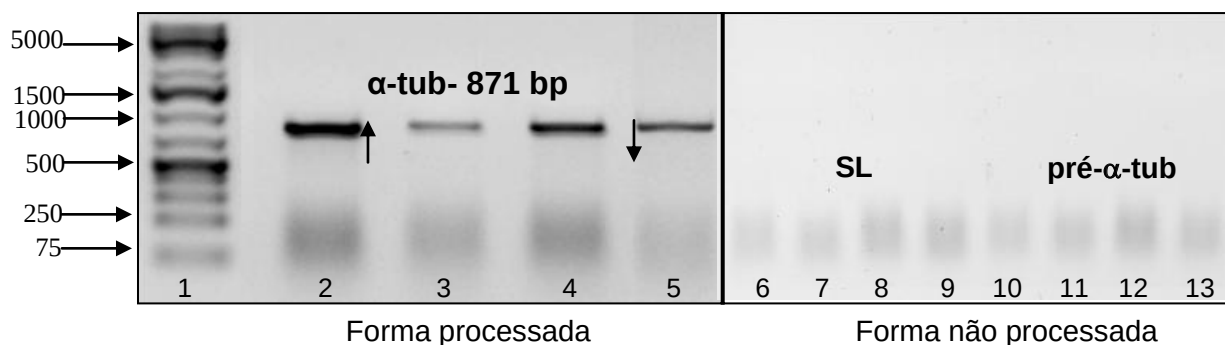
Para a avaliação das alterações na produção dos RNAs do gene da α -tubulina realizou-se a padronização da reação de RT-PCR (transcriptase reversa). Inicialmente, utilizou-se uma cultura de parasitas que foi subdividida em quatro culturas de igual número de parasitas, tratadas como segue: pentamidina, derivado de diamina de ferroceno, 1,4-naftoquinona e uma cultura sem tratamento (controle

positivo, C+). Após o cultivo, para todas as culturas, foi realizada a extração de RNA total.

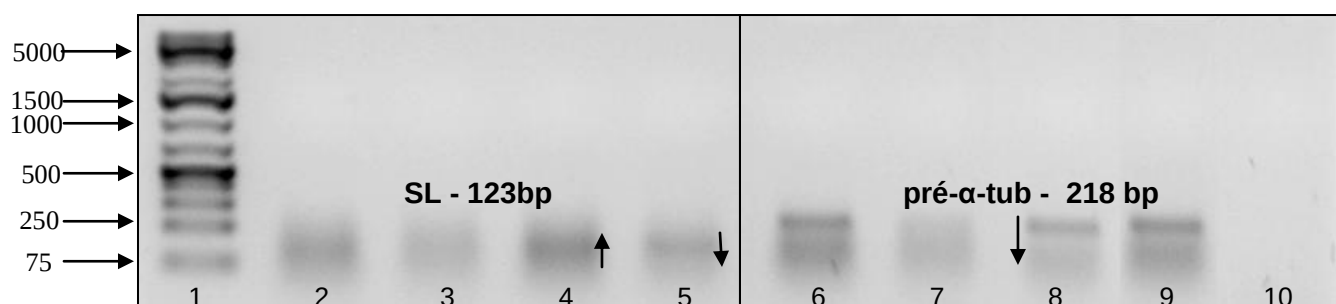
Os RNAs totais obtidos após o tratamento foram utilizados para a reação de RT-PCR realizada com *Adapter Primer*, como descrito em materiais e métodos (item 3.5). Após a reação, apareceram apenas os produtos de amplificação das formas processadas (mRNA), como se observa no gel apresentado na figura 15A. Após a confirmação do aparecimento das formas processadas de α -tubulina, buscou-se a amplificação das formas não processadas (pré-mRNA), modificando-se a condição padrão para reação de RT-PCR com *Random Hexamer Primer*. Os resultados estão apresentados na figura 15 B.

Figura 15. Gel de agarose 1,5% com BrEt. **A)** Amplificação da forma processada da alfa-tubulina (α -tub; TS1/TS2) utilizando o *Adapter Primer*. **1.** *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas); **2.** Diamina de ferroceno (Fc); **3.** Pentamidina (Pent.); **4.** Sem substância (C+); **5.** Derivado de 1,4-naftoquinona (Naft.); **SL:** **6.** Fc; **7.** Pent.; **8.** C+; **9.** Naft.; **pré- α -tub:** **10.** Fc; **11.** Pent.; **12.** C+; **13.** Naft. **B)** Amplificação das formas não processadas de *Spliced Leader - SL* (7SL_S/7SL_AS) e **pré- α -tub** (TS3/TS4) utilizando o *Random Hexamer Primer*. **1.** *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas); **2.** C+; **3.** Pent.; **4.** Fc; **5.** Naft.; **6.** C+; **7.** Pent.; **8.** Fc; **9.** Naft.; **10.** Controle negativo. As setas indicam aumento ($\uparrow$) e diminuição ($\downarrow$) da forma do mRNA maduro da α -tub. O tamanho das bandas está indicado.

A) Adapter Primer

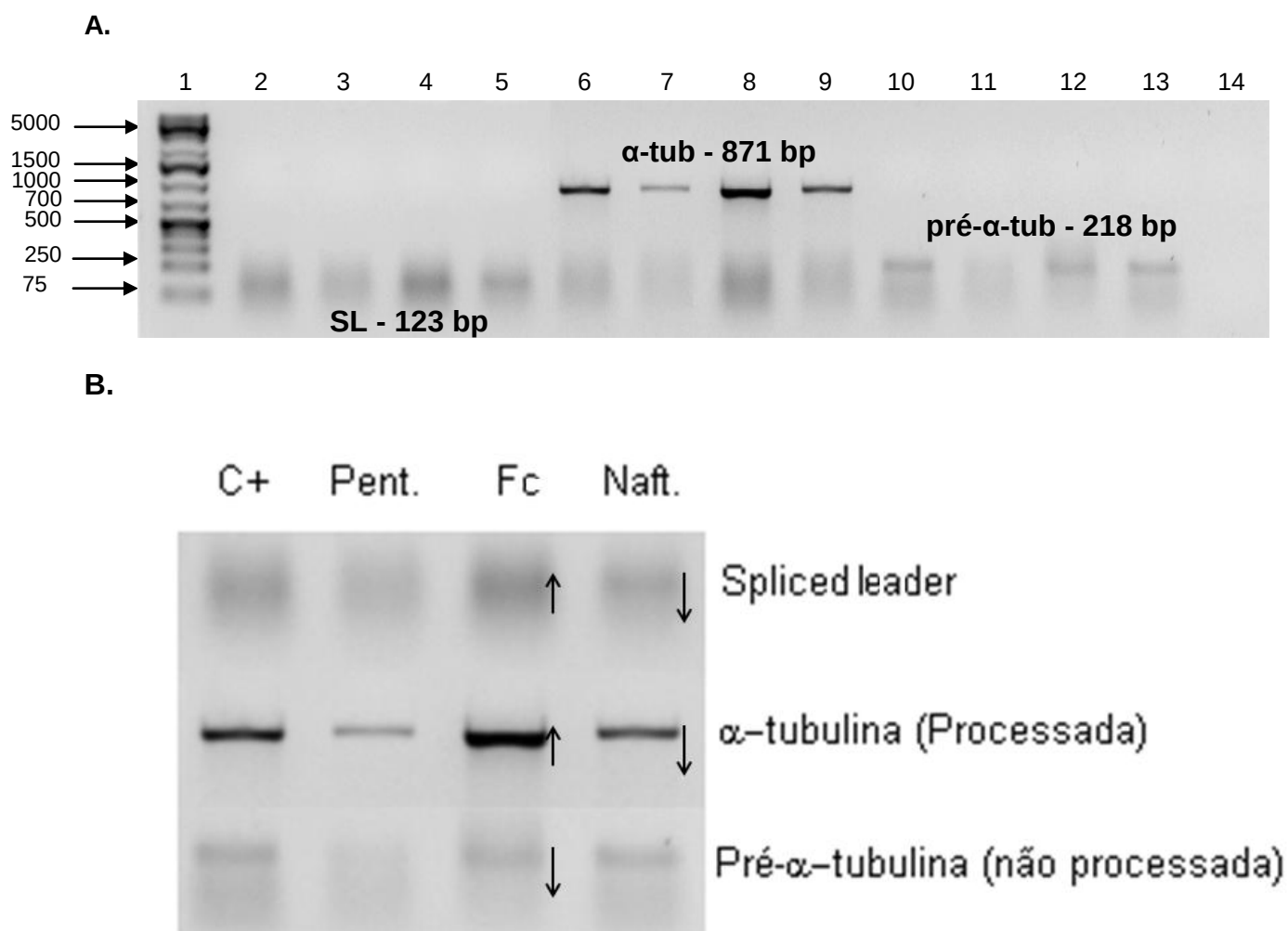


B) Random Hexamer Primer



Após a padronização da técnica, realizou-se novamente a reação de RT-PCR na condição padrão e modificada como descrito em materiais e métodos (item 3.5). A partir de uma única cultura de parasitas, realizou-se o tratamento com os compostos que apresentaram a melhor atividade tripanocida e índice de segurança superior a 10 de acordo com os parâmetros de escolha descritos em materiais e métodos (itens 4.1 e 4.2). Os resultados obtidos estão apresentados na figura 16.

Figura 16. A) Gel de agarose 1,5% com BrEt. **1.** *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas); **Spliced Leader** (7SL_S/7SL_AS): **2.** Sem substância (Controle +), **3.** Pentamidina, **4.** Diamina de ferroceno, **5.** Derivado de 1,4-naftoquinona; **α -tub** (processada, TS1/TS2): **6.** Sem substância, **7.** Pentamidina, **8.** Diamina de ferroceno, **9.** Derivado de 1,4-naftoquinona; **pré- α -tub** (não processada, TS3/TS4): **10.** Sem substância, **11.** Pentamidina, **12.** Diamina de ferroceno, **13.** Derivado de 1,4-naftoquinona; **14.** Controle negativo (TS1/TS2). **B)** Detalhe dos produtos obtidos na figura A indicando aumento ($\uparrow$) ou diminuição ($\downarrow$) dos RNAs amplificados, comparativamente ao controle (C+). C+: Controle positivo - cultura não tratada; Pent.: Cultura tratada com pentamidina; Fc: Cultura tratada com derivado de diamina de ferroceno; Naft.: Cultura tratada com derivado de 1,4-naftoquinona.



Os resultados da reação de RT-PCR possibilitaram confirmar a queda no nível de transcrito processado de α -tubulina (α -tub, banda de aproximadamente 871 pb) e do *Spliced Leader* - SL (banda de 123 bp), quando os parasitas foram tratados com o composto 2-metoxi-3-(2-feniletetil)-1,4-naftoquinona. Observou-se também uma discreta diminuição da forma não processada (pré- α -tub, banda de aproximadamente 218 pb) e acúmulo da forma processada (mRNA) e do SL, quando os parasitas foram tratados com o composto cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina. Esses resultados demonstram que os compostos interferem na reação de *trans-splicing*. No caso da diamina de ferroceno, corroborou-se este dado uma vez que foi possível observar acúmulo do SL-RNA e da forma processada da α -tubulina; o acúmulo da quantidade de mRNA maduro da α -tubulina sugere que o derivado da diamina de ferroceno poderia atuar posteriormente na tradução de proteínas. O nível de pré- α -tub não se alterou sob a ação do derivado de 1,4-naftoquinona, entretanto observou-se uma diminuição do SL e da α -tub, o que indica que este composto pode interferir na transcrição do *spliced leader*, afetando também a produção das formas processadas.

Estas informações geram novos questionamentos a serem respondidos futuramente, como, por exemplo: quais são as proteínas que interagem com os compostos durante o processamento? Como ocorre esta interação e qual é o papel específico destes compostos na reação de *trans-splicing*? Adicionalmente, será necessário realizar uma comparação com o processamento de transcritos primários via *cis-splicing* utilizando estes compostos, para determinar se os derivados testados nesta pesquisa interferem seletivamente no processamento de RNAs de tripanossomatídeos ou encontram-se também envolvidos no processo de *cis-splicing* dos eucariotos. Portanto, outros experimentos serão necessários para apontar possíveis mecanismos de ação destas moléculas no processamento de genes em tripanossomatídeos.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O ensaio fundamenta-se na propriedade do DPPH apresentar uma forte absorção no espectro visível, comprimento de onda de 515 nm, caracterizado por uma coloração violácea intensa, devido à presença de elétrons livres. Quando o DPPH é colocado em presença de substâncias capazes de sequestrar radicais

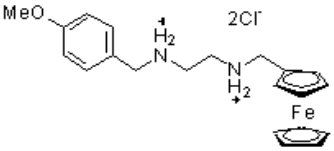
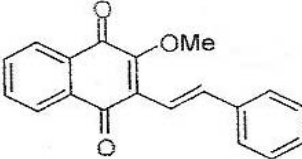
livres, a absorção é inibida, resultando em uma descoloração estequiométrica em relação ao número de elétrons retirados e independente de qualquer atividade enzimática. O grau de descoloração indica a capacidade sequestradora de radical livre (KOCH et al., 2002; COS et al., 2000).

Segundo a literatura, as quinonas de modo geral tem a capacidade de induzir o estresse oxidativo nas células. Estudos realizados indicam que o estresse oxidativo induzido pelo lapachol ocorre no nível da enzima P450 redutase. Neste processo, as espécies reativas do oxigênio promovem a cisão do DNA. Este tipo de mecanismo de ação é importante, pois alguns micro-organismos patogênicos são muito mais sensíveis ao estresse oxidativo que os humanos hospedeiros. Muitas pesquisas na área de doenças endêmicas, empregando triagens com quinonas, foram realizadas na busca de substâncias com atividade tripanocida. Acredita-se que o aumento de suas concentrações (condições mais oxidantes) favoreça a apoptose (SILVA et al., 2003).

No caso do grupo ferrocenil, sabe-se que compostos contendo este grupo podem atuar no meio biológico gerando radicais hidroxila da ordem de micromolar. Esta baixa concentração de radicais $\cdot\text{OH}$ seria suficiente para induzir dano significativo aos parasitas devido à alta reatividade dessas espécies. No caso do *P. falciparum*, os radicais $\cdot\text{OH}$ são conhecidos por serem particularmente agressivos frente a ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolípidos, promovendo extensa reação em cadeia e gerando diversos produtos de peroxidação. Dessa forma, poderia induzir diversos danos ao parasita e amplificar a inibição da formação da hemozoína (pigmento malárico), antes da ação de algum mecanismo de resistência (FRANCISCO; VARGAS, 2010).

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante dos compostos 2-metoxi-3-(2-feniletenil)-1,4-naftoquinona e cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina em diferentes concentrações demonstram que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente com a concentração dos compostos. A correlação entre o porcentagem de inibição do radical DPPH e a concentração dos compostos utilizados forneceu o valor de IC_{50} como se mostra na tabela 7.

Tabela 7. Atividade antioxidante de derivados de diamina de ferroceno e 1,4-naftoquinonas.

COMPOSTO	IC ₅₀ (µg/mL)
cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil) etano-1,2-diamina 	12,11
2-metoxi-3-(2-feniletetil)-1,4-naftoquinona 	< 100

Estas concentrações são altas se comparadas com antioxidantes por excelência, como o ácido ascórbico (IC₅₀ = 2,0 µg/mL), e o BHT (IC₅₀ = 5,0 µg/mL). Porém, observa-se que a diamina de ferroceno apresentou maior capacidade sequestradora de radical livre do que a naftoquinona.

Existe uma série de características que determinam a efetividade das moléculas como antioxidantes (RIVAS; GARCÍA, 2002):

1. A presença de substituintes com capacidade doadora de hidrogênio/elétrons e com apropriados potenciais de redução;
2. A capacidade para deslocalizar o radical resultante;
3. O potencial de quelação de metais de transição, que depende da natureza e disposição dos grupos funcionais na molécula;
4. A acessibilidade do antioxidante ao lugar de ação, que vem definido pelo caráter lipofílico ou hidrofílico, ou pelo coeficiente de repartição;
5. A interação dos radicais com outras moléculas antioxidantes.

Comparando as estruturas das duas moléculas, encontra-se que ambas tem em comum o grupo metoxi no anel aromático. Desta maneira, parece que este grupo contribuiu na estabilização do radical resultante por doação de elétrons aumentando, como consequência, a capacidade antioxidante. Adicionalmente, a presença do ferro é determinante para que o derivado de diamina de ferroceno possua maior atividade antioxidante quando comparado com o derivado 1,4-naftoquinona.

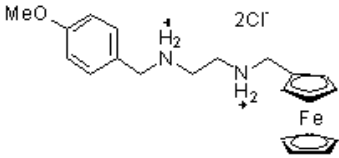
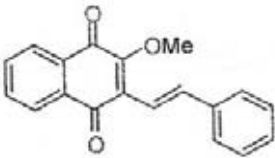
A atividade antioxidante gerada em presença do radical DPPH junto com os valores de citotoxicidade apresentados pelos compostos contra as cepas de *T. brucei* demonstram que as duas moléculas poderiam estar envolvidas no mecanismo de estresse oxidativo do parasita. Deste modo, moléculas com capacidade antioxidante podem atuar como pró-oxidantes, conforme estudado, sua propriedade de óxido-redução, dependendo do modelo celular. Eventualmente, essa propriedade das moléculas estudadas pode ser interessante para uso em medicamentos para controle da doença do sono.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Finalmente, na tabela 8 apresenta-se um resumo das atividades avaliadas pelos compostos cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina e 2-metoxi-3-(2-feniletenil)-1,4-naftoquinona, para determinar, com base nas diversas propriedades apresentadas, qual destes compostos poderia ser o melhor candidato para futuros estudos e, portanto, um composto promissor a ser utilizado no tratamento da doença do sono.

O derivado de diamina de ferroceno seria um excelente candidato para estudos futuros, devido a seu alto potencial como agente tripanocida, mostrando valores maiores ao reportado pela pentamidina e superando o valor obtido para o derivado de 1,4-naftoquinona. Além disso, o cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina apresentou um maior índice de segurança quando comparado com a pentamidina e o derivado da 1,4-naftoquinona. Também mostrou um maior poder antioxidante, portanto poderia atuar como pró-oxidante em *T. brucei* devido este parasita não apresenta formas intracelulares, o que faria que fosse sensível aos radicais hidroxila gerados pelo sal de ferroceno devido à capacidade de óxido-redução que possui (FRANCISCO; VARGAS, 2010).

Tabela 8. Comparação entre o derivado de diamina de ferroceno e 1,4-naftoquinona com potencial atividade tripanocida.

Composto	cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina	2-metoxi-3-(2-feniletetil)-1,4-naftoquinona	pentamidina
Estrutura			
Atividade tripanocida (<i>T. brucei</i> 427, μm)	0,36	4,72	6,43
Índice de segurança	51,67	>15	24,84
Atividade antioxidante ($\mu\text{g/ml}$)	12,11	<100	---
Alterações na produção de RNAs	Acúmulo α -tub e SL Diminuição pré- α -tub	Diminuição α -tub e SL	Ausência SL e pré- α -tub Diminuição α -tub

É de ressaltar que as diaminas possuem a propriedade de atravessar a barreira hematoencefálica, o que converte este composto em excelente candidato para ser usado no estágio II da doença. Por outro lado, o grupo ferrocenil é não tóxico e estável, o que favoreceria a qualidade de vida dos pacientes, visto que diminuiria os efeitos colaterais aos quais se encontram submetidos com os fármacos disponíveis para o tratamento (LEGROS, 2002; FRANCISCO; VARGAS, 2010).

A respeito das interferências observadas pelos compostos na reação de *trans-splicing*, mostrou-se que tanto a diamina de ferroceno como o derivado de 1,4-naftoquinona usados na reação de RT-PCR produziram alterações dos RNAs da α -tub, destacando-se que o cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina também poderia interferir na tradução da proteína, devido ao acúmulo da forma processada da α -tub. Em suma, pode-se considerar o derivado de diamina de ferroceno como composto de escolha para estudos posteriores de mecanismo de ação.

6 CONCLUSÕES

A troca do grupo benzil pelo grupo ferrocenil nos derivados de diaminas produz um aumento na atividade tripanocida das moléculas.

Os derivados 2-amina-1,4-naftoquinona, utilizados no presente trabalho, que possuem na sua estrutura cadeias alifáticas ligadas ao grupo amina apresentaram ausência ou menor atividade tripanocida que os derivados 1,4-naftoquinona com substituintes polares.

Em suma, os derivados de diaminas de ferroceno (cloridrato de N-(ferrocenilmetil)-N'-(4-metoxibenzil)etano-1,2-diamina) e 1,4-naftoquinonas (2-metoxi-3-(2-feniletenil)-1,4-naftoquinona) são bons candidatos para estudos posteriores em busca de fármacos com potencial tripanocida. Adicionalmente, ambas as moléculas apresentaram atividade antioxidante. Portanto, considera-se que estes compostos no parasita poderiam atuar como pró-oxidantes, de modo que poderiam estar envolvidos nos mecanismos de estresse oxidativo dos tripanossomos.

De acordo com a avaliação das possíveis interferências no processamento do RNA da alfa tubulina, demonstrou-se que tanto as diaminas de ferroceno como os derivados das 1,4-naftoquinonas podem interferir na reação de *trans-splicing*. Portanto, estudos do mecanismo de ação ou das interações destas moléculas com diversas proteínas envolvidas na reação de *trans-splicing* dos parasitas podem fornecer ferramentas para o desenvolvimento de medicamentos menos tóxicos, mais específicos e com maior eficácia no tratamento da doença do sono.

REFERÊNCIAS

- AMBRÓSIO, D. L.; BARBOSA, C. F.; VIANNA, V. F.; CICARELLI, R. M. B. *Trypanosoma cruzi*: establishment of permeable cells for RNA processing analysis with drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 617-620, 2004.
- AMBRÓSIO, D. L.; LEE, J. H.; PANIGRAHI, A. K.; NGUYEN, T. N.; CICARELLI, R. M. B.; GÜNZL, A. Spliceosomal proteomics in *Trypanosoma brucei* reveal new RNA splicing factors. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 7, p. 990-1000, 2009.
- BARBOSA, C. F.; OKUDA, E. S.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; CICARELLI, R. M. B. Rapid test for the evaluation of the activity of the prodrug hydroxymethylnitrofurazone in the processing of *Trypanosoma cruzi* messenger RNAs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 33-39, 2007.
- BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Química Nova na Escola**, n. 6, p. 3, 2005.
- BIOT, C.; GLORIAN, G.; MACIEJEWSKI, A.; BROCARD, J. S. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of a new ferrocene-chloroquine analogue. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 23, p. 3715-3718, 1997.
- BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.
- BRUGGINSSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445-448, 2002.
- BRUN, R.; BLUM, J. Human African trypanosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 261-273, 2012.
- BRUN, R.; SCHONENBERGER, M. Cultivation and *in vitro* cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. **Acta Tropica**, v. 36, n. 3, p. 289-292, 1979.
- CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; DASILVA, T. G.; VARGAS, M. D. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-(1,4)-naphthoquinone and derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 80, n. 2, p. 329-334, 2008.
- CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; PAROUL, N.; TONIAZZO, G.; ZBORALSKI, F.; PRICHOA, F. C.; KUBIAK, G. B.; LERIN, L. A. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de *canela-sassafrás* (*ocotea odorifera* (vell.) rowher). **Perspectiva**, v. 34, n. 127, p. 123-133, 2010.

CHIARI, B. G.; MARTINI, P. C.; MORAES, J. D. D.; ANDRÉO, R.; CORRÊA, M. A.; CICARELLI, R. M. B.; ISAAC, V. L. B. Use of HepG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **International Journal of Research in Cosmetics Science**, v. 2, n. 2, p. 8-14, 2012.

COE, B. J.; CHRISTOPHER, J. J.; McCLEVERTY, J. A. An assessment of second harmonic generation by donor acceptor molecules containing stilbenyl or diarylazo bridges between ferrocenyl donor and nitro acceptor groups. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 464, n. 1, p. 225-232, 1994.

COS, P.; CALOMME, M.; PIETERS, M.; VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGHE, D. Structure-activity relationship of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, p. 307-341, 2000.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703-711, 2009.

COX, F. E. G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infections Disease Clinics of North America**, v.18, n. 2, p. 231-245, 2004.

CROOS, G.; MANNING, J. Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi-defined and defined media. **Parasitology**, v. 67, n. 3, p. 315-331, 1973.

DELHAES, L.; ABESSOLO, H.; BIOT, C.; BERRY, L.; DELCOURT, P.; MACIEJEWSKI, L.; BROCARD, J.; CAMUS, D.; DIVE, D. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of ferrochloquine, a ferrocenyl analogue of chloroquine against chloroquine-resistant malaria parasites. **Parasitology Research**, v. 87, n. 3, p. 239-244, 2001.

DOMARLE, O.; BLAMPAIN, G.; AGNANIET, H.; NZADIYABI, T.; LEBIBI, J.; BROCARD, J.; MACIEJEWSKI, L.; BIOT, C.; GEORGES, A. J.; MILLET, P. *In vitro* antimalarial activity of a new organometallic analog, ferrocene-chloroquine. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 42, n. 3, p. 540-544, 1998.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 119-122, 2005.

FALCÃO, D. Q.; COSTA, E. R.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KUSTER, R. M.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Revista Brasileira de FÁrmacognosia**, v. 16, p. 73-76, 2006.

FARRELL, N. P. Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. In: McCLEVERTY, J. A.; MEYER, T. J. (Ed.). **Comprehensive coordination chemistry II**. Oxford: Elsevier, 2003. v. 9, p. 809-840.

FRAGOSO, T. P.; CARNEIRO, J. W. de M.; VARGAS, M. D. Aminequinone-hydroxylquinoneimine tautomeric equilibrium revisited: molecular modeling study of the tautomeric equilibrium and substituent effect in 4-(4-R-phenylamino)naphthalene-1,2-diones. **Journal Molecular Model**, v. 16, p. 825-830, 2010.

FRANCISCO, A. I.; VARGAS, M. D. Ferroquina: o antimalárico do futuro. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 118-129, 2010.

FRANCISCO, A. I.; CASELLATO, A.; NEVES, A. P.; CARNEIRO, W. M.; VARGAS, M. D.; VISENTIN, L. C.; CÂMARA, C. A.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MARINHO FILHO, J. D. B.; MORAES, M. O. de. Novel 2-(R-phenyl)amino-3-(2-methylpropenyl)-[1,4]-naphthoquinones: synthesis, characterization, electrochemical behavior and antitumor activity. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 21, n. 1, p. 169-178, 2010.

FRAYHA, G. J.; SMYTH, J. D.; GOBERT, J. G.; SAVEL, J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. **General Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 273-299, 1997.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Doença de Chagas**: estudo por microscopia eletrônica de transmissão. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=70>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

GARCIA, L. S. **Diagnostic medical parasitology**. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2001. p. 235-244.

GORDON, C. M. New developments in catalysis using ionic liquids. **Applied Catalysis A: General**, v. 222, n. 1/2, p. 101-117, 2001.

HECK, R. F. Acylation, methylation and carboxyalkylation of olefins by group VIII metal derivatives. **Journal of American Chemistry Society**, v. 90, p. 5518-5526, 1968.

HEILMANN, J. B.; HILLARD, E. A.; PLAMONT, M.; PIGEON, P.; BOLTE, M.; JAOUEN, G.; VESSIÈRES, A. Ferrocenyl compounds possessing protected phenol and thiophenol groups: synthesis, X-ray structure, and *in vitro* biological effects against breast cancer. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 693, n. 8/9, p. 1716-1722, 2008.

HILLARD, E. A.; VESSIÈRES, A.; THOUIN, L.; JAOUEN, G.; AMATORE, C. A. Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 2, p. 285-290, 2006.

HORN, D.; McCULLOCH, R. Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 700-705, 2010.

JAOUEN, G.; VESSIÈRES, A. Bioorganometallic chemistry: a future direction for transition metal organometallic chemistry? **American Chemical Society**, v. 26, n. 7, p. 361-369, 1993.

KAPADIA, G. J.; AZUINES, M. A.; BALASUBRAMANIAN, V.; SRIDHAR, R. Aminonaphthoquinones: a novel class of compounds with potent antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*. **Pharmacology Research**, v. 43, p. 363-367, 2001.

KENNEDY, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 496-504, 2004.

KOCH, T. R.; STRYKER, S. J.; TELFORD, G. L.; OPARA, E. C.; OZBEN, T. Total antioxidant capacity is reduced in Crohn's disease. **Nutrition Research**, v. 22, n. 7, p. 825-833, 2002.

LANTERI, C. A.; TIDWELL, R. R.; MESHNICK, S. R. The mitochondrion is a site of trypanocidal action of the aromatic diamidine DB75 in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 875-882, 2008.

LARGERON, M.; LOCKHART, B.; PFEIFFER, B.; FLEURY, M. B. Synthesis and *in vitro* evaluation of new 8-amino-1,4-benzoxazine derivatives as neuroprotective antioxidants. **Journal of Medical Chemistry**, v. 42, p. 5043-5052, 1999.

LEGROS, D.; OLLIVIER, G.; GASTELLU-ETCHEGORRY, M.; PAQUET, C.; BURRI, C.; JANNIN, J.; BUSCHER, P. Treatment of human African trypanosomiasis present situation and needs for research and development. **Lancet Infect**, v. 2, n. 7, p. 437-440, 2002.

LIMA, N. M. F.; CORREIA, C. S.; FERRAZ, P. A. L.; PINTO, A. V.; PINTO, M. R. F.; SANTANA, A. E. G.; GOURLAT, M. D. F. Molluscicidal hydroxynaphthoquinones and derivatives: correlation between their redox potentials and activity against *Biomphalaria glabrata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 6, p. 822-829, 2002.

LÓPEZ, L.; LEYVA, I.; GARCIA DE LA CRUZ, R. F. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 42, n. 1, p. 6-17, 2011.

MAYER, M. G.; FLOETER-WINTER, L. M. Pre-mRNA *trans-splicing*: from kinetoplasts to mammals, an easy language for life diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 501-501, 2005.

MAYER, M. G.; GONZAGA DOS SANTOS, M.; SILVA, M. F. L. da; FLOETER-WINTER, L. M. Footprints of a trypanosomatid RNA world: pre-small subunit rRNA processing by spliced leader addition *trans-splicing*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 522-531, 2012.

MEDECINS SANS FRONTIERES. **Relatório anual 2008**. Disponível em: <<https://www.msf.org.br/arquivos/Doc/Publicacoes/83.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. dos; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MICHAELI, S. *Trans-splicing* in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, v. 6, p. 459-474, 2011.

MICHAELI, S.; PODELL, D.; AGABIAN, N.; ULLU, E. The 7SL RNA homologue of *Trypanosoma brucei* is closely related to mammalian 7SL RNA. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, p. 55-64, 1992.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONZOTE, L.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; MARTINEZ-DIAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R.; GOMEZ-BARRIO, A. *In vitro* screening of American plants extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1/2, p. 101-107, 2000.

MULLER, I. A.; VARGAS, M. D.; TORRES, J. C.; SILVA, C. A.; PINTO, A. C. Síntese de 2-(1-alquenil)-3-metoxi-1,4-naftoquinonas com potencial atividade anticâncer via reação de Heck. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. **Resumos...** São Paulo: SBQ, 2006.

NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 6, p. 399-403, 1991.

NAVARRO, A. E.; SPINELL, N.; CHAIX, C.; MOUSTROU, C.; MANDRAND, B.; BRISSET, H. Supported synthesis of ferrocene modified oligonucleotides as new electroactive DNA probes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 2439-2441, 2004.

NEUSE, E. W. Macromolecular ferrocene compounds as cancer drug models. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 15, n. 1, p. 3-32, 2005.

NEVES, A. P.; SILVA, G. B. da.; VARGAS, M. D.; PINHEIRO, C. B.; VISENTIN, L. C.; MARINHO FILHO, J. D. B.; ARAÚJO, A. J.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. D. de. Novel platinum (II) complexes of 3-(aminomethyl)naphthoquinone mannish bases: synthesis, crystal structure and cytotoxic activities. **The Royal Society of Chemistry**, v. 39, p. 10203-10216, 2010.

NILSEN, T. W. Trans-splicing: an update. **Molécular and Biochemical Parasitology**, v. 73, n. 1/2, p. 1-6, 1995.

NOK, A. J. Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis. **Parasitology Research**, v. 90, n. 1, p. 71-79, 2003.

PASSERINI, G. **Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da família Piperaceae em formas epimostigotas de *Trypanosoma cruzi***. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

PEACOCK, L.; FERRIS, V.; BAILEY, M.; GIBSON, W. Fly transmission and mating of *Trypanosoma brucei brucei* strain 427. **Molécular and Biochemical Parasitology**, v. 160, p. 100-106, 2008.

PEREIRA, A.; PÉREZ, M. Tripanosomosis: enfermedad de chagas y enfermedad del sueño. **Parasitología**, v. 22, n. 2, p. 104-111, 2003.

PERIS, M.; SIMPSON, A. M.; GRUNSTEIN, J.; LILIENTAL, J. E.; FRECH, G. S.; SIMPSON, L. Native gel analysis of ribonucleoprotein complexes from a *Leishmania tarentolae* mitochondrial extract. **Molécular and Biochemical Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 9-24, 1997.

PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. de. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, v. 14, p. 4570-4590, 2009.

RALAMBOMANANA, D. A.; RAZAFIMAHEFA-RAMILISON, D.; RAKOTOHOVA, J. M.; PÉLINSKI, L. Synthesis and antitubercular activity of ferrocenyl diaminoalcohols and diamines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 21, p. 9546-9553, 2008.

RIVAS, G. J. C.; GARCÍA, A. M. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. **Alimentación, Nutrición y Salud**, v. 9, n. 2, p. 31-38, 2002.

SAI-KRISHNA, A. D.; PANDA, G.; KONDAPI, A. K. Mechanism of action of ferrocene derivatives on the catalytic activity of topoisomerase II alpha and beta: distinct mode of action of two derivatives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 438, n. 2, p. 206-216, 2005.

SALMON-CHEMIN, L.; BUISINE, E.; YARDLEY, V.; KOHLER, S.; DEBRE, M. A.; LANDRY, V.; SERGHERAERT, Ch.; CROFT, S. L.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; DAVIOUD-CHARVET, E. 2- and 3- substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and *in vitro* cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 548-565, 2001.

SASSA, S.; SUGITA, O.; GALBRAITH, R. A.; KAPPAS, A. Drug metabolism by the human hepatoma cell, HepG2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 143, n. 1, p. 52-57, 1987.

SCHATZSCHNEIDER, U.; METZLER-NOLTE, N. New principles in medicinal organometallic chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 10, p. 1504-1507, 2006.

SHIBATA, S.; GILLESPIE, R.; KELLEY, A. M.; NAPULI, A. J.; ZHANG, Z.; KOVZUN, K. V.; PEFLEY, R. M.; LAM, J.; ZUCKER, F.; VOORHIS, W. C. V.; MERRITT, E. A.; HOL, W. G. J.; VERLINDE, C. L. M. J.; FAN, E.; BUCKNER, F. S. Selective inhibitors of methionyl-tRNA synthetase have potent activity against *Trypanosoma brucei* infection in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 1982-1989, 2011.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, E. M. C. B. V. de. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SILVA, M. T. A. **Identificação e caracterização funcional de proteínas específicas do complexo U5 snRNP em tripanossomatídeos**. 2009. 98 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

SILVA, M. T. A.; AMBRÓSIO, D. L.; TREVELIN, C. C.; WATANABE, T. F.; LAURE, H. J.; GREENE, L. J.; ROSA, J. C.; VALENTINI, S. R.; CICARELLI, R. M. B. New insights into trypanosomatid U5 small nuclear ribonucleoproteins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 130-138, 2011.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; BARBOSA, T. P.; SOARES, A. Z.; DACUNHA, L. C.; ANGELO C.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D. Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 193-196, 2005.

SOUTO-PADRON, T.; CUNHA, N. L.; SOUZA, W. Acetylated α -tubulin in *T. cruzi*: immuno cytochemical localization. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 517-528, 1993.

STEPNICKA, P.; CISAROVÁ, I.; PODLAHA, J.; LUDVIK, J.; NEJEZCHLEBA, M. Synthesis, characterization and X-ray structural, electrochemical and Mössbauer study of mercury(II) complexes with 1'-(diphenylphosphino)ferrocenecarboxylic acid. **Organometallic Chemistry**, v. 582, n. 2, p. 319-327, 1999.

STICH, A.; ABEL, P. M.; KRISHMA, S. Human African trypanosomiasis. **Clinical Review, BMJ**, v. 325, p. 203-206, 2002.

STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. The role of intron structures in trans-splicing and cap 4 formation for the *Leishmania* spliced leader RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 19361-19367, 1999.

STURM, N. R.; YU, M. C.; CAMPBELL, D. A. Transcription termination and 3'-End processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. **Molecular and Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 1595-1604, 1999.

SZARKA, Z. R.; FÖLDES, S.; KOLLÁR, L. Facile synthesis of novel ferrocene α -ketoamides via homogeneous catalytic carbonylation. **Tetrahedron Letter**, v. 42, n. 4, 739-741, 2001.

TEIXEIRA, A. R. L.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, n. 974, p. 788-798, 2006.

TEIXEIRA, M. J.; ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HULANDA, J. G.; RODRIGUEZ, T. A.; PRATA, J. R. C.; COELHO, I. C. B.; RAO, V. S.; POMPEU, M. M. L. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (Lapachol). **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 44-48, 2001.

TSCHUDI, C.; ULLU, E. Destruction of U2, U4, or U6 small nuclear RNA blocks trans-splicing in trypanosome cells. **Cell**, v. 61, n. 3, p. 459-466, 1990.

ULLU, E.; TSCHUDI, C. Accurate modification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 35, p. 20365-20369, 1995.

VAN STAVEREN, D.; METZLER-NOLTE, N. Bioorganometallic chemistry of ferrocene. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 5931-5985, 2004.

WASS, J. A. Origin 7.0. **Biotech Software and Internet Report**, v. 3, n. 5/6, p. 130-133, 2002.

WHELAND, G. W. **The Theory of resonance and its application to organic chemistry**. New York: J. Wiley and Sons, 1944. 316 p.

WIRTZ, E.; CLAYTON, C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science**, v. 268, n. 5214, p. 1179-1183, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human African trypanosomiasis (sleeping sickness) Fact sheet N°259**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>>. Acesso em: 20 out. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact sheet N°340**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 20 out. 2012.