



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS

INSTITUTO BIOMÉDICO – IB

UYLA ORNELLAS GARCIA

**INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE COMPOSTOS
TRIAZÓLICOS: TERAPÊUTICA PROMISSORA PARA INFECÇÕES POR
TRIPANOSSOMATÍDEOS.**

Rio de Janeiro

2017

UYLA ORNELLAS GARCIA

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE HEPÁTICA E MUTAGENICIDADE DE
COMPOSTOS TRIAZÓLICOS: TERAPÊUTICA PROMISSORA PARA INFECÇÕES
POR TRIPANOSSOMATÍDEOS.**

Monografia apresentada como requisito
parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina pela
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro.

Orientador Acadêmico: Prof. Dra. Cláudia Alessandra Fortes Aiub

Orientador Científico: Prof. MSc. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira

Rio de Janeiro

2017

Garcia, Uyla Ornellas.

Investigação da citotoxicidade, mutagenicidade de compostos triazólicos: terapêutica promissora para infecções por tripanossomatídeos.
Orientadora: Profa. Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub. Rio de Janeiro, 2017.

58 fl.

Monografia de graduação em Bacharelado em Biomedicina –
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Palavras-chave: Mutagenicidade, toxicidade, doença de Chagas, derivados triazólicos, citotoxicidade

UYLA ORNELLAS GARCIA

**INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE COMPOSTOS
TRIAZÓLICOS: TERAPÊUTICA PROMISSORA PARA INFECÇÕES POR
TRIPANOSSOMATÍDEOS.**

Orientador Acadêmico: Prof. Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub

Orientador Científico: Prof. Msc. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub (Presidente)

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Prof. Msc. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira (Titular)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dr. Frederico Silva Castelo-Branco

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Prof. Dra. Joelma Freire de Mesquita

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, e ao meu cachorro, Brutus; por serem o meu pedaço de casa em qualquer lugar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a minha mãe, Lina. Por toda a minha vida, obrigado mãe.

Ao universo, agradeço por toda a energia ao longo desses anos.

Ao meu pai, Fernando, por acreditar em mim todos os dias e sempre me dizer que eu posso, e que se não der, é só tentar de novo. A gente se escolheu há muito tempo, e nada vai mudar isso, pai.

A minha irmã, que ainda me acha a pessoa mais inteligente desse mundo. Muito obrigado, Pink.

A minha avó, Sueli, por ser meu pensamento de conforto nas horas difíceis.

Ao meu maninho, que vai ser sempre meu melhor amigo, independente do tempo que fiquemos separados, seremos sempre nós dois.

À minha segunda família, que nesses anos muito doidos, estiveram sempre aqui. Em especial, a Dona Regina, por ter me dado um espaço no seu coração.

Ao Sérgio, obrigado por ser meu abraço casa. Por não me deixar desistir no primeiro fracasso e entender que às vezes, eu só precisava de um café quente e de uma pizza de muçarela.

As minha amigas de turma, obrigada por terem feito essa jornada tão especial. Aos meus amigos de fora da turma, obrigada pelos piqueniques, tecidos e vamos marcar de todos os dias, quando eu achava que não havia mais pessoas incríveis para conhecer, olha só vocês aí.

Aos meus amigos do laboratório, agradeço imensamente os gritos de incentivo durante os experimentos, as conversas nos almoços e as horas até tarde que passamos no departamento. Bella, Gui, Gabi e Ayke; não consigo imaginar meus dias no laboratório sem vocês, obrigada por não me deixarem desistir.

À Camila, que enfrentou essa loucura toda comigo desde o começo. Obrigada por me fazer amiga e tia.

Agradeço à Profa. Dra. Claudia Aiub pela oportunidade, pela confiança, e por me mostrar que é nos momentos ruins que crescemos e, aprendemos.

Ao meu orientador científico, Carlos Fernando, gostaria de agradecer pelas dúvidas tiradas, pela atenção e ajuda dada durante esse período.

Por fim, gostaria de agradecer aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e por estarem acompanhando e participando deste momento tão aguardado.

“O conhecimento nos faz responsáveis.”

Che Guevara

RESUMO

GARCIA, Uyla Ornellas. *Investigação da citotoxicidade e mutagenicidade de compostos triazólicos: terapêutica promissora contra infecções por tripanossomatídeos*. 2017. 58 f. Monografia (Bacharel em Biomedicina) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A Tripanossomíase Americana é uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina, e ainda não possui uma terapia efetiva principalmente na fase crônica da doença, e os medicamentos existentes, que são efetivos somente na fase aguda, apresentam desvantagens como toxicidade e resistência de algumas cepas do *Trypanosoma cruzi*. Assim, urge à necessidade de desenvolver substâncias seguras e que promovam cura nas fases crônica e aguda da doença e, para tal, novas estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas, sendo destaque contra infecções por tripanossomatídeos, os estudos sobre derivados triazólicos, que agiram na membrana do protozoário de forma similar ao que é visto em membranas fúngicas. Desta maneira, foi realizada a síntese de uma série de derivados triazólicos, de série PFCT, com potencial atividade antichagásica, com mecanismo de ação proposto na inibição da biossíntese de ergosterol pela inibição da enzima 14 α -desmetilase, mesmo mecanismo de ação de seu protótipo, o antifúngico Fluconazol. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a toxicidade do Fluconazol e de duas amostras derivadas do mesmo em modelos experimentais *in vitro*. Para o Fluconazol, foi observada citotoxicidade em todas as cepas, TA97 (0,5 μ M), TA98 e TA102 (5 μ M) e TA100 (50 μ M), sem indicação de mutagenicidade positiva. A amostra PFCT 012/14 observa-se citotoxicidade para a TA97 (50 μ M), TA100 e TA102 (5 μ M), sem resposta mutagênica. Para o PFCT 015/14, quando analisada a resposta dose dependente, na concentração de 50 μ M/placa, o composto foi considerado mutagênico. Ainda assim, é o derivado mais promissor quando comparado ao de série PFCT 012/14 e ao Fluconazol.

Palavras-chave: Mutagenicidade, toxicidade, doença de Chagas, derivados triazólicos, citotoxicidade

ABSTRACT

GARCIA, Uyla Ornellas. Investigation of cytotoxicity and mutagenicity of triazole compounds: promising therapy against trypanosomatid infections. 2017. 58f. Monograph (Bachelor in Biomedicine) – Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

American Trypanosomiasis is a disease that affects millions of people in the world, especially in Latin America, and does not yet have effective therapy, especially in the chronic phase of the disease, and existing drugs that are effective only in the acute phase present disadvantages such as toxicity and resistance of some strains of *Trypanosoma cruzi*. Thus, it is urgent to develop safe substances that promote healing in the chronic and acute phases of the disease and, for this, new therapeutic strategies have been studied, being emphasized against infections by trypanosomatids, studies on triazolic derivatives that would act on the membrane of the Protozoa similar to what is seen in fungal membranes. In this way, a series of triazolic derivatives from PFCT series with potential antichagasic activity and a proposed mechanism of action by the inhibition of ergosterol biosynthesis by the inhibition of the 14 α -demethylase enzyme, were also synthesized, as well as the mechanism of action of its prototype, the antifungal Fluconazole. Therefore, the objective of this work was to investigate the toxicity of Fluconazole and two samples derived from it in experimental models *in vitro*. For Fluconazole, cytotoxicity was observed in all strains, TA97 (0.5 μ M), TA98 and TA102 (5 μ M) and TA100 (50 μ M), without indication of positive mutagenicity. The PFCT 012/14 sample shows cytotoxicity for TA97 (50 μ M), TA100 and TA102 (5 μ M), with no mutagenic response. For PFCT 015/14, when the dose-dependent response was analyzed at the concentration of 50 μ M / plate, the compound was considered mutagenic. Nevertheless, it is the most promising derivative when compared to PFCT 012/14 series and Fluconazole.

Keywords: Mutagenicity, toxicity, Chagas disease, triazole derivatives, cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Distribuição de casos de <i>Trypanosoma cruzi</i> , baseado em estimativas oficiais e a distribuição da transmissão vetorial, a nível mundial, de 2006 a 2009	16
Figura 02	Ciclo da Doença de Chagas	18
Figura 03	Estrutura molecular do Nifurtimox	22
Figura 04	Estrutura molecular do Benzonidazol	23
Figura 05	Estrutura molecular do Fluconazol	26
Figura 06	Mecanismo de ação dos Inibidores da Síntese de Ergosterol	27
Figura 07	Parâmetro de análise do Ensaio WST-1	35

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 01	Características do Fluconazol e seus derivados	33
Tabela 02	Concentrações utilizadas no experimento	37
Tabela 03	Efeito <i>in vitro</i> (LC50) dos compostos estudados em culturas em monocamadas de células de hepatoma humano da linhagem HepG2 após 3 e 24 horas de tratamento incubadas à 37°C e 5% de CO ₂ , representando seu potencial hepatotóxico	40
Tabela 04	Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do Fluconazol	43
Tabela 05	Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do derivado PFCT 012/14, sem metabolização	44
Tabela 06	Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do derivado PFCT 015/14, sem metabolização	45
Tabela 07	Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do derivado PFCT 015/14, com metabolização	46
Quadro 01	Características das cepas padrão utilizadas no Teste de Ames	36
Quadro 02	Resultado teste qualitativo de reversão bacteriana	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%Sob.	Percentual de sobrevivência
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZ	Benzonidazol
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DC	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
FIOCRUZ	Instituto de Tecnologia Farmacêutica da Fundação Oswaldo Cruz
His-	Cepas bacterianas deficientes na síntese do aminoácido histidina
IBEs	Inibidores da síntese de ergosterol
IM	Índice de mutagenicidade
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
LB	Louria Bertani
NFX	Nifurtimox
OECD	Organization for Economic Cooperation & Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (salina tamponada com fosfato)
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
SOD	Superóxido dismutase

TR	Tripanotiona Redutase
WST-1	<i>Water Soluble Tetrazolium One</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Doença de Chagas	15
1.1.1 Etiologia.....	16
1.1.2 Diagnóstico.....	20
1.1.3 Estratégias Terapêuticas	20
1.2 Novos Sistemas Terapêuticos	22
1.2.1 Compostos triazólicos.....	24
1.2.2 Fluconazol	26
1.2.3 Derivados do Fluconazol	27
1.2.4 Avaliação de segurança de novos compostos	28
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos Gerais	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. METODOLOGIA	30
3.1 Amostras para estudo	31
3.2 Ensaio de viabilidade celular com WST-1	31
3.3 Cepas bacterianas utilizadas	33
3.4 Teste de Ames	34
3.4.1 Teste qualitativo de sobrevivência bacteriana.....	34
3.4.2 Teste quantitativo de reversão bacteriana	35
3.5 Ensaio de sobrevivência bacteriana	36
4. RESULTADOS	38
4.1 Ensaio de viabilidade celular com WST-1	38
4.2 Teste de Ames	39
4.2.1 Teste qualitativo de sobrevivência bacteriana.....	39
4.2.2 Teste quantitativo de reversão bacteriana	40
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

Infecções causadas por tripanossomatídeos vêm sendo estudadas na busca por novas vias de tratamento, em especial para moléstias como a tripanossomíase americana, descoberta pelo médico sanitário Carlos Chagas em 1909 (MALAFAIA, 2010).

1.1 Doença de Chagas

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tripanossomíase americana é classificada como uma doença negligenciada, que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo, principalmente na América Latina (Figura 01) (OMS, 2015).

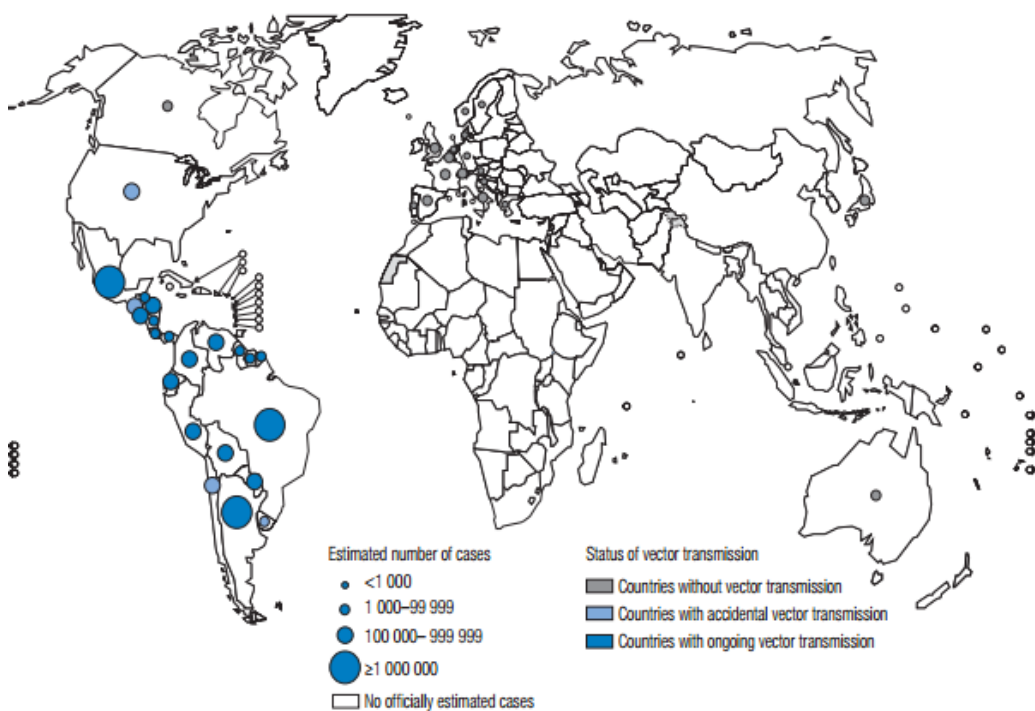


Figura 01 Distribuição de casos de *Trypanosoma cruzi*, baseado em estimativas oficiais e a distribuição da transmissão vetorial, a nível mundial, de 2006 a 2009 (adaptado de: OMS, 2010).

O foco de disseminação pelos países da América Latina está intimamente ligado à dificuldade de acesso a políticas habitacionais governamentais e a precariedade das condições de moradia, pois essas favorecem a nidificação dos

vetores da doença conhecidos popularmente como “barbeiros” (DIAS, 2001; COURA, 2010, DIAS *et al.*, 2015).

Apesar da disseminação ligada a baixas condições da população, nos últimos anos, devido ao acelerado processo migratório entre os continentes, a doença de chagas passou a ser foco de atenção em países desenvolvidos como Estados Unidos e Espanha, com aumento no número de casos e tornando-se um problema de saúde pública, já que esses países não possuem controle sobre a disseminação da doença, principalmente pela triagem em bancos de sangue (COURA, 2010).

1.1.1 Etiologia

O agente etiológico da doença de chagas (DC), denominado *Trypanosoma cruzi*, é um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, do gênero *Trypanosoma cruzi* sp. São caracterizados pela presença do cinetoplasto (DNA mitocondrial), que se encontra próximo ao único flagelo do protozoário. A localização do cinetoplasto difere de acordo com o estágio que o protozoário se encontra durante o ciclo biológico (ARAUJO-JORGE & CASTRO, 2000).

Na forma tripomastigota, o cinetoplasto está localizado na porção posterior do corpo flagelar. Na forma epimastigota, se localiza na parte anterior ao núcleo e na forma amastigota, o cinetoplasto não é visível na microscopia ótica, encontrando-se próximo a um flagelo não proeminente (DIAS & COURA, 1997).

A transmissão é feita por um triatomíneo estritamente hematófago, pertencente à subfamília: Triatominae. Dentre as espécies conhecidas atualmente, os de maior importância clínica são os do gênero *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (OMS, 2015). Além da transmissão vetorial, pode ocorrer transmissão via placentária (congênita), por transfusão sanguínea, além da via oral, dada também ingestão de alimentos contaminados pelo *T. cruzi* (OMS, 2015).

O ciclo desse parasita flagelado é heteroxênico, começando ainda no organismo do hospedeiro invertebrado (triatomíneo) (Figura 02).

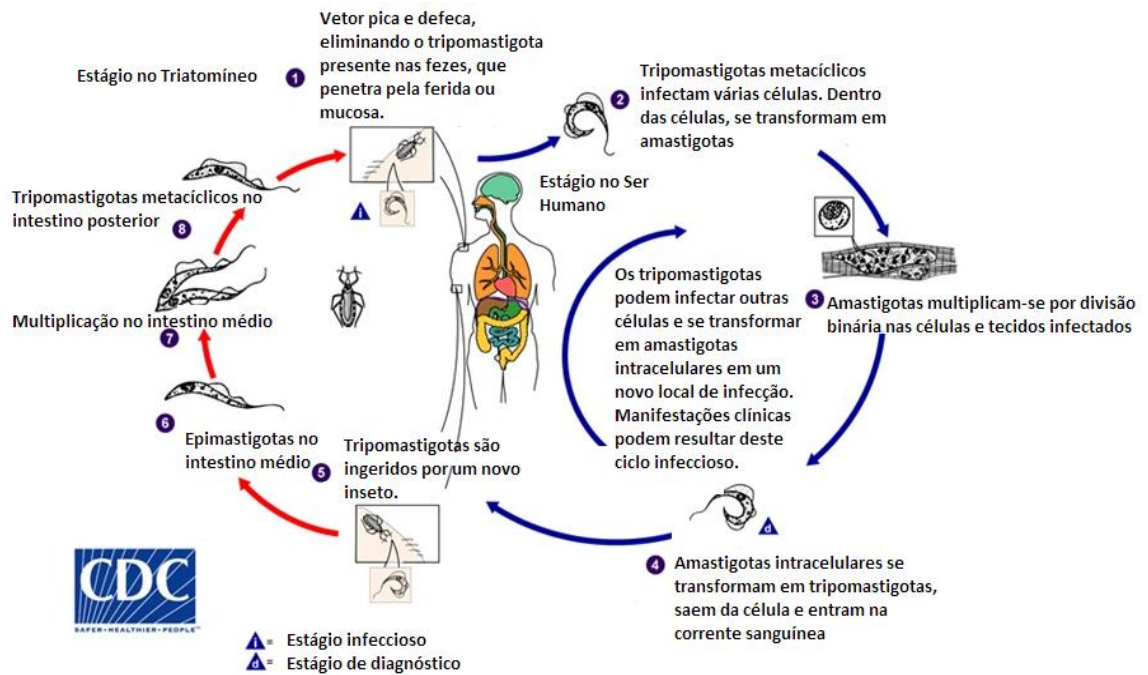


Figura 02. Ciclo da Doença de Chagas (Fonte: adaptado de CDC Chagas Disease)

No hospedeiro invertebrado, o parasito ao ser ingerido, em sua forma tripomastigota sanguínea, passa por transformações ao longo do tubo digestivo do vetor, migrando do intestino anterior para o intestino médio do triatomíneo, onde se diferenciam em formas fusiformes, denominadas epimastigotas (ARAÚJO-JORGE & CASTRO, 2000).

Ao chegar ao intestino médio, ocorre à multiplicação por fissão binária dos epimastigotas, que ao atingirem o reto do triatomíneo e aderirem às células epiteliais, passando por um processo denominado metaciclogênese, que devido a queda do pH e ao estresse metabólico, estimula a forma epimastigota a ,diferenciar-se em formas metacíclicas, os tripomastigotas metacíclicos, que perdem a adesão ao epitélio intestinal, sendo liberados na luz da porção distal do tubo digestivo, sendo eliminados nas fezes do vetor (DIAS, 1997; CAMPOS, 2007).

Ao picar o homem, o barbeiro elimina pelas fezes, durante ou após o repasto sanguíneo, as formas infectantes tripomastigotas metacíclicas que podem penetrar no local de lesão, provocado pela picada ou por solução de continuidade, ocasionada pelo ato de coçar o local, devido à reação alérgica causada pela saliva do vetor (DIAS, 1997; ARAUJO-JORGE & CASTRO, 2000).

Esses tripomastigotas metacíclicos, ao chegarem à corrente sanguínea, passam a ser chamados de tripomastigotas sanguíneos, permanecendo por algum tempo circulando no sangue, onde são fagocitados por células sem grande capacidade fagocitária, ocorrendo a fusão de lisossomos para formar o vacúolo parasitóforo, o que leva a uma acidificação da luz do vacúolo, submetendo o parasito a condições de estresse necessárias para que se diferencie em amastigotas (DIAS, 1997; ARAUJO-JORGE & CASTRO, 2000).

Quando o parasita invade células, como os macrófagos, a internalização pode ocorrer através da fusão dos lisossomos com fagossomo, formando-se assim o vacúolo parasitóforo, com conteúdo de caráter ácido.

A membrana do vacúolo parasitóforo maduro logo se rompe liberando os parasitas no citoplasma da célula hospedeira. No citosol, o parasito diferencia-se em amastigota, iniciando sua multiplicação por fissão binária (DIAS, 1997; ARAUJO-JORGE & CASTRO, 2000).

Nessa fase, com o rompimento do vacúolo, ocorre a liberação de novos parasitos, com a invasão de novas células; além de componentes celulares. Os parasitas então chegarão novamente a corrente sanguínea, agora na forma de tripomastigota invadindo células de outros órgãos, como macrófagos e células de Schwann e, após a entrada nessas células, irão se diferenciar, passando novamente a circulação sistêmica e fechando o ciclo, que pode reiniciar diversas vezes (DIAS, 1997; ARAUJO-JORGE & CASTRO, 2000).

Além disso, a forma tripomastigota pode ser ingerida por um novo inseto. No vetor, esses tripomastigotas passarão por nova transformação no intestino, para epimastigota, onde sofrerão novamente uma divisão binária, formando

novos tripomastigotas metacíclicos, que serão liberados pelas fezes do barbeiro, reiniciando o ciclo (DIAS, 1997).

O período de incubação da Doença de Chagas varia de acordo com a via de transmissão, sendo de 5 a 15 dias na vetorial, de 30 a 40 dias na via de transfusão sanguínea, do quarto ao nono mês de gestação na via transplacentária (congenita) e de 7 a 22 dias para via oral.

A doença possui duas fases. O período pré-patente, é marcado por uma reação inflamatória no local da penetração do parasita devido à saliva do barbeiro, sendo caracterizada pela coceira e vermelhidão no local, denominado Chagoma de inoculação. Após o período de incubação, inicia-se a fase aguda, com elevada parasitemia. Os sintomas são prodrômicos, como mal estar, febre, mialgia e fadiga e quase sempre passam despercebidos ou como síndrome gripal (DIAS *et al.*, 2016).

Ainda, se o local de entrada do parasita for a conjuntiva ocular, pode ocorrer a formação de um edema bipalpebral unilateral, devido a liberação de IgE e histamina (anafilaxia), podendo estender-se por toda a área da face, chamado Sinal de Romanã-Mazza, que ocorre em 10 a 20% dos casos (DIAS *et al.*, 2016).

Após essa fase, depois de quatro a dez semanas do período de incubação, pode evoluir para a forma crônica indeterminada, com ausência de sintomas clínicos e de comprometimento do aparelho digestivo e do coração. Enquanto que alguns indivíduos, cerca de 50%, permaneçam nessa fase por toda a vida, alguns podem evoluir para o estágio crônico determinado, após anos da infecção, que pode apresentar-se de três formas: forma cardíaca, forma digestiva e forma mista (cardiodigestiva) (RIBEIRO e ROCHA, 1998).

A forma cardíaca, considerada a maior causa de óbito na fase crônica da doença, está presente em 30% dos casos crônicos, sendo caracterizada por acometimento cardíaco, com evolução para quadros de Insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e miocardiopatia dilatada (DIAS *et al.*, 2016).

Em cerca de 10% dos casos, ocorre a forma digestiva, com o acometimento do aparelho digestivo, podendo evoluir para quadros de megacólon ou megaesôfago. A forma mista (cardiodigestiva) é marcada pela concomitância de manifestações decorrentes do comprometimento do aparelho cardíaco e digestivo (DIAS *et al.*, 2016).

1.1.2 Diagnóstico

Para o diagnóstico, faz-se uso de exames parasitológicos e sorológicos. Nos métodos parasitológicos, ocorre a análise direta do parasita no sangue, podendo ser realizada por pesquisa á fresco de tripanossomatídeos, métodos de concentração (microhematócrito e método de Strout), além do esfregaço sanguíneo. Os exames sorológicos são utilizados para confirmação dos casos, sendo utilizados atualmente, os métodos de imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e o ELISA, já que o método de fixação do complemento ou Reação de Machado-Guerreiro já não é mais utilizada (DIAS *et al.*, 2016).

1.1.3 Estratégias terapêuticas atuais

Atualmente no mercado, existem disponíveis dois fármacos: Nifurtimox (NFX) e Benzonidazol (BZ). Porém, ambos são ineficazes principalmente no que diz respeito à fase crônica da doença. Ambos fazem parte de uma mesma família, a dos nitroheterocíclicos, mas possuem diferentes grupos químicos e seu mecanismo de ação contra o *T.cruzi* é distinto (FRANÇA *et al.*, 2014).

O Nifurtimox (3-metil-4, 5 (nitrofurfurilideno-amino)-tetrahidro-4H-1, 4 tiazina-1-1-dióxido), de nome comercial Lampit ® foi o primeiro fármaco utilizado para a forma aguda da doença, sintetizado em 1967, pela Bayer. É um fármaco (Figura 04) da classe dos antiprotozoários, sendo observada negatização da parasitemia em 88% a 100% dos casos agudos tratados e baixa taxa de cura em pacientes tratados na fase crônica (COURA & CASTRO, 2002).

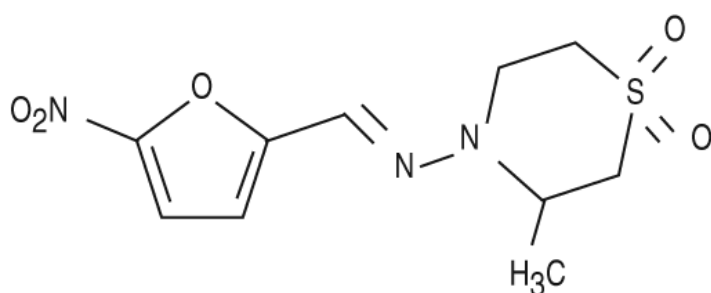


Figura 03. Estrutura molecular do Nifurtimox (Fonte: <<http://www.farmaciasahumada.cl/fasa/MFT/PRODUCTO/P10470.HTM>>)

Possui ação tanto nas formas tripomastigotas quanto nas amastigotas. Seu mecanismo de ação é baseado na nitroredução, onde há geração de um radical nitroânion, que na presença de oxigênio produz espécies reativas, como o peróxido de hidrogênio e o superóxido. Como o protozoário não possui um eficiente mecanismo de detoxificação, diferentemente dos mamíferos, fica mais susceptível à ação tóxica desses compostos (CANÇADO, 1997; CAMPOS, 2007). Na década de 80, em virtude da alta toxicidade, sua comercialização foi proibida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil; assim como em outros países, como Venezuela e Argentina (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

O Benzonidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) ou Rochagan® (Figura 05) é um derivado nitroimidazólico, com atividade tripanocida e antibacteriana, sintetizado em 1972, por Wineholt e Liebman e produzido pelo laboratório da Roche, na Suíça (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Em 2003, a Roche doou o direito de patente do medicamento Rochagan, ao governo brasileiro, que cedeu os direitos de produção ao laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE), sendo este o único laboratório, no mundo, a produzir este medicamento.

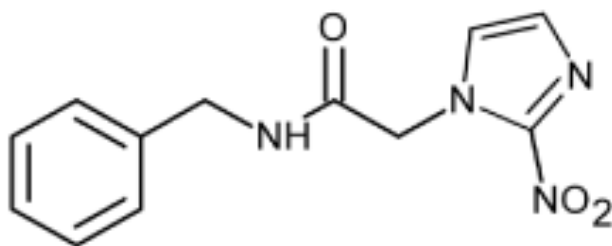


Figura 04. Estrutura molecular do Benzonidazol (Fonte: <https://revista.iptsp.ufg.br/up/63/o/2008_37_3_209_228.pdf>).

Seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se que ocorra pelo estresse oxidativo, envolvendo a modificação covalente das macromoléculas em intermediários nitroreduzidos, que se ligaria à componentes celulares como DNA, proteínas e lipídeos, causando a inibição do crescimento dos parasitos (CANÇADO, 1997; CAMPOS, 2007).

Contudo, pela baixa eficácia na fase crônica, a alta toxicidade hepática, além da existência de cepas resistentes, estudos estão sendo realizados, identificando novos direcionamento no que diz respeito à quimioterapia para doença de chagas, como enzimas, como a Tripanotiona Redutase (TR), a Superóxido Dismutase (SOD), a Cisteína Protease de 51 a 57 kDa ou GP51/57 (Cruzipaína) entre outros (Coura & Castro, 2002; CAMPOS, 2007). Além de ativos que atuem sobre substâncias necessárias a sobrevivência e proliferação do parasita como os que atuam na depleção do ergosterol, originalmente medicamentos utilizados para tratamento de infecções fúngicas (CAMPOS, 2007; FRANÇA *et al.*, 2014).

1.2 Novos Sistemas Terapêuticos

O desenvolvimento de um fármaco é um processo de planejamento á longo prazo e de alto risco, pois ao passo que poderia levar a melhora da saúde ou a cura de uma população afetada por determinada moléstia, ao contrário disso, poderia causar efeitos adversos graves ou se necessitar de um desenvolvimento de alto custo, tornaria inviável a sua comercialização para todos aqueles que necessitam (ANVISA, 2013).

A descoberta de novos compostos, para o tratamento de doenças, envolve diversas etapas envoltas em um processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos (P&D). Os parâmetros levados em consideração são as vias de ação, as propriedades moleculares dos compostos, além dos alvos de atuação do fármaco (GUIDO, 2010).

Primeiramente, descobre-se um composto com potencial terapêutico, que deve passar pelas fases de teste pré-clínica, onde são feitos testes *in vitro* para

avaliar as propriedades biológicas das moléculas, através de bioensaios in vivo, para estudar o metabolismo, a farmacocinética e farmacodinâmica em animais e a fase clínica propriamente dita, onde são realizados estudos clínicos em humanos, em várias fases (ANVISA, 2013; FERREIRA *et al*, 2009).

Dada a elevada importância desse processo, além do elevado período para desenvolvimento e aprovação de um novo composto, que gira em torno de 12 anos, e da baixa probabilidade desses compostos chegarem ao mercado, se exprime a necessidade da elucidação desse processo de desenvolvimento, que pode produzir medicamentos para doenças ainda sem tratamento ou aumentar a eficácia terapêutica ao associar novos compostos com sistemas terapêuticos já conhecidos (ANVISA, 1999).

Para começar esse processo, é necessária a identificação e a otimização dessas novas moléculas, que apresentam elevado potencial de aproveitamento clínico. A validação dessas moléculas ou alvos terapêuticos é realizada por agências reguladoras, sendo fundamental para consolidar, estabelecer e garantir a segurança e a eficiência de estudo de novos fármacos.
Ref

Em 1906, foi criado nos Estados Unidos, o Food and drug act (FDA), que mais tarde seria transformado na Agência Americana para o Controle de Alimentos e Medicamentos (CALIXTO, 2008).

Em 1962 a FDA estabeleceu que antes do uso clínico ou da realização de propaganda para comercialização de um novo medicamento, o fabricante deveria comprovar sua eficácia e segurança, mas principalmente a sua segurança. ref

A partir disso, a maioria dos países passou a adotar esses critérios de avaliação e os medicamentos passaram a ser alvo de um rigoroso processo de análise, antes da sua aprovação e comercialização. (CALIXTO, 2008).

No Brasil, o órgão de regulação para estes fins, foi criado em 26 de janeiro 1999, pela Lei nº 9.782, sob a denominação de Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo responsável por promover a proteção da

saúde da população, através do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos ao órgão, além da análise de pedidos de patentes juntamente ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (FERREIRA *et al.*, 2009; ANVISA, 1999).

Para prosseguir com a etapa clínica do P&D, as atividades de pesquisa seguem determinação das Boas Práticas Clínicas (GCP – Good Clinical Practice), que tem por finalidade de consolidar e estabelecer inúmeros acordos, que garantam segurança e eficiência nas atividades de pesquisa. O estabelecimento dessas diretrizes no Brasil teve seu início em 1988, com a aprovação das Normas para Pesquisas em Saúde, primeira resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2005; GOLDIM, 2009).

Posteriormente, em 1996, por meio da Resolução CNS 196/96, foram propostas as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Além disso, em 1997, com o objetivo direcionado a pesquisa de novos fármacos e vacinas, foi estabelecida a Resolução CNS 251/97, que discursa sobre o bem estar do indivíduo incluído no estudo estar acima de qualquer interesse econômico, indústria, da ciência ou da população em geral. (CNS,1997).

1.2.1 Compostos triazólicos

Os compostos de primeira geração de inibição da síntese do ergosterol foram descobertos no fim da década de 60, porém, estes atuam inibindo várias etapas na biossíntese dos lipídeos da membrana, componentes essenciais da membrana do fungo, que regulam a fluidez e a integridade da mesma. Porém, como as enzimas do citocromo P450 produzem colesterol nas células do fígado dos mamíferos, poderiam causar danos ao paciente (MARTINEZ, 2006). Na década de 80, surgiram os triazóis como o Fluconazol. E na última década, novos derivados triazóis, como o posaconazol (MARTINEZ, 2006).

Os derivados triazólicos, então, seriam mais específicos, agindo somente sobre a síntese do ergosterol, presente na membrana do fungo. Esses ativos atuam inibindo a CYP51 (14 α -desmetilase) (Figura 05), que culmina com o acúmulo de lanosterol, que sobre a ação da Δ -5,6- desaturase, gerando um esterol, 14 α -metil-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol, um esteroide tóxico que ao ser incorporado a membrana celular leva a sua desorganização, ocasionando alterações de fluidez, permeabilidade e integridade (SUETH-SANTIAGO, *et al.*, 2015).

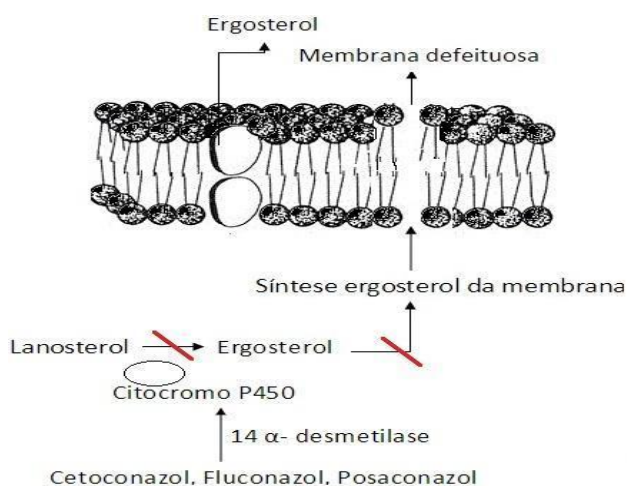


Figura 05. Mecanismo de ação dos inibidores da síntese de ergosterol (IBES) (Fonte: Autor).

Esses antifúngicos com potencial atividade tripanocida, foram relatados contra *T. cruzi*, *P. falciparum* e *L. tropica* (SUETH-SANTIAGO, *et al.*, 2015). Pesquisas realizadas nas últimas décadas relatam de forma clara que o *Trypanosoma cruzi*, necessita da síntese de esteróis para viabilidade celular e proliferação, assim como os fungos (URBINA, 2009).

No caso da doença de chagas, por exemplo, esses compostos triazólicos vão agir sobre a CYP51 do protozoário, impossibilitando a formação do intermediário zimosterol a partir do lanosterol, impedindo assim a formação do ergosterol, o que leva a acumulação de precursores na membrana, ocasionando uma disfunção similar a que ocorre na membrana dos fungos (MARTINEZ, 2006).

1.2.2 Fluconazol

O Fluconazol (Figura 06) é um antifúngico, da classe dos derivados triazólicos, indicado para diversas infecções fúngicas. Seu espectro atinge a maioria das leveduras e dermatofitoses (MARTINEZ, 2006).

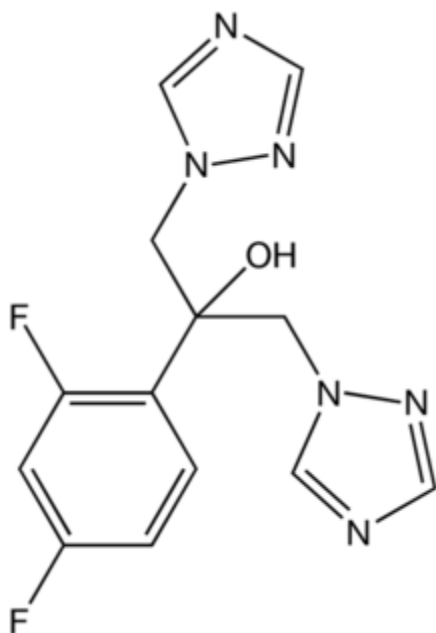


Figura 06. Estrutura do Fluconazol. (Fonte: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3250/1/TG_11256.pdf>)

É indicado para profilaxia da meningite criptocócica, além de candidíase mucosa e orofaríngea. Possui boa atividade contra candidíase sistêmica e superficial, além de ser indicado para o tratamento de pacientes imunocomprometidos, portador do HIV ou predispostos devido à quimioterapia citotóxica ou radioterapia (MARTINEZ, 2006, ANVISA, 2016).

As propriedades farmacocinéticas do Fluconazol são similares nas duas formas de administração, via oral e intravenosa. Possui ótima taxa de absorção por via oral, que não apresenta redução de eficácia com a ingestão concomitante a quaisquer alimentos. Além disso, sua ligação a proteínas plasmáticas é baixa, em torno de 11 a 12% (MEDLEY, 2011).

Apresenta concentrações a nível plasmático proporcional a dose administrada, apresentando pico plasmático em torno de 1 a 2 horas. Após 4-5

dias com doses únicas diárias, são alcançados 90% dos níveis de equilíbrio (MEDLEY, 2011). Possui boa penetração nos fluidos corpóreos, como: saliva e escarro; além de se acumular no extrato córneo. É excretado por via renal, com 80% da dose administrada encontrada de forma inalterada na urina (MEDLEY, 2011).

1.2.3 Derivados do Fluconazol

Dada à inexistência de uma terapia eficiente que promova a cura da doença de chagas, na fase crônica, além da existência de diversos efeitos adversos relacionados à terapia atualmente utilizada, urge à necessidade imediata do desenvolvimento de ativos que se enquadrem no combinado de eficácia e segurança para tratamento da doença em ambas suas fases. Esta terapia ineficaz também se faz presente na relação com outros Tripanossomatídeos, como a *Leishmania*, relacionado à toxicidade dos compostos, resistência entre outros.

Na literatura já foi descrito a respeito da atividade tripanocida de antifúngicos sendo o ergosterol o resultado final de ambas as vias biossintéticas, contudo, existem diferenças em relação às isoformas de CYP51, de fungos e tripanossomatídeos, logo um antifúngico que inibe a 14 α -desmetilase de um fungo não irá inibir da mesma maneira necessariamente, com o mesmo resultado final, a enzima do *T. cruzi*, por exemplo. (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). Além disso, o Fluconazol apresentou contra o *T. cruzi*, somente atividade *in vitro*, e não em modelos animais (FRANÇA, *et al.*, 2014).

Além disso, autores já descreveram que inibidores de biossíntese do ergosterol, comercializados pela indústria farmacêutica, como cetoconazol, itraconazol e o próprio Fluconazol, tem ação supressiva e não curativa quando testados para o *T. cruzi* em modelos experimentais (URBINA, 2009).

Desta maneira, uma nova estratégia seria proposta, a partir da síntese de uma série de compostos triazólicos, de série PFCT, com potencial atividade *anti-T. cruzi*.

1.2.4 Avaliação de segurança de novos compostos

Na pesquisa por novos fármacos, a avaliação da sua segurança se enquadra em estudos toxicológicos pré-clínicos que avaliam os potenciais riscos de seu uso, no que diz respeito à toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, que podem causar danos locais e sistêmicos (MARON & AMES, 1983; OECD 471,1997; ANVISA, 2013).

O uso de testes *in vitro* como o ensaio de genotoxicidade de reversão bacteriana, é muito utilizado para elucidação inicial do potencial indutor de mutação do composto testado, para que se possam avaliar possíveis danos ao DNA, quando exposto a substância (ANVISA, 2013).

Dessa maneira, o uso de ensaios toxicológicos, é de suma importância para identificação do potencial citotóxico e mutagênico de compostos avaliados, de forma simples, rápida e com baixo custo, além da similaridade de resultados, já que estudos comprovam que diversos compostos já testados neste ensaio, apresentando resultado positivo, apresentaram atividade mutagênica em outros ensaios (OECD 471, 1997; ANVISA, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Investigar o potencial mutagênico e toxicológico, de compostos triazólicos de série PFCT 012/14 e PFCT 015/14.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar os potenciais efeitos citotóxicos e mutagênicos para cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, induzidos pela atividade do Fluconazol e dos derivados selecionados;
- b. Investigar a citotoxicidade hepática do Fluconazol e derivados, em culturas de células HepG2;
- c. Comparar os perfis de toxicidade do(s) derivados testados, para assim, destacar qual (ais) moléculas apresentaram resultados mais promissores para ensaios posteriores, como micronúcleo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras para Estudo

Os derivados utilizados neste estudo de série PFCT, são compostos que guardam uma região estrutural de um medicamento conhecido, neste caso, o Fluconazol, com outras modificações em sua estrutura que possam aperfeiçoar sua atividade, segurança ou seletividade. Apresentam uma rota de síntese similar ao fármaco original, mas com etapas distintas que conferem essas modificações supracitadas. Foram cedidas para este trabalho pela Dra. Núbia Boechat e pelo Dr. Frederico Castelo Branco, pesquisadores do Laboratório de Química Medicinal da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Esses derivados, da série PFCT, PFTC007/14, FTC011/14, PFTC012/14, PFTC014/14, PFTC015/14, PFTC016/14, PFTC017/14, PFTC018/14, PFTC001/15, juntamente com o Fluconazol, apresentam massa molar distinta, descrita na Tabela 01.

Em razão do processo de pedido de patente desses derivados, sua estrutura está protegida.

Tabela 01. Características do Fluconazol e derivados

Amostra	Massa molar	Solvente
Fluconazol	306,1	DMSO
PFTC 007/14	399,1	DMSO
PFTC 011/14	381,2	DMSO
PFTC 012/14	407,1	DMSO
PFTC 014/14	349,1	DMSO
PFTC 015/14	361,2	DMSO
PFTC 016/14	368,1	DMSO
PFTC 017/14	379,1	DMSO
PFTC 018/14	376,1	DMSO
PFTC 001/15	345,1	DMSO

3.2 Ensaio de viabilidade celular com WST-1

Baseado no protocolo Roche, 2011, o ensaio de viabilidade celular com WST-1 (*Water Soluble Tetrazolium One*), é um ensaio colorimétrico para a quantificação não-radioativa da proliferação, crescimento e viabilidade celular, e que pode ser utilizado como indicador de citotoxicidade. O ensaio se baseia na clivagem de sais de tetrazólio, que são reduzidos pela enzima succinato-tetrazólio-reductase, e formam os chamados cristais de formazan, sendo quantificada a absorvância da sua coloração, por espectrofotometria (Roche, 2011; Azevedo, 2013). A formação desses cristais demonstra o estado funcional da cadeia respiratória, ativo somente em células viáveis.

Culturas da linhagem HepG2, com 90-95% de confluência (quando a cultura celular prolifera em condições apropriadas até ocupar todo o substrato

disponível) foram utilizadas no ensaio. A população de células viáveis é ajustada para o número ótimo de 105 células/mL. A partir dessa suspensão de células, 100 µL são pipetados em uma placa para microtitulação, com uma população de 10^4 células em cada um deles. Então, as placas foram colocadas em uma incubadora com atmosfera de CO₂ a 5%, a 37°C, condições ideais para garantir a adesão das células ao substrato.

Após essa etapa, foi retirada a solução da placa de microtitulação, onde foram acrescentados 90µL de meio de cultura fresco. Posteriormente, para o tratamento das células, 1µL de cada um dos ativos testados, foram adicionados a seus respectivos locais, com equivalência a 1% do volume total, levando em consideração a toxicidade em altas concentrações do DMSO, para as células, e as placas foram incubadas durante 3 h ou 24 h. Com o tratamento, foi possível que a população de células fosse exposta às concentrações finais de 10, 50, 100 e 500µM de cada um dos derivados e do Fluconazol.

Depois de completado o tempo de exposição na incubadora, o meio de cultura foi removido, e foram lavados com PBS (*Phosphate buffered saline*), duas vezes. Logo após, foram adicionados 90µL de meio fresco suplementado. Foram colocados 10µL do reagente WST-1 e o sistema de reação foi incubado novamente, a 37°C, com umidade de 5% de CO₂ por 120 min (HepG2), a fim que permitir a redução do sal de tretazólio, e verificar-se a viabilidade das células em contato com os compostos.

Os controles do ensaio foram o Branco (ausência de células), o Negativo, com células e meio de cultura, e Solvente, com DMSO 1% do volume final.

Após a última incubação, as placas foram lidas em espectrofotômetro de microplacas, no comprimento de onda de 440nm, sendo o percentual de sobrevivência (células viáveis) calculado pela razão entre as absorbâncias obtidas no solvente e nas amostras. Este ensaio foi realizado em triplicata e repetido pelo menos duas vezes. A partir deste ensaio analisaram-se os parâmetros de EC₅₀, LC₅₀ e IS (índice de seletividade) (Figura 07).

LC₅₀ - dose necessária de determinada substância para matar 50% da população em um ensaio

LC₅₀ - $\frac{\text{Concentração de eficácia controle}}{\text{Concentração de eficácia amostras}}$

EC₅₀ - Concentração de eficácia da droga com efeito antiparasitário para 50% dos parasitas

IS - LC₅₀ 24h/EC₅₀

Figura 07. Parâmetros de análise do Ensaio WST-1. (Fonte: autor)

3.3 Cepas bacterianas utilizadas

Neste trabalho foram utilizadas quatro linhagens do clone LT2 da bactéria *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (TA97, TA98, TA100, TA102), descrito por MARON e AMES (1983), todas auxotróficas para o aminoácido histidina (*His*⁻), ou seja, não proliferam em ambiente que não haja histidina. A detecção de diversos mutágenos ocorreu da percepção de que ao ser posto em contato com alguns agentes mutagênicos, ocorria a reversão, sendo assim *His*⁺ revertentes, com proliferação das colônias em meio desprovido desse aminoácido.. Estas linhagens apresentam padrões e características específicas, detalhadas no **quadro 01**.

Quadro 01. Características das cepas padrão utilizadas no ensaio de teste de Ames:

Cepa	Mutação em <i>His</i>	Plasmídeo	Outras mutações	Mutação detectada	
TA97	<i>hisD6610</i> <i>hisO1242</i>	pKM101	<i>Rfa</i> , (<i>uvrB chl bio</i>)	<i>Frameshift</i>	Adição de G:C
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	<i>Rfa</i> , (<i>uvrB chl bio</i>)	<i>Frameshift</i>	Deleção de G:C
TA100	<i>hisG46</i>	pKM101	<i>Rfa</i> , (<i>uvrB chl bio</i>)	Substituição	G:C para A:T
TA102	pAQ1 (<i>hisG428</i>)	pKM101, pAQ1	<i>Rfa</i>	Substituição	A:T para G:C

Fonte: Adaptado de MARON & AMES, 1983; AIUB, 2011.

3.4 Teste de Ames

3.4.1 Teste qualitativo de sobrevivência bacteriana

As linhagens bacterianas foram previamente crescidas em caldo Luria Bertani (LB) (10g/L bacto triptona; 5,0g/L extrato de levedura; 10g/L NaCl), com acréscimo de antibiótico ampicilina (8mg/mL) para todas as linhagens, e tetraciclina (8mg/mL) somente para TA102 e, incubadas por um período aproximado de 18 horas, à temperatura de 37 °C e sob agitação à 150 rpm, até alcançar a fase estacionária (2×10^9 células/mL).

Foram separados tubos de ensaio contendo 500µL de solução tampão fosfato de sódio (27,6g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 28,4g/L Na_2HPO_4 ; 0,2 M pH 7,4), onde foram adicionados 100µL da suspensão bacteriana crescida na etapa anterior. A estes tubos foram adicionados 2mL de *top ágar* (7g/L ágar; 5g/L NaCl), sendo vertido em placas de Petri contendo meio ágar LB (10g/L bacto triptona; 5,0g/L extrato de levedura; 10g/L NaCl; 15g/L ágar).

Por fim, 2µL de cada diluição do Fluconazol e de seus derivados, assim como de seus respectivos controles, foram colocados em quadrantes marcados nas placas de petri. As placas foram colocadas em estufa de crescimento, por 24 horas à temperatura de 37 °C. Neste ensaio, a análise é feita a partir da presença de halo de inibição de crescimento.

Como método padrão, o controle utilizado foi o DMSO e os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.2 Teste quantitativo de reversão bacteriana

Alíquotas de 100µL das linhagens de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium TA97, TA98, TA100 E TA102 (2×10^8 células/ml), previamente crescidas em caldo LB foram pré-incubadas (por 20 min, a 37°C), em tubos de ensaio, adicionadas de 500µL de tampão de fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,4) e 100µL de cada amostra, com concentração final segundo a **tabela 02**, ou controle negativo (DMSO).

Tabela 02. Concentrações utilizadas no experimento.

Amostras		Concentrações (µM)			
Fluconazol	0,005	0,05	0,5	5	50
PFCT	0,005	0,05	0,5	5	50
012/14	0,005	0,05	0,5	5	50
PFCT	0,005	0,05	0,5	5	50
015/14	0,005	0,05	0,5	5	50

Legenda: concentrações escolhidas de acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores. µM: micromolar

Passado o tempo de incubação de 20 minutos, 2 mL de *top ágar* (7g/L de ágar; 5g/L de NaCl), enriquecido com solução de histidina/biotina (0,5mM) em proporção 10:1, com pH 7,4 e temperatura de 45°C, foram adicionados aos tubos de ensaio e as misturas finais foram vertidas em placas de Petri contendo Agar Vogel-Bonner (15 g/L ágar, 20 mL meio Vogel-Bonner - 50x concentrado, 10g/L sulfato de magnésio heptahidratado, 100g/L ácido cítrico, 175g/L de fosfato de sódio e amônio, 500g/L de fosfato de potássio dibásico, 970 mL água destilada, 50 mL glicose 40% para 930 mL de água).

Estas placas foram incubadas a 37°C, durante 72 h, e as colônias *His+* revertentes foram contadas manualmente, sendo todos os experimentos realizados em triplicata.

Este ensaio foi realizado com e sem ativação metabólica. Para identificar compostos mutagênicos de ação indireta, utiliza-se nos ensaios a chamada fração microsossomal S9. O agente de metabolização utilizado é um homogenato de células de fígado de rato Sprague-Dawley, pré-tratado com uma mistura de bifenil policlorinada, que induz um aumento de enzimas do citocromo p450, que permite que sejam identificadas substâncias que necessitam ser metabolizadas para que seus derivados apresentem atividade mutagênica.

Como base para cálculo dos resultados, obteve-se o índice de mutagenicidade (IM), calculado pelo valor médio das triplicatas de cada concentração e cepa, obtido por contagem manual das colônias revertentes em cada concentração, dividido pelo valor médio obtido das triplicatas do controle negativo (DMSO, 5%).

Com base na literatura, os compostos foram considerados mutagênicos quando, o número de colônias revertentes foi de, pelo menos, duas vezes o número de revertentes espontâneos ($IM \geq 2$) (Figura 08) e a análise de variância (ANOVA One Way, com pós teste TUKEY) revelou uma resposta significativa ($p \leq 0,05$); e uma curva de concentração - dependente reprodutível ($p \leq 0,01$) foi obtida (Aiub & FELZENSZWALB, 2011).

3.5 Ensaio de sobrevivência bacteriana

Para este teste, uma alíquota de 10µL da solução foi colocado no tubo de ensaio, na concentração aproximada de 2×10^8 células/mL, sendo retirada e diluída em NaCl 0,9%, para que se fosse obtida uma suspensão celular de aproximadamente 2×10^3 células/mL.

A partir da solução final, 100 µL dessa alíquota foi posto em placa de Petri contendo caldo LB. As placas (em triplicata), então, foram incubadas a 37°C, por 24 horas e passado esse tempo, as colônias foram contadas manualmente.

Para avaliar a toxicidade dos compostos, calculou-se o valor médio do ensaio em triplicata, a partir da contagem das unidades formadoras de colônias de cada concentração do composto, dividido pelo valor médio das triplicatas do controle negativo (DMSO). Sendo assim, foi considerado como tóxico, um percentual de sobrevivência celular menor ou igual a 70% (MARON & AMES, 1983; OECD, 1997; AIUB *et al.*, 2011)

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio de viabilidade celular com WST-1

Na tabela 03, são observados os efeitos citotóxicos em células HepG2 do Fluconazol e de seus derivados, onde se foi observado a LC₅₀ (3h e 24hs), que consiste na dose necessária de determinada substância para matar 50% da população em um ensaio. E a EC₅₀, que diz respeito à concentração do composto que induz metade do efeito máximo.

Tabela 03. Efeito *In vitro* (LC₅₀) dos compostos estudados em culturas em monocamadas de células de hepatoma humano da linhagem HepG2 após 3 e 24 horas de tratamento incubadas à 37°C e 5% de CO₂, representando seu potencial hepatotóxico.

Composto	LC ₅₀ (µM)	3h	LC ₅₀ (µM)	24h	EC ₅₀ Tulahuen (µM) ^a	IS
Fluconazol	>500		270,0±42,4		47,00	5,74
PFTC 007/14	52,0 ± 4,2		11,4±9,0		0,18	63,33
PFTC 011/14	76,5±9,2		52,5±3,5		0,08	656,25
PFTC 012/14	4,9±0,5		4,6±2,2		0,03	153,33
PFTC 014/14	53,0±5,7		5,3±2,5		0,67	7,91
PFTC 015/14	163,5±4,9		140,0±21,2		0,59	237,29
PFTC 016/14	50,0±7,1		48,8±1,8		0,30	162,67
PFTC 017/14	56,5±6,4		54,0±1,4		0,10	540,00
PFTC 018/14	37,0±2,8		5,4±1,4		0,27	20,00
PFTC 001/15	10,5±0,7		4,3±2,8		0,37	11,62

Legenda: LC= Concentração letal, para 50% da população celular/ EC50 Tulahuen = concentração de eficácia para 50% da população celular (cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi*, para teste de efeito antiparasitário). Dado recebido por grupo em colaboração / IS = Índice de Seletividade.

Baseado neste ensaio foi demonstrado que o composto de maior LC₅₀ foi o derivado de série PFCT 015/14 em 3 e 24 h e o composto de menor LC₅₀

foi o derivado de série PFCT 012/14. Em relação a EC₅₀, o composto de série PFCT 014/14.

4.2 Teste de Ames

4.2.1 Teste Qualitativo de Reversão Bacteriana

No quadro 02, foi adicionado em cada quadrante analisado, 2 µL de cada substância. Pode-se observar, então, a formação de halo de inibição ou ausência da formação do halo, considerando-se três tamanhos de halo, nas três substâncias analisadas (Fluconazol e dois derivados).

Quadro 02. Resultado do teste qualitativo de reversão bacteriana.

	Fluconazol		PFCT 012/14		PFCT 015/14	
	concentração (µg/ mL)	Tamanho do halo	concentração (µg/ mL)	Tamanho do halo	concentração (µg/ mL)	Tamanho do halo
	0	-	0	-	0	-
TA97	10	-	10	-	10	-
	100	-	100	-	100	-
	1000	-	1000	(+)	1000	-
	0	-	0	-	0	-
TA98	10	-	10	-	10	-
	100	-	100	-	100	(+)
	1000	(+)	1000	(+)	1000	(+)
	0	-	0	-	0	-
TA100	10	-	10	-	10	-
	100	-	100	-	100	-
	1000	-	1000	(++)	1000	-
	0	-	0	-	0	-
TA102	10	-	10	(++)	10	(++)
	100	(++)	100	(++)	100	(++)
	1000	(++)	1000	(++)	1000	(++)

Legenda: Ausência de halo de inibição (-) / Halo de inibição entre 4 e 7 mm (+) / Halo de inibição entre 7 e 10mm (++) / Halo de inibição entre 10 e 15 mm (+++).

Baseado na análise anterior, da LC_{50} e EC_{50} , apenas dois derivados foram escolhidos e analisados primeiramente no parâmetro de tamanho do halo de inibição, sendo mostrado o maior halo de inibição encontrado, foi o parâmetro entre 7 e 10 mm (++) nas concentrações 10, 100 e 1000 na cepa TA102, para o derivado PFCT 015/14, também visto na série PFCT 012/14. Na cepa TA100, do derivado PFCT 012/14, esse halo de inibição entre 7 e 10mm (++) , foi encontrado também, na concentração de 1000.

4.2.2 Teste quantitativo de reversão bacteriana

Este ensaio foi realizado na presença e na ausência de metabolização. Os resultados obtidos, para cada uma das cepas utilizadas, estão distribuídos em tabelas, do Fluconazol e do derivado de escolha, da série PFCT 015/14, baseado nos resultados obtidos anteriormente.

Na **tabela 04**, estão apresentados os resultados referentes à mutagenicidade e citotoxicidade do Fluconazol.

Tabela 04. Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do Fluconazol.

Cepa	Fluconazol			
	μM	IM	Rev \pm DP	%Sobrev
TA97	0	1,0	132,0 \pm 6,24	100,0
	0,005	1,0	128,5 \pm 6,36	97,7
	0,05	1,0	134,0 \pm 5,35	80,5
	0,5	1,0	128,0 \pm 17,2	<u>60,6</u>
	5	1,0	131,5 \pm 14,8	<u>47,4</u>
	50	1,3	168,5 \pm 38,8	<u>46,2</u>
TA98	0	1,0	85,7 \pm 1,52	100,0
	0,005	1,0	85,0 \pm 1,00	92,4
	0,05	1,0	86,0 \pm 0,00	81,7
	0,5	1,0	86,3 \pm 2,51	70,7
	5	1,0	88,0 \pm 7,02	<u>51,6</u>
	50	1,1	92,3 \pm 7,09	<u>46,5</u>
TA100	0	1,0	123,5 \pm 2,12	100,0
	0,005	1,0	120,0 \pm 11,31	100,0
	0,05	1,0	118,0 \pm 15,56	100,0
	0,5	1,0	123,0 \pm 15,55	100,0
	5	1,3	159,0 \pm 0,00	100,0
	50	1,5	186,0 \pm 11,01	<u>50,4</u>
TA102	0	1,0	213,3 \pm 12,85	100,0
	0,005	1,0	203,0 \pm 4,24	85,62
	0,05	1,0	208,0 \pm 2,82	74,34
	0,5	1,4	294,0 \pm 2,82	71,18
	5	1,4	292,0 \pm 73,18	<u>64,33</u>
	50	1,5	323,0 \pm 57,98	<u>49,51</u>

Legenda: Valores expressos em média do número de revertentes \pm desvio padrão de triplicatas / IM = índice de mutagenicidade, representando a relação entre o número de revertentes nas placas tratadas e nas placas do controle negativo (DMSO) / % Sobrev. = percentual de sobrevivência nas placas tratadas em relação às placas do controle / Indicação em negrito e sublinhado = $\text{IM} \geq 2.0$ e/ou $\text{\%Sobrev} \leq 70$ / * = resposta significativa com $p \leq 0,05$.

Pode-se observar uma resposta negativa para mutagenicidade, em todas as concentrações testadas. Já para a avaliação citotóxica, observa-se resultado positivo em todas as linhagens utilizadas, sendo nas cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 nas concentrações acima de 0,5 μM , 5 μM , 50 μM e 5

μM , respectivamente, levando-se em consideração o índice de mutagenicidade e a porcentagem de sobrevivência padrão.

A **tabela 05** refere-se aos resultados analisados do ensaio de mutagenicidade e toxicidade da amostra PFCT 012/14, na ausência de ativação metabólica.

Tabela 05. Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do derivado de série PFCT 012/14, sem metabolização.

PFCT 012/14 (-S9)				
Cepa	μM	IM	Rev \pm DP	%Sobrev
TA97	0	1,0	290,0 \pm 36,1	100
	0,005	1,3	210,0 \pm 20,0	72,4
	0,05	1,5	183,0 \pm 14,2	<u>63,0</u>
	0,5	1,9	151,0 \pm 8,08	<u>52,2</u>
	5	2,1	133,0 \pm 5,51	<u>45,7</u>
	50	2,8	102,0 \pm 4,58	<u>35,2</u>
TA98	0	1,0	348,0 \pm 23,1	100
	0,005	1,2	298,0 \pm 9,07	85,7
	0,05	1,3	267,0 \pm 7,02	76,8
	0,5	1,5	225,0 \pm 7,07	<u>64,7</u>
	5	1,8	192,0 \pm 5,69	<u>55,1</u>
	50	2,4	141,0 \pm 10,80	<u>40,5</u>
TA100	0	1,0	353,0 \pm 11,50	100
	0,005	1,2	303,0 \pm 15,50	85,7
	0,05	1,3	275,0 \pm 12,90	77,7
	0,5	1,4	243,0 \pm 11,30	<u>68,8</u>
	5	1,5	240,0 \pm 14,00	<u>67,9</u>
	50	1,8	193,0 \pm 11,00	<u>54,5</u>
TA102	0	1,0	238,0 \pm 15,9	100
	0,005	1,2	189,3 \pm 5,13	79,6
	0,05	1,4	170,3 \pm 1,53	71,6
	0,5	1,6	149,0 \pm 1,41	<u>62,6</u>
	5	1,7	140,7 \pm 4,04	<u>59,1</u>
	50	2,0	120,0 \pm 2,00	<u>50,4</u>

Legenda: Valores expressos em média do número de revertentes \pm desvio padrão de triplicatas / IM = índice de mutagenicidade, representando a relação entre o número de revertentes nas placas tratadas e nas placas do controle negativo (DMSO) / % Sobrev. = percentual de sobrevivência nas placas tratadas em relação às placas do controle / Indicação em negrito e sublinhado = IM \geq 2.0 e/ou %Sobrev \leq 70/ * = resposta significativa com $p \leq 0,05$.

Nesta tabela, podemos observar mutagenicidade positiva nas cepas TA97, TA98 e TA102, porém na TA97 este resultado apresentou-se primeiro na concentração de 5 μM . Quanto ao perfil citotóxico, podemos observar uma

queda na sobrevivência logo nas primeiras concentrações, como na TA97 que começa na concentração de 0,05 µM e nas outras cepas, a partir de 0,5.

A **tabela 06** refere-se aos resultados analisados do ensaio de mutagenicidade e toxicidade da amostra PFCT 015/14, na ausência de ativação metabólica.

Tabela 06. Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do derivado de série PFCT 015/14, sem metabolização.

PFCT 015/14 (-S9)				
Cepa	µM	IM	Rev ± DP	%Sobrev
TA97	0	1,0	120,6± 9,29	100,0
	0,005	1,1	139,0± 3,61	91,3
	0,05	1,2	156,0± 5,65	85,7
	0,5	1,5	189,0± 5,29	<u>69,9</u>
	5	1,7	208,3± 3,05	<u>58,5</u>
	50	1,9	234,6± 6,11	<u>47,1</u>
TA98	0	1,0	50,0±24,04	100
	0,005	1,2	115,33±67,0	85,7
	0,05	1,4	72,66±13,61	76,8
	0,5	1,4	71,66±9,81	<u>64,7</u>
	5	1,4	71,33±6,42	<u>55,1</u>
	50	1,7	84,33±6,42	<u>40,5</u>
TA100	0	1,0	120,0±29,96	100
	0,005	1,9	190,3±10,0	85,7
	0,05	2,4	240,0±10,0	77,7
	0,5	2,7	280,0±10,0	<u>68,8</u>
	5	3,0	303,33±5,77	<u>67,9</u>
	50	3,1	321,0±11,53	<u>54,5</u>
TA102	0	1,0	145,0±4,54	100,0
	0,005	1,0	148,7±8,08	87,7
	0,05	0,9	140,0±3,46	81,5
	0,5	0,7	113,3±8,08	74,4
	5	0,7	109,3±7,02	<u>65,8</u>
	50	1,2	182,0±39,6	<u>59,2</u>

Legenda: Valores expressos em média do número de revertentes ± desvio padrão de triplicatas / IM = índice de mutagenicidade, representando a relação entre o número de revertentes nas placas tratadas e nas placas do controle negativo (DMSO) / % Sobrev. = percentual de sobrevivência nas placas tratadas em relação às placas do controle / Indicação em negrito e sublinhado = IM ≥ 2.0 e/ou %Sobrev ≤ 70/ * = resposta significativa com p ≤ 0,05.

Pode se observar mutagenicidade negativa nas cepas TA97, TA98 e TA102, contudo observa-se IM ≥ 2.0, configurando assim, positivo para

mutagenicidade, na cepa TA100, nas concentrações a partir de 0,05. Em relação à porcentagem de sobrevivência, observa-se citotoxicidade em todas as cepas, porém as concentrações observadas são distintas.

Com base na análise na ausência de metabolização, o derivado de série PFCT 015/14 foi escolhido para ser testado com metabolização exógena.

Na **tabela 07**, estão descritos os resultados analisados da amostra PFCT 015/14, com a metabolização.

Tabela 07. Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do derivado de série PFCT 015/14.

PFCT 015/14 (+S9)				
Cepa	μM	IM	Rev \pm DP	%Sobrev
TA97	0	1,0	51,7 \pm 27,5	100,0
	0,005	1,0	43,7 \pm 7,77	78,5
	0,05	1,6	87,7 \pm 6,81	74,1
	0,5	1,6	82,5 \pm 3,54	<u>67,4</u>
	5	1,8	92,5 \pm 3,50	<u>55,0</u>
	50	2,9	150,0 \pm 26,5	<u>59,9</u>
TA98	0	1,0	45,7 \pm 2,52	100
	0,005	1,1	40,0 \pm 1,00	92,6
	0,05	1,2	36,7 \pm 1,53	82,7
	0,5	1,3	33,3 \pm 1,15	75,6
	5	1,5	30,7 \pm 1,58	<u>67,6</u>
	50	1,8	26,0 \pm 1,00	<u>59,6</u>
TA100	0	1,0	286 \pm 5,290	100
	0,005	1,1	246,0 \pm 5,29	88,8
	0,05	1,3	206,0 \pm 2,49	78,9
	0,5	1,4	197,0 \pm 2,08	73,1
	5	1,7	164,0 \pm 12,5	<u>58,8</u>
	50	2,0	138,0 \pm 3,54	<u>54,3</u>
TA102	0	1,0	297,3 \pm 6,43	100
	0,005	1,1	267,7 \pm 2,52	86,2
	0,05	1,2	238,7 \pm 8,08	80,2
	0,5	1,5	192,0 \pm 7,21	71,9
	5	1,8	165,7 \pm 6,66	<u>59,1</u>
	50	2,3	130,0 \pm 2,52	<u>48,6</u>

Legenda: Valores expressos em média do número de revertentes \pm desvio padrão de triplicatas / IM = índice de mutagenicidade, representando a relação entre o número de revertentes nas placas tratadas e nas placas do controle negativo (DMSO) / % Sobrev. = percentual de sobrevivência nas placas tratadas em relação às placas do controle / Indicação em negrito e sublinhado = IM \geq 2.0 e/ou %Sobrev \leq 70/ * = resposta significativa com $p \leq 0,05$.

Nesta tabela podemos observar mutagenicidade positiva para a cepa TA97, somente na concentração de 50 μM , na cepa TA98 a mutagenicidade é negativa, e nas TA100 e TA102, na concentração 50 μM é positiva. Em relação à sobrevivência, na cepa TA97 a partir da concentração 0,5 μM vemos resultados ≤ 70 e na TA98, TA100 e TA102 a partir da concentração de 5 μM .

5. DISCUSSÃO

Em um trabalho anterior do grupo, foram utilizados dois derivados mais promissores, de série PFCT 011/14 e PFCT 017/14, sendo o terceiro, o de série PFCT 015/14 o alvo de escolha deste presente trabalho. A escolha de utilizar outro derivado, de série PFCT 012/14, partiu do princípio observado no ensaio de viabilidade celular WST-1, onde o mesmo apresentou resultados distintos quando comparado ao derivado PFCT 015/14, porém esses resultados poderiam mostrar-se alterados quando testados em outros sistemas utilizados neste trabalho, como o ensaio de Ames. Com isso, os dois derivados em comparativo ao Fluconazol foram escolhidos como alvo de estudo para este trabalho.

No ensaio de viabilidade celular WST-1, os parâmetros de análise dizem respeito à Concentração Letal da Droga, LC_{50} , que representa a concentração suficiente para matar 50% da população celular, em um período de três horas e em um de vinte e quatro horas. Para complementar a análise destes parâmetros, foi analisado o EC_{50} contra a cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi*, que é a concentração de eficácia do composto com efeito antiparasitário para 50% da população, além do Índice de Seletividade, que é justamente a razão entre a LC_{50} e a EC_{50} , para que se pudesse estabelecer qual composto apresentaria a melhor eficácia antiparasitária, combinando uma dose alta para efeito citotóxico, e com elevado índice de seletividade.

Na tabela 03, pode-se observar que alguns derivados de série PFCT apresentaram a combinação destes fatores sendo os de escolha os compostos PFCT 012/14 e PFCT 015/14, devido aos seus resultados contrários, com o derivado PFCT 012/14 com baixa LC_{50} , indicando que com uma concentração baixa da substância, já seria visto um efeito citotóxico, e que com aumento da exposição, em 24 horas, a concentração seria ainda menor. Porém, em relação a EC_{50} , que se apresentou baixa, denotando a necessidade de uma pequena concentração da substância para que fosse alcançada uma eficácia de 50%; e ainda, um baixo índice de seletividade, quando comparado ao outro composto

escolhido, o que denota a baixa segurança do derivado em questão, sendo muita próxima a razão entre uma dose de eficácia e a dose citotóxica.

O segundo derivado, de série PFCT 015/14, apresentou-se com elevada LC_{50} , dependente do tempo de exposição, que indicou a necessidade de uma concentração elevada da droga para que o efeito citotóxico fosse atingido e que, com o aumento do tempo de exposição, de três horas para 24 horas, o efeito citotóxico ocorre com uma concentração menor da droga; além disso, observou-se baixa EC_{50} , indicando a necessidade de uma pequena concentração da droga para que seja alcançada uma eficácia de 50%; além do elevado Índice de Seletividade, indicativo de segurança do derivado, ou seja, que diz que há uma distância entre a dose citotóxica e a dose de eficácia.

Assim, esses derivados PFCT 012/14 e PFCT 015/14 foram selecionados para serem as drogas testadas em ensaios subsequentes, sendo eles: ensaio de sobrevivência bacteriana e o Teste de Ames e como comparativo, foi utilizada uma amostra do antifúngico Fluconazol.

A fim de se estabelecer a faixa de concentrações teste nos ensaios a serem realizados, foi realizado o ensaio qualitativo de reversão bacteriana. A partir dos resultados obtidos, apresentados no **quadro 2**, utilizando os parâmetros de formação de halos e inibição, as concentrações foram então definidas, dentro de um largo espectro para detecção dos possíveis efeitos citotóxicos e mutagênicos, além da relação entre a dose dessas concentrações e a resposta dos ensaios.

Dentre as diversas abordagens para avaliar a potencial atividade mutagênica de uma substância, se têm o teste com *Salmonella*/fração microsossomal de fígado de rato ou teste de Ames.

O primeiro teste utilizado para avaliar a toxicidade de compostos é o ensaio de reversão bacteriana ou Teste de Ames, que nos permite observar padrões de mutação pontual na estrutura do DNA, de forma pontual com modificação de apenas uma base ou por inserção ou exclusão de algumas bases, fazendo grandes rearranjos no DNA, como quebras ou rearranjos

cromossômicos ou ganho e perda de cromossomos inteiros (SPONCHIADO *et al.*, 2016).

O ensaio de Ames tem a função de detectar a capacidade de uma substância em causar mutações nas linhagens de *Salmonella enterica* sorovar typhimurium modificada, observando – se a formação de colônias, que não deviam ser formadas, por mutações pontuais em um gene. As mutações nos *operons* inibem a biossíntese de histidina, logo, mutações devidas a um agente externo devem ocorrer para que haja o crescimento das colônias em meio deficiente em histidina. Assim através de contagem de colônias nas placas, é possível saber se um determinado composto possui ação mutagênica em função da sua concentração (MARON & AMES, 1983; OECD 471, 1997).

Estes testes bacterianos têm desempenhado um importante papel nesta identificação, por serem testes simples, rápidos e de baixo custo, tanto quanto pela capacidade de reconhecer e detectar um amplo espectro de componentes mutagênicos. Além disto, há uma associação entre um agente ser mutagênico e genotóxico para bactéria e carcinogênico para mamíferos, com uma correlação estimada em 83% (AMES *et al.*, 1973; OECD, 1997; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

De escolha para este trabalho, foram utilizadas as linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102 para detecção de possíveis efeitos mutagênicos e citotóxicos, devido sua sensibilidade a diversos tipos de mutágenos (MARON & AMES, 1983). Outras cepas existentes, como a TA104 e a TA1535 não foram utilizadas, pois dado a continuidade do estudo em relação aos derivados, foi parâmetro manter as mesmas cepas anteriormente utilizadas para análise de outros derivados de série, em outro trabalho do grupo.

As cepas TA97 e TA98 têm por capacidade a detecção de agentes mutagênicos que induze mutação que altera o quadro de leitura (*Frameshit*), agentes mutagênicos que geralmente atuam em unidades repetitivas do DNA fazendo com que haja restauração do quadro de leitura envolvido na biossíntese de histidina. Na cepa TA97, a reversão para o genótipo *his+* ocorre pela deleção dos pares de base G:C; e para a TA98, que apresenta mutação no gene *hisD3052*, a reversão acontece com a deleção de um ou dois pares de

bases desta sequência ou, pela adição de um par G:C. A linhagem TA100 detecta mutágenos que causam substituição de pares de base no DNA, e contém uma mutação no gene *hisG46*, que codifica para a primeira enzima da biossíntese de histidina, sendo o par GC o ponto preferível para a reversão.

Por isso, as cepas TA98 e TA100 são utilizadas para a detecção de qualquer mutágeno heterocíclico, uma vez que ambas são deficientes em nitroredutases (MARON & AMES, 1983; AIUB *et al.*, 2011).

Além disso, as linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102 apresentam o plasmídeo fator R, PKM101, que aumenta a mutagênese química e espontânea por aprimorar o sistema de reparo do DNA presente na cepa.

Segundo OECD 471 (1997), o limite de dose é de 5000 µg/placa, 5mM ou o limite de solubilidade da amostra. Neste trabalho, para o Fluconazol e para os derivados, foi utilizada a concentração limite de 50 µM.

Os resultados foram expressos a partir do cálculo do índice de mutagenicidade (IM), que é a razão entre o número de revertentes nas placas com os compostos (revertentes induzidos + revertentes espontâneos) e o número de revertentes nas placas de controle negativo, os chamados revertentes espontâneos. O resultado é considerado positivo quando o $IM \geq 2$.

De acordo com isso, analisando os resultados da amostra de Fluconazol, apresentados na **tabela 04**, pode-se observar citotoxicidade em todas as cepas, evidenciando uma relação concentração-dependente, na TA 97, em concentrações acima de 0,5µM; para as cepas TA 98 e TA 102 acima de 5 µM e para a TA 100, superior à 50 µM. Quanto à mutagenicidade, não é indicativo de positividade em nenhuma das concentrações testadas, apesar de existir relação dependente da dose para as cepas TA97 ($r^2=0,9778$), TA98 ($r^2=0,9845$) e TA100 ($r^2=0,7735$), que pode indicar que o efeito citotóxico possivelmente mascarou o efeito anterior, partindo da análise de que a citotoxicidade é alta, logo as colônias morreram antes de apresentar o fenótipo da reversão, assim o resultado de reversão bacteriana não pode ser observado.

Segundo Salvadori *et al* (2003), para ser considerada positiva, o composto deve ter em pelo menos uma das cepas, relação dose-resposta significativa entre as concentrações utilizadas e valores de revertentes induzidos, juntamente com índice de mutagenicidade maior ou igual a 2, em pelo menos uma das concentrações testadas.

Analisando os derivados de escolha, o composto de série PFCT 012/14, observando os resultados contidos na **tabela 05**, apresentou uma citotoxicidade elevada em todas as cepas, tendo apresentado resultados próximos ao limite esperado já nas primeiras concentrações, e mostrou-se também positivo para mutagenicidade, com uma resposta dependente da dose, onde com o aumento da concentração do derivado, ocorreu um aumento do índice de mutagenicidade, onde podemos deduzir também que com a elevada taxa de morte não houve tempo de ocorrência da reversão.

Para a amostra PFCT 015/14, na **tabela 06**, os resultados em relação à mutagenicidade são negativos para quase todas as cepas, com exceção da linhagem TA100, que pode representar uma ação direcionada do derivado em causar substituição dos pares de bases no DNA, além de indicar também a ação de mutágenos heterocíclicos e de radicais livres.

Analisando os resultados de ambos, o derivado PFCT 015/14, teria menor potencial hepatotóxico em comparação ao Fluconazol e ao derivado do PFCT 012/14, além de ter não ser citotóxico no ensaio com ausência de metabolização, por isso, foi o derivado de escolha para testado no ensaio de Ames com metabolização exógena, por ser potencialmente o derivado mais promissor.

Segundo a OECD 471 (1997), a pesquisa por metabólitos mutagênicos é necessária já que algumas substâncias precisam ser metabolizadas para que seus derivados apresentem atividade mutagênica. O mais comumente utilizado o teste com metabolização exógena (S9), onde ocorre a substituição do tampão fosfato 0,2M pH 7,4 pela fração S9 mix 4% (Molecular Toxicology Inc., Moltox™, EUA) durante a fase de pré-incubação. A fração é preparada a partir de fígados de ratos machos Sprague-Dawley pré-tratados com Aroclor 1254

(bifenil-policlorinato), que nada mais é que um indutor da síntese de enzimas do complexo P450, em especial CYP1A e CYP2B. Com metabolização exógena (+S9), mostrado na tabela 06, podemos observar que a mutagenicidade é positiva somente para a concentração de 50 µM e em relação à sobrevivência, há um padrão para as últimas duas concentrações nas cepas, exceto na TA98, o que nos mostra a relação entre a dose-resposta do composto. E quando comparamos com o ensaio na ausência de metabolização exógena, podemos observar que a metabolização não interferiu de forma significativa no aumento do índice de mutagenicidade e, por conseguinte na sobrevivência, onde houve queda da sobrevivência na cepa TA97 em ambos os casos, a partir da concentração de 0,5 µM/placa. Com isso, o composto foi considerado mutagênico, quando analisado na resposta dose-dependente, principalmente em relação à concentração de 50 µM/placa.

E mesmo, com as diferenças genéticas entre as linhagens de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* utilizadas neste trabalho que possibilitam as variações observadas nos índices de mutagenicidade e sobrevivência, foi observado efeito mutagênico para todas as cepas testadas dos derivados, retificando novamente, que essa relação foi dependente da dose.

6. CONCLUSÃO

- Em relação à citotoxicidade, o Fluconazol foi considerado com o menor perfil citotóxico, em seguida o composto de série PFCT 015/14, e por fim o derivado PFCT 012/14.
- Em relação à mutagenicidade ambos foram considerados mutagênicos, dependendo da dose, sendo o derivado PFCT 015/14 considerado mutagênico na maioria das cepas a partir da concentração máxima (50µM/placa), sendo a faixa de segurança do derivado em 5 µM.
- O derivado de ordem de série PFCT 015/14, ainda assim, foi considerado o mais promissor dentro os testados neste trabalho, devido a sua baixa citotoxicidade e mutagenicidade nas concentrações testadas quando comparado ao PFCT 012/14 e o Fluconazol, além do relativamente baixo efeito hepatotóxico e alto índice de seletividade no ensaio WST-1 quando comparadas ao fármaco de origem, o Fluconazol. Assim, recomenda-se a análise *in vivo* de efeitos clastogênicos e aneugênicos, com novos ensaios como o micronúcleo, para que se possam comparar seus resultados com os outros derivados mais promissores, estudados em outro trabalho do grupo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIUB, C. A. F & FELZENSZWALB, I. Os Princípios do Teste de Ames (*Salmonella*/ Microsomo) e sua aplicabilidade. SBG, 11-16, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. 26 de janeiro de 1999. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/agencia/destaques/apr+agencia>>. Acesso em: 20/10/2016.

ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessário ao desenvolvimento de medicamentos. 1-48, 2013.

ANVISA. Bula Profissional Fluconazol Genérico. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=23179912016&pIdAnexo=3909583> Acesso em: 15/05/2017.

ARAÚJO-JORGE, T.C & CASTRO, S.L. Doença de Chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368p.

CALIXTO, JOÃO.B; JÚNIOR, JARBAS M.S. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. Gazeta Médica da Bahia; 78 (Suplemento 1): 98-106, 2008.

CAMPOS, F.M.F. Caracterização do gene que codifica a enzima álcool desidrogenase (TcADH) e associação da sua baixa expressão com o fenótipo de resistência in vitro do *Trypanosoma cruzi* ao benzonidazol. Belo Horizonte, 2007.

CANÇADO, J.R. Terapêutica específica. In: DIAS, JCP, COURA, JR (eds). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz., p.323-351, 1997.

CARRILLO, A.J.M ; GIUSIANO; G, EZKURRA, P.A; QUINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. Rev Esp Quimioterap, vol. 19 n.2, 130-139, 2006.

CNS251/97.Disponívelem:<http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/resolucoes/resolucoes.htm> Acesso em: 15/09/2016.

COURA, J.R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 104(4): 549-554, 2009.

COURA, J. R; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Memórias Instuto Oswaldo Cruz vol.97 n.1, 2002.

COURA, J.R & VINÃS, PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature 465, S6–S7, 2010.

COUTINHO, M & DIAS, J.C.P. A Descoberta da Doença de Chagas. Cadernos de Ciência & Tecnologia. vol.16, n.2, 11-51, 1999.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17(Suplemento): 165-169, 2001.

DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. Caderno de Saúde Pública. Rio de Janeiro, 23 Sup 1:S13-S22, 2007.

DIAS, J.C.P et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2016. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222016000500007> acessado em: 15/03/2017.

DIAS, J.C.P. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 41-45, 2009.

DIAS, J.C.P, COURA J.R. Epidemiologia. In: DIAS, JCP, COURA, JR (eds) Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 33-66, 1997.

FERREIRA, F. G.; POLLI, M. C.; OSHIMA FRANCO, Y.; FRACETO, L. F. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. Revista Eletrônica de Farmácia. Goiás, v.6, n.1, p.14-24, 2009.

FRANÇA, R.R.F, *et al.* Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 α -desmetilase Contra Trypanosoma cruzi. Revista Virtual de Química. 2014. vol.6 n.5, 1483-1516.

MARODIN, G; GOLDIM, J.R. Confusões e ambiguidades na classificação de eventos adversos em pesquisa clínica. Revista Esc Enferm USP, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v43n3/a27v43n3.pdf>> Acesso em 20/11/2016.

GUIDO, R. V. C. et al. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. Revista Estudos Avançados. São Paulo, v.24, n.70, p.81-98, 2010.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS, Farmanguinhos\FIOCRUZ;

Momento terapêutico, 2006. Disponível em:
<<http://www.far.fiocruz.br/farmanguinhos/images/stories/phocadownload/fluconazol.pdf>>. Acesso em 20/05/2017.

MALAFAIA, G; RODRIGUES, A.S.L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, vol.43 no.5 Uberaba, 2010.

MARON, D.M & AMES, B.N. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. Mutation Res. 173-215, 1983.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. Jornal Brasileiro de Pneumologia . 32(5):449-60, 2006.

MEDLEY. BULA FLUCONAZOL. 2011. Disponível em:
<http://www.medicalservices.com.br/media/38447378/fluconazol_profissional_caps.pdf>. Acesso em: 20/05/2017.

MOLINARO, E.M, *et al.* Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. EPSJV; IOC, vol.4, 1-98, 2009.

MORTELMANS, K & ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research. Elsevier, 29-60, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso. 8ºed, 2010.

OECD. 1997. Test Guideline 471. Bacterial Reverse Mutation Test. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals. Paris, Organization for Economic Cooperation & Development.

OLIVEIRA, M.F *et al.* Tratamento Etiológico da Doença de Chagas no Brasil. Revista de Patologia Tropical. vol. 37 (3): 209-228, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Weekly Epidemiol Rec. Fev;90(6):33-43, 2015.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Boas Práticas Clínicas: Documento das Américas, 2005. Disponível em:<
http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/boaspraticas_americas.pdf>
Acesso em 20/10/2016.

RIBEIRO, A. L. P & ROCHA, M. O. C. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31(3):301-314, 1998.

ROCHE. Cell proliferation reagent WST – 1 protocol, 2011.

SALVADORI, D.M.R *et al.* Mutagênese Ambiental, ed da ULBRA, 2003.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2005. vol. 38, 1-29.

SOBRINHO, J.L.S; *et al.* Delineamento de Alternativas Terapêuticas para o Tratamento da Doença de Chagas. Revista de Patologia Tropical. 2007. vol.36 n.2, 1-16.

SOUZA, J.B.T. Alvos Moleculares Promissores para o Desenvolvimento de Novos Fármacos Antichagásicos. Revista Augustus. vol. 19 n. 38, 9-28, 2014.

SPONCHIADO, G *et al.* Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: a systematic review. J Ethnopharmacol. 178:289-96, 2016.

SUETH-SANTIAGO, V *et al.* CYP51: Uma Boa Ideia?. Revista Virtual Química, 7 (2), 539-575, 2015.

URBINA, J.A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 311-318, 2009.

VIÑAS, P.A & DIAS, J.C.P. WHO global network for Chagas disease elimination. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009.