



**PPGBMC**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular -**  
**PPGBMC**

Marcela de Oliveira Macedo

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DE  
NOVOS DERIVADOS NITROTRIAZÓLICOS EFICAZES FRENTE AO  
*Trypanosoma cruzi*

Orientadora: Dra. Cláudia Alessandra Fortes Aiub

Co-orientador: Dr. Frederico Silva Castelo Branco

Co-orientador: Dr. Carlos Fernando Araújo-Lima

Rio de Janeiro

2022

Marcela de Oliveira Macedo

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DE  
NOVOS DERIVADOS NITROTRIAZÓLICOS EFICAZES FRENTE AO  
*Trypanosoma cruzi*

Dissertação de mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Molecular e  
Celular da Universidade Federal do  
Estado do Rio de Janeiro como  
parte dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em  
Biologia Molecular e Celular.

Orientadora: Dra. Cláudia Alessandra Fortes Aiub

Co-orientador: Dr. Frederico Silva Castelo Branco

Co-orientador: Dr. Carlos Fernando Araújo-Lima

Rio de Janeiro

2022

Marcela de Oliveira Macedo

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DE  
NOVOS DERIVADOS NITROTRIAZÓLICOS EFICAZES FRENTE AO  
*Trypanosoma cruzi*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Aprovada em:

Orientadora: Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub.  
Co-orientador: Dr. Frederico Silva Castelo Branco  
Dr. Carlos Fernando Araujo-Lima.

Banca Examinadora:



Dra. Andréia da Silva Fernandes Campos  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Assinado digitalmente por:  
JULIANNA SICILIANO DE ARAUJO  
Data: 31/08/2022 - 21:38:35h

Dra. Julianna Siciliano de Araújo  
Secretaria Municipal de Saúde – SMS - RJ



Dra. Joelma Freire de Mesquita  
Universidade do Federal Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

 BEATRIZ FERREIRA DE CARVALHO PATRICIC  
Data: 31/08/2022 15:23:09-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dra. Beatriz Ferreira de Carvalho  
Universidade do Federal Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Rio de Janeiro

2022

M113 Macedo, Marcela de Oliveira  
Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico de novos derivados nitrotriazólicos eficazes frente ao Trypanosoma cruzi / Marcela de Oliveira Macedo. -- Rio de Janeiro, 2022.  
58 f.

Orientadora: Cláudia Alessandra Fortes Aiub.  
Coorientador: Frederico Silva Castelo Branco.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, 2022.

1. Nitrotriazóis. 2. Mutagenicidade. 3. Citotoxicidade. 4. Doença de Chagas. I. Aiub, Cláudia Alessandra Fortes, orient. II. Branco, Frederico Silva Castelo, coorient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tudo que me deu nessa vida, principalmente minha família que é meu alicerce.

Aos meus pais por me apoiarem, orientarem e guiarem meus passos, pois sem eles eu não seria nada.

Ao meu irmão por ser meu grande amigo nessa jornada terrena e as minhas três lindas sobrinhas que são minhas princesas e válvulas de escape.

Ao meu querido e amado esposo que é meu grande amor, meu apoiador que torce incondicionalmente por mim.

A professora Cláudia Aiub que abriu a porta do mestrado ao me aceitar como aluna mesmo depois de tantos anos que estive fora da academia.

Ao professor Fred que em momento algum desistiu de mim. E ao Rodolfo França que forneceu o material de estudo.

Ao professor Carlos e colegas do Labmut que me acolheram na reta final com muita paciência.

Às colegas de laboratório Letícia e Elisangela Guerreiro que me ajudaram nas dificuldades.

E aos colegas que conheci e aos amigos que fiz nesse período de mestrado.

## EPÍGRAFE

“O homem inventou a bomba atômica, mas me diz que rato inventaria a própria ratoeira”.

Albert Einstein.

## RESUMO

A doença de Chagas (DC) foi descoberta em 1909 tendo sido descrito o agente etiológico, patogenia, sintomatologia. Até os dias atuais continua sendo considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e um grande problema de saúde pública. A identificação e o tratamento da doença de Chagas são objetos de estudos de cientistas e motivo de preocupação para os setores de gestão pública, política e científica devido as dificuldades em obter maior conhecimento das áreas epidemiológicas visto que o diagnóstico, tratamento farmacológico e rastreamento da doença de Chagas ainda gera incertezas em relação ao seu tratamento. Vários medicamentos vêm sendo desenvolvidos no estudo contra o *T. cruzi* dentre eles encontram-se os nitrocompostos, mais recentemente os nitrotriazóis, alguns são agentes bifuncionais com dois mecanismos de ação: substratos de NTR-I (nitrorredutase I) e inibidores reversíveis de CYP51 que apresentaram alta atividade *in vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi*.

Neste trabalho nos foram cedidos 13 compostos que foram avaliados quanto a citotoxicidade e mutagenicidade através do Teste de mutação reversa bacteriana, citotoxicidade e ensaios de viabilidade celular para predizer o potencial mutagênico das amostras. As mesmas moléculas já passaram por avaliação biológica: Avaliação *in vitro* anti-*T. Cruzi*, Avaliação preliminar da citotoxicidade *in vitro*, Avaliação na enzima nitrorredutase de *Trypanosoma cruzi* (TcNTR) e Avaliação antifúngica *in vitro* contra *Sporothrix sp.*.

Dos compostos analisados, 8 apresentaram mutação por indução que altera o quadro de leitura (*Frameshit*) por adição e/ou deleção dos pares de base G:C, podendo ter como causa a estrutura raiz das moléculas dos compostos.

Os 5 compostos que se mostraram ativos contra o *T. cruzi* foram testados em ensaios de viabilidade celular e todos apresentaram efeito citotóxico dose dependente com perda, porém nenhum com lesão celular significativa.

A presença de citotoxicidade e a indução de mutagenicidade podem ser decorrentes dos grupos funcionais, do efeito estérico ou de ressonância que levam a alteração da estabilidade, metabolismo, potência dos compostos analisados.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, citotoxicidade, mutagenicidade, nitrotriazóis.

## ABSTRACT

Chagas disease (CD) was discovered in 1909 and the etiological agent, pathogenesis and symptomatology were described. To this day, it continues to be considered a neglected disease by the World Health Organization (WHO) and a major public health problem. The identification and treatment of Chagas disease are objects of studies by scientists and a matter of concern for the public, political and scientific management sectors due to the difficulties in obtaining greater knowledge of the epidemiological areas since the diagnosis, pharmacological treatment and screening of the disease de Chagas still generates uncertainties in relation to its treatment. Several drugs have been developed in the study against *T. cruzi*, among them are nitrocompounds, more recently nitrotriazoles, some are bifunctional agents with two mechanisms of action: substrates of NTR-I (nitroreductase I) and reversible inhibitors of CYP51 and showed high in vitro and in vivo activity against *T. cruzi*.

In this work, 13 compounds were developed and evaluated for cytotoxicity and mutagenicity through the bacterial reverse mutation test, cytotoxicity and cell viability assays to predict the mutagenic potential of the samples. The same molecules have already undergone biological evaluation: In vitro anti-*T. Cruzi*, Preliminary evaluation of in vitro cytotoxicity, Evaluation on the enzyme nitroreductase of *Trypanosoma cruzi* (TcNTR) and Antifungal evaluation in vitro against *Sporothrix* sp..

Of the analyzed compounds, 8 had an induction mutation that alters the reading frame (Frameshit) by addition and/or deletion of G:C base pairs, which may be caused by the root structure of the compounds' molecules.

The 5 compounds that were active against *T. cruzi* were tested in cell viability assays and all showed a dose-dependent cytotoxic effect with loss, but none with significant cell damage.

The presence of cytotoxicity and the induction of mutagenicity may be due to functional groups, steric or resonance effects that lead to changes in stability, metabolism, potency of the analyzed compounds.

**Keywords:** Chagas disease, cytotoxicity, mutagenicity, nitrotriazoles.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Estrutura química do composto 2 (PRCN 011/17) (A), do composto 4 (PRCN 015/17) (B) e do composto 6 (PRCN019/17) (C).....	22
<b>Figura 02</b>	Estrutura química do composto 12 (PRCN062/19) (A), do composto 13 (PRCN063/19) (B) e do composto 9 (PRCN033/18) (C).....	23
<b>Figura 03</b>	Estrutura química do composto 11 (PRCN061/19) (A) e do composto 10 (PRCN060/19) (B) .....	25
<b>Figura 04</b>	Estrutura química do composto 01 (PRCN01/19) (A) e do composto 07 (PRCN022/19.1) (B).....	27
<b>Figura 05</b>	Estrutura química do composto 05 (PRCN015/19) (A) e do composto 03 (PRCN014/19) (B).....	28
<b>Figura 06</b>	Estrutura química do composto 08 (PRCN028/17).....	30
<b>Figura 07</b>	Estrutura básica dos compostos.....	36
<b>Figura 08</b>	Preparo da amostra .....	19
<b>Figura 09</b>	Teste de mutagenicidade qualitativo.....	19
<b>Figura 10</b>	Teste de citotoxicidade qualitativo .....	20
<b>Figura 11</b>	Teste mutagenicidade quantitativa (Teste de Ames).....	21
<b>Figura 12</b>	Teste citotoxicidade quantitativa (sobrevivência).....	22
<b>Figura 13</b>	Preparo das células HepG2.....	23

**Figura 14** Procedimento de ensaio WST-1 .....25

**Figura 15** Procedimento de ensaio LDH .....26

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01** Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 e LDH em diferentes concentrações dos compostos 4 e 6 após 24, 48 e 72 h de incubação ..... 32
- Gráfico 02** Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 e LDH em diferentes concentrações do composto 13 após 24, 48 e 72 h de incubação ..... 33
- Gráfico 03** Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 e LDH em diferentes concentrações do composto 1 após 24, 48 e 72 h de incubação ..... 33
- Gráfico 04** Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 e LDH em diferentes concentrações do composto 8 após 24, 48 e 72 h de incubação ..... 34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Características das cepas padrão utilizadas no ensaio de teste de Ames. ....	13
<b>Tabela 02.</b> Características dos pró-fármacos do grupo nitrotriazol .....	14
<b>Tabela 03.</b> Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade das amostras na concentração de 1mg/mL .....	21
<b>Tabela 04.</b> Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade dos compostos 2, 4 e 6 nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).....	23
<b>Tabela 05.</b> Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade do composto 12, 13 e 9 nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).....	24
<b>Tabela 06.</b> Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade dos compostos 11 e 10 nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).....	26
<b>Tabela 07.</b> Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade dos compostos 01 e 07 nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).....	27
<b>Tabela 08.</b> Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade dos compostos 05 e 03 nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).....	29
<b>Tabela 09.</b> Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade do composto 08 nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).....	30

<b>Tabela 10.</b> Conc. limite dos compostos 2, 4 e 6.....	23
<b>Tabela 11.</b> Conc. limite dos compostos 9, 12 e 13.....	25
<b>Tabela 12.</b> Conc. limite dos compostos 11 e 10.....	26
<b>Tabela 13.</b> Conc. limite dos compostos 01 e 07.....	28
<b>Tabela 14.</b> Conc. limite dos compostos 05 e 03.....	29
<b>Tabela 15.</b> Conc. limite do composto 08 .....	31
<b>Tabela 16.</b> Resultado final de citotoxicidade e mutagenicidade das amostras.	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>4NPD</b>	4-nitro-O-phenilenodiamina
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AZS</b>	Azida Sódica
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CYP51</b>	Enzima 14 $\alpha$ -desmetilase
<b>DC</b>	Doença de Chagas
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
<b>Farmanguinhos</b>	Instituto de Tecnologia em Fármacos
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
<b>His-</b>	Cepas bacterianas deficientes na síntese do aminoácido histidina
<b>IBEs</b>	Inibidores da síntese de ergosterol
<b>IM</b>	Índice de mutagenicidade
<b>LB Líquido</b>	Lysogenic Broth
<b>LB Sólido</b>	Louria Bertani Ágar
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>MMC</b>	Mitomomicina C
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

<b>NTR-I</b>	Nitrorredutase I
<b>OECD</b>	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPM</b>	Velocidade de Oscilação
<b>Rev. ± D.P.</b>	Reversão ± desvio padrão
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>Sobrev.</b>	% de sobrevivência
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µM</b>	Micromolar
<b>WST</b>	Water Soluble Tetrazolium

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	OBJETIVO .....	16
2.1	Objetivo Geral .....	16
2.2	Objetivos Específicos .....	16
3	METODOLOGIA .....	16
3.1.	Cepas bacteriana utilizadas .....	16
3.2.	Amostras estudadas .....	17
3.3.	Análise Qualitativa .....	18
3.3.1	Preparo das amostras .....	18
3.3.2	Teste de mutagenicidade qualitativo .....	19
3.4.	Análise quantitativa .....	20
3.4.1	Teste mutagenicidade quantitativa (Teste de Ames) .....	20
Figura 11.	Teste mutagenicidade quantitativa (Teste de Ames) .....	21
3.4.2	Teste citotoxicidade quantitativa (Teste de sobrevivência) .....	21
Figura 12.	Teste citotoxicidade quantitativa (Sobrevivência) .....	22
3.5.	Análise de citotoxicidade .....	22
3.5.1	Preparo da células HepG2 .....	22
3.5.2	Ensaio WST-1 .....	24
3.5.3	Ensaio LDH .....	25
4	RESULTADOS .....	26
4.1	Análise Qualitativa .....	26
4.2	Análise Quantitativa .....	28
4.2.1.	Grupo de resultados 1 .....	28
4.2.2.	Grupo de resultados 2 .....	32
4.2.3.	Grupo de resultados 3 .....	35
4.2.4.	Grupo de resultados 4 .....	38
4.2.5.	Grupo de resultados 5 .....	41
4.2.6.	Grupo de resultados 6 .....	44
4.3	Determinação do potencial citotóxico em cultura de células HepG2 .....	46
5	DISCUSSÃO .....	48
6	CONCLUSÃO .....	52
	REFERÊNCIAS .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

A tripanosomíase americana ou Doença de Chagas foi descoberta pelo cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909, sendo transcrito por este a doença, o agente etiológico, os vetores e reservatórios domésticos e silvestres, parte da patogenia e sintomatologia (ALMEIDA, 2012). É uma zoonose do continente americano com forte incidência no Brasil sendo causada pelo hemoprotozoário *Trypanosoma cruzi* (ALVES *et al.*, 2018).

A doença de Chagas no Brasil é endêmica, um grande problema de saúde pública e considerada uma enfermidade negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) além de vir como resultado de diversos fatores.

A identificação e o tratamento da doença de Chagas são objetos de estudos de cientistas e motivo de preocupação para os setores de gestão pública, política e científica devido as dificuldades em obter maior conhecimento das áreas epidemiológicas (DIAS *et al.*, 2015), tendo em conta que o diagnóstico, tratamento farmacológico e rastreamento da doença de Chagas ainda gera incertezas em relação ao seu tratamento (CONITEC, 2018).

De acordo com Papadopoulou (2015; 2017), muitos compostos têm sido desenvolvidos no estudo contra o *T. cruzi* dentre eles encontram-se os nitrocompostos, mais recentemente os nitrotriazóis.

Alguns destes compostos foram desenhados como agentes bifuncionais visando serem substratos de nitrorredutase (NTR-I) e inibidores reversíveis de CYP51 e apresentaram alta atividade *in vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi*. A atividade tripanocida dos 3-nitrotriazóis foi associada em parte à ativação de uma NTR-I (CASTRO, 2017).

O grupo nitro (NO<sub>2</sub>) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino (NH<sub>2</sub>) pela ação de enzimas do tipo nitrorredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO<sub>2</sub>. Este processo, iniciado pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase, leva à formação de um intermediário nitro radicalar (R-NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH). O radical reduz o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) formando o íon superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e regenerando o grupo NO<sub>2</sub> num processo conhecido como ciclo redox (*redox cycling*). O íon superóxido formado é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que, através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe<sup>III</sup>, forma o radical hidroxila (<sup>•</sup>OH). Aos nitrotriazóis têm sido atribuído o efeito tripanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T.*

*cruzi* (DIAS, 2009).

Nesse sentido, o grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese de Fármacos — LASFAR do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) vem trabalhando na busca de novos agentes nitrotriazólicos, com resultados preliminares muito promissores, motivo pelo qual estão com estruturas químicas sob sigilo. A síntese dessas substâncias foi feita pelo grupo da Dra. Núbia Boechat e do Dr. Frederico Silva Castelo Branco. As análises de toxicidade foram realizadas em parceria com o Laboratório de Genotoxicidade da Unirio para avaliação do potencial de mutagenicidade e genotoxicidade, e detecção de concentração segura destes compostos, que é o propósito do presente trabalho.

Teste de mutação reversa bacteriana ou Teste de Ames detecta mutações que revertem as mutações presentes nas cepas de teste e restaura a capacidade funcional da bactéria de sintetizar um aminoácido essencial. As bactérias revertentes são detectadas por sua capacidade de crescimento na ausência do aminoácido histidina exigido pela cepa de teste parental.

A especificidade das cepas de teste pode fornecer algumas informações úteis sobre os tipos de mutações que são induzidas por agentes genotóxicos. Para esse teste é recomendado o uso de um conjunto de linhagens de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* para avaliação do potencial mutagênico de substâncias, sendo TA97, TA98 para detectar mutágenos que levam ao deslocamento de quadro de leitura como: inserções ou deleções de pares de base; TA100 para detectar mutágenos que induzem substituições de pares de base; TA102 para detectar mutágenos que induzem substituições de pares de base e indutores de danos oxidativos (OECD 471, 2020); TA104 para detectar mutágenos que induzem substituições de pares de base.

O ensaio colorimétrico WST (*Water Soluble Tetrazolium*) determina a habilidade de células metabolicamente viáveis de reduzir o WST-1, por desidrogenases mitocondriais, em um cristal de formazan insolúvel em água, permitindo sua quantificação colorimétrica (ROCHE, 2011).

Já o ensaio LDH lactato desidrogenase (*Lactate dehydrogenase*, LDH) é um ensaio colorimétrico que utiliza de sal de tetrazólio. Procura-se avaliar o potencial citotóxico da substância testada, desta vez, através da detecção de lesão à membrana plasmática.

As mesmas moléculas já passaram por avaliação biológica: avaliação *in vitro* anti-

*T. Cruzi*, avaliação preliminar da citotoxicidade *in vitro*, avaliação na enzima nitroreductase de *Trypanosoma cruzi* (TcNTR) e avaliação antifúngica *in vitro* contra *Sporothrix sp.*.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a mutagenicidade e citotoxicidade dos diferentes compostos de nitrotriazóis através do Teste de mutação reversa bacteriana ou Teste de Ames, citotoxicidade e ensaios de viabilidade celular para predizer a citotoxicidade das amostras.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Correlacionar os diferentes grupamentos químicos nas moléculas apresentadas com as características de mutagenicidade e citotoxicidade observadas;
- Predizer as concentrações limites de segurança considerando o desfecho da mutagenicidade e citotoxicidade nas diferentes moléculas analisadas;

## 3 METODOLOGIA

### 3.1. Cepas bacteriana utilizadas

Foram utilizadas cinco cepas padrão da bactéria *Salmonella enterica sorovar Typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 para proliferação a partir de colônias isoladas em caldo lisogênico (LB) (5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de triptona; 10 g/L de NaCl) com ampicilina (8 mg/mL), a 37°C, com agitação orbital de 250 OPM, até atingirem fase estacionária de crescimento. Foi verificado a densidade da cultura através de uma diluição seriada em duplicata e semeadura em placas de Petri contendo ágar Louria Bertani (LB ágar) (5 g/L de extrato de levedura; 10g/L de triptona; 10 g/L de NaCl; 15 g/L de ágar) seguido de incubação das placas a 37°C, durante 24 horas (AIUB, 2011).

Cada cepa apresenta padrões e características específicas, detalhadas na **tabela 01** (UMBUZEIRO & VARGAS, 2003; AIUB, 2011).

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

Cepa	Mutação em <i>His</i>	Plasmídeo	Outras mutações	Mutação detectada
------	-----------------------	-----------	-----------------	-------------------

TA97	<b><i>hisD6610</i></b> <b><i>hisO1242</i></b>	pKM101	$\Delta rfa$ , ( <i>uvrBchlbio</i> )	Alteração no quadro de leitura	Adição e deleção de G:C
TA98	<b><i>hisD3052</i></b>	pKM101	$\Delta rfa$ , ( <i>uvrBchlbio</i> )	Alteração no quadro de leitura	Deleção de G:C
TA100	<b><i>hisG46</i></b>	pKM101	$\Delta rfa$ , ( <i>uvrBchlbio</i> )	Substituição	G:C para A:T
TA102	<b>pAQ1 (<i>hisG428</i>)</b>	pKM101, pAQ1	<i>rfa</i>	Substituição	A:T para G:C
TA104	<b>pAQ1 (<i>hisG428</i>)</b>		<i>rfa</i> ( <i>uvrBchlbio</i> )	Substituição	A:T para G:C

Fonte: Adaptado de UMBUZEIRO & VARGAS, 2003; AIUB, 2011.

### 3.2. Amostras estudadas

As amostras testadas são do grupo nitrotriazólico com pureza acima de 95% em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que é o estabelecido para serem enviados para testes *in vitro* contra o *T. cruzi* (FRANÇA, 2018), sendo cedidas para este trabalho pela Dra. Núbia Boechat e pelo Dr. Frederico Silva Castelo Branco, pesquisadores do Departamento de Química Medicinal da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Essas substâncias são da série PRCN e em razão da possibilidade de pedido de proteção intelectual desses derivados suas estruturas estão protegidas. As moléculas apresentam as características descritas na **tabela 2**.

**Tabela 02.** Características dos compostos estudados do grupo nitrotriazol:

AMOSTRAS				
Grupo	Amostra nº	Código	Massa	Solvente

			<b>Molecular (g/mol)</b>	<b>Conc. 100%</b>
<b>1</b>	002	PRCN011/17	376,10	DMSO
	004	PRCN015/17	452,13	DMSO
	006	PRCN019/17	426,11	DMSO
<b>2</b>	009	PRCN033/18	424,07	DMSO
	012	PRCN062/19	410,06	DMSO
	013	PRCN063/19	410,06	DMSO
<b>3</b>	010	PRCN060/19	406,11	DMSO
	011	PRCN061/19	406,11	DMSO
<b>4</b>	001	PRCN001/19	390,11	DMSO
	007	PRCN022/19	390,11	DMSO
<b>5</b>	003	PRCN014/19	432,16	DMSO
	005	PRCN015/19	432,16	DMSO
<b>6</b>	008	PRCN028/17	436,10	DMSO

As amostras foram separadas por grupo conforme características e semelhanças estruturais.

### 3.3. Análise Qualitativa

Uma das variáveis existentes no Teste de mutação reversa bacteriana ou Teste de Ames, que pode contribuir para apresentação de resultados do tipo falso-negativos, relaciona-se com a toxicidade gerada pelos compostos avaliados. Uma vez que determinada concentração é considerada tóxica, o número de células viáveis diminui e, assim, por consequência, diminuem o número de revertentes induzidos. É sugerido utilizar como maior concentração a ser avaliada, a primeira dose testada considerada como tóxica, ou seja, aquela primeira concentração que apresenta uma taxa de sobrevivência menor que 70% de colônias em relação ao controle (AIUB, 2011).

Então, foi analisado primeiramente, a citotoxicidade e mutagenicidade gerada pelos compostos avaliados na concentração máxima.

#### 3.3.1 Preparo das amostras

As amostras foram diluídas 1mg/mL, utilizando como o solvente o DMSO puro (concentração de 100%), visto que qualquer diluição abaixo desta interferia na solubilidade das amostras que se encontravam no estado sólido, mantendo-as parcialmente solubilizadas.

Após as amostras terem sido solubilizadas, foram plaqueadas em placas de LB ágar com adição de 2  $\mu$ L de cada amostra e colocadas em estufa por 24 horas para a verificação de contaminação bacteriana das mesmas, conforme figura 8.

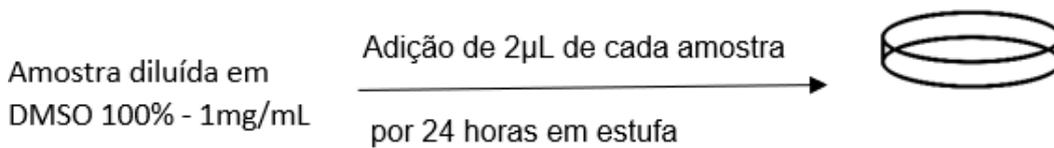


Figura 08. Preparo da amostra

### 3.3.2 Teste de mutagenicidade qualitativo

Após cada cepa padrão ter sido titulada e cultivada, conforme descrito no item 3.1, estas foram ressuspensas em tubos de ensaio e destes foram retirados 100  $\mu$ L de cepa e adicionados 2 mL de gelose e despejado em placa de meio ágar mínimo (15 g de ágar, 20 mL de meio Vogel-Bonner 50x concentrado – 10 g de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio, 500g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada -, 50 mL de glicose 40%, para 930 mL de água destilada) em cada placa foram adicionados discos de papel no qual foram adicionados 3  $\mu$ L de cada amostra mais o padrão (solvente DMSO) para a detecção de mutagenicidade (AIUB, 2011), conforme figura 9.

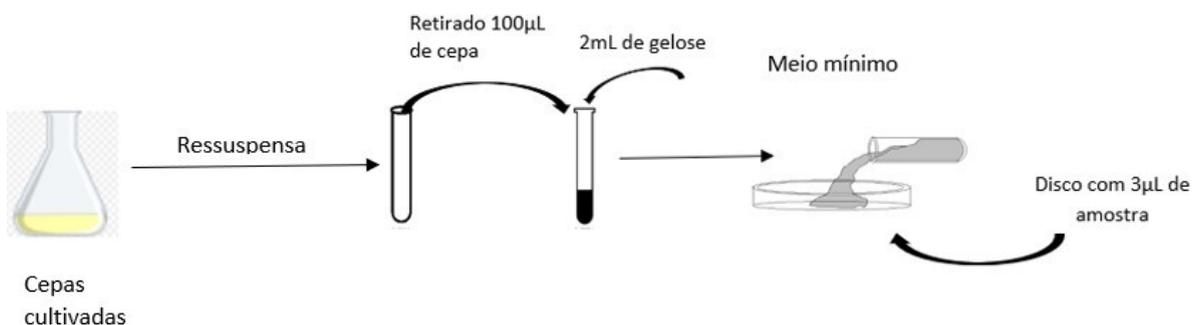


Figura 09. Teste de mutagenicidade qualitativo

### 3.3.3 Teste de citotoxicidade qualitativo

Paralelamente ao item 3.3.2, em placa de meio LB ágar também foram adicionados discos de papel no qual foram adicionados 3  $\mu$ L de cada amostra mais o padrão (solvente DMSO) para a detecção de citotoxicidade – teste de sobrevivência (AIUB, 2011), vide figura 10.

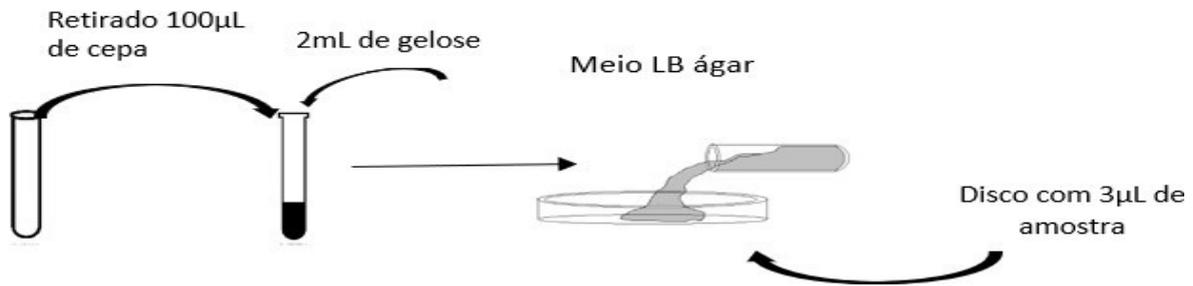


Figura 10. Teste de citotoxicidade qualitativo

Todas placas de ambos os testes foram realizados em triplicata.

### 3.4. Análise quantitativa

O teste mutação reversa bacteriana é rápido, barato e relativamente fácil de realizar. Muitas das cepas do teste têm vários recursos que as tornam mais sensíveis para a detecção de mutações, incluindo sequências de DNA responsivas nos locais de reversão, permeabilidade celular aumentada para moléculas grandes e eliminação de sistemas de reparo de DNA ou aprimoramento de processos de reparo de DNA sujeitos à erros.

#### 3.4.1 Teste mutagenicidade quantitativa (Teste de Ames)

O Teste de Ames quantitativo é baseado na detecção visual de colônias bacterianas que se formam em meio nutriente de composição definida. Foram utilizadas as cepas padrão recomendadas pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD, protocolo N°471 (1997).

Foram incubadas linhagens de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, durante a noite (12 a 16 horas). Foram adicionados 500 µL de tampão fosfato-sódio 0,2M, pH 7,4, 100 µL de cada cepa ( $2 \times 10^9$  cels/mL) que foi incubada e 100 µL da amostra nas concentrações 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL e da solução cloreto de sódio (NaCl) 0,9% que foi considerado grupo controle negativo, em tubos de ensaio com capacidade apropriada em triplicata (OECD 471, 2020).

Foram adicionados aos tubos 2 mL de ágar de superfície (7 g/L de Agar; 5 g/L de NaCl) enriquecido com solução de histidina/biotina 0,5 mM (123,6 g/L Histidina e 96 g/L Biotina) numa proporção de 10:1 (ágar de superfície: histidina/biotina), pH7,4, 45°C. Foi agitado e semeado em ágar mínimo e incubado por 72 horas ao abrigo da luz a 37°C e observado revertentes *his+* que foi calculado com base nos

revertentes espontâneos (OECD 471, 2020), figura 11.

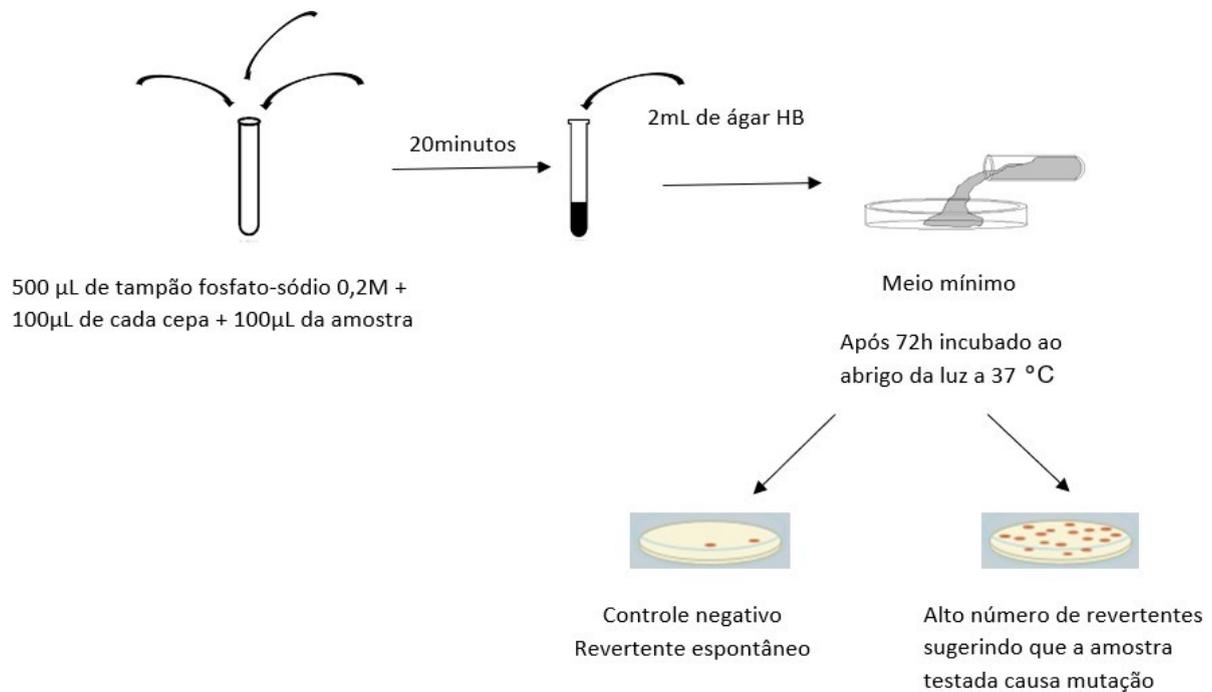


Figura 11. Teste mutagenicidade quantitativa (Teste de Ames)

Os controles positivos por placa: 10 µg/placa de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD) para TA97 e TA98; 1,25 µg/placa de azida sódica (AZS) para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C (MMC) para TA102 e TA104 (OECD 471, 2020).

### 3.4.2 Teste citotoxicidade quantitativa (Teste de sobrevivência)

Paralelamente ao item 3.4.1, foram semeadas células, em meio rico (LB ágar), para verificação do efeito citotóxico, através de teste de sobrevivência. Em meio rico, a semeadura foi feita na concentração de aproximadamente 10 cels/mL e em duplicata (AIUB, 2011), figura 12.

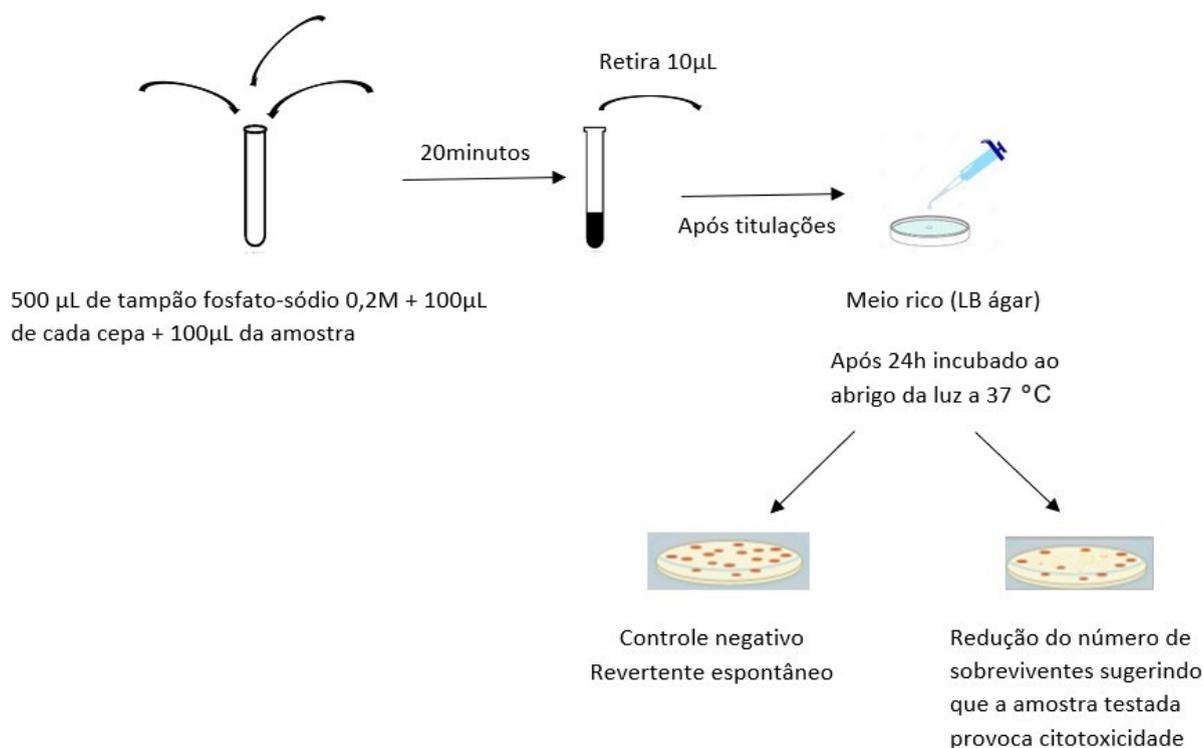


Figura 12. Teste citotoxicidade quantitativa (Sobrevivência)

Os controles positivos por placa: 10 µg/placa de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD) para TA97 e TA98; 1,25 µg/placa de azida sódica (AZS) para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C (MMC) para TA102 e TA104.

### 3.5. Análise de citotoxicidade

Utiliza os ensaios colorimétricos *Water Soluble Tetrazolium* - WST e *Lactate dehydrogenase* - LDH.

Os ensaios de análise de citotoxicidade são prévios para posterior realização de Ensaio de micronúcleo.

Para ambos ensaios foram analisados os compostos 1, 4, 6, 8 e 13, respectivamente PRCN 01/19, PRCN015/17, PRCN019/17, PRCN028/17 e PRCN063/19.

#### 3.5.1 Preparo da células HepG2

Foi retirado um tubo da linhagem de células HepG2 (linhagem de hepatocarcinoma) do botijão de nitrogênio e posto em banho-maria a 37°C, suspenso pelo suporte deixando um espaço bom entre a borda da tampa e água do aparelho, a fim de evitar contaminação. Após descongelamento (aproximadamente 3 minutos) o

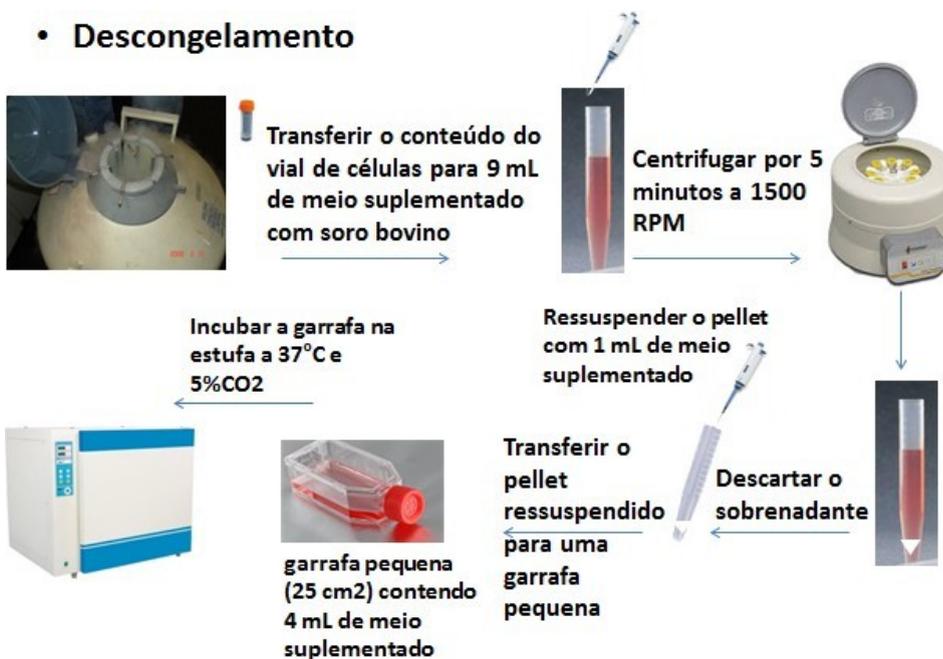
tubo foi colocado no fluxo, rinsado levemente por aproximadamente 2 vezes e retirado 1 mL que foi transferido para um tubo falcon de 15 mL contendo 9 mL de meio DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)], suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB)].

Foram retirados do meio DMSO e glicerol (que são tóxicos para as células após o descongelamento) através de centrifugação a 1500 rpm por 5 min e descartado o meio do falcon. Ao pellet de célula foi adicionado 1 mL de meio DMEM e rinsado diversas vezes com cuidado e evitando formação bolhas, tal procedimento foi realizado até a homogeneização total das células.

Em uma garrafa, foram adicionados 4mL e 1 mL de suspensão celular. A garrafa foi fechada, identificada, datada e incubada na estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Após 24 horas, foi descartado o meio do frasco de cultivo e lavado com 3 mL de PBS 1X, sob leve agitação e descartado. Foi adicionada 3mL de tripsina e incubado na estufa de CO<sub>2</sub> por 5 min. Foram dadas leves batidas na lateral da garrafa para que as células desgrudassem completamente. Todo o conteúdo da garrafa foi colocado em um falcon de 15 mL, adicionado meio DMEM, com soro fetal bovino (SFB) no mesmo volume da tripsina adicionada e centrifugado por 5 min a 1500 rpm. O meio foi descartado e o *pellet* de célula foi ressuspensão com 1mL de meio DMEM (GALVÃO & GOLDSTEIN, 2020), figura 13 (A) e (B).

#### • Descongelamento



(A)

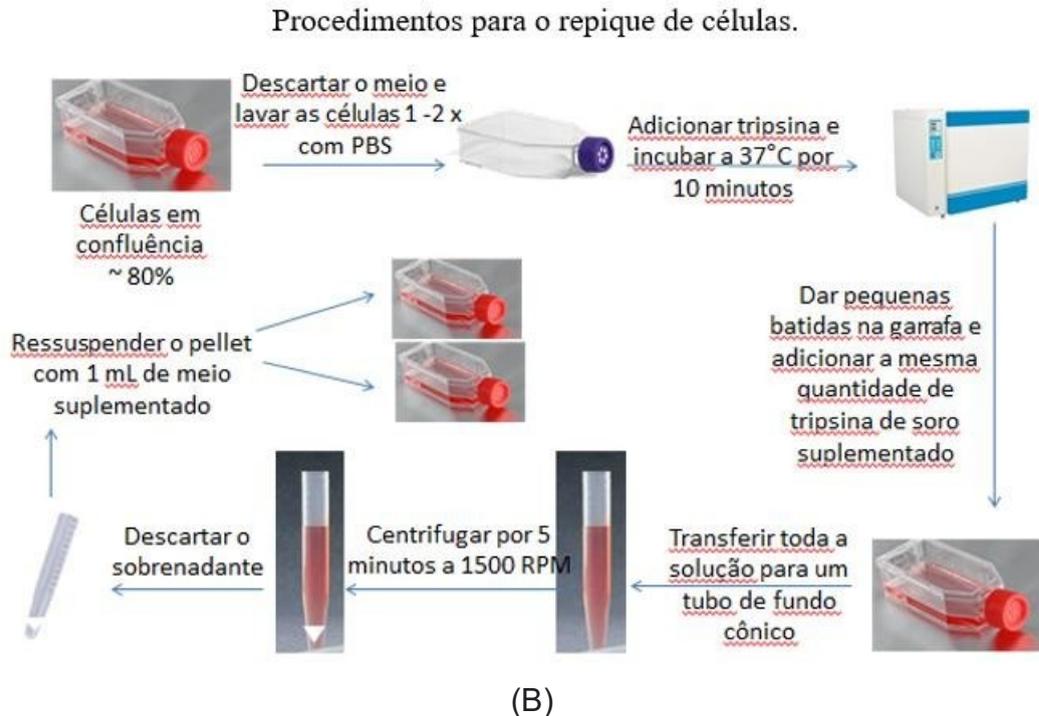


Figura 13. Preparo das células HepG2. (A) Descogelamento, (B) Procedimento repique celular

### 3.5.2 Ensaio WST-1

Culturas de células HepG<sub>2</sub> foram semeadas a densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços e colocadas em estufa a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. A concentração das células na cultura foi determinada em uma câmara de Neubauer na presença do corante de exclusão azul de trypan.

No dia seguinte foram feitas as incubações adicionando uma alíquota de 10 µL das amostras dos compostos nas concentrações de 0,005; 0,05; 0,5 e 5 µg/mL, em triplicata para cada amostra, por 37°C em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Ao final da incubação, o meio foi removido, 100 µL de solução de DMEM com 10% de WST-1 foram adicionados em cada poço e as células permaneceram no escuro a 37°C por 3h. Quantificação das variações colorimétricas foi realizada leitor de microplaca (Polaris Microplate Reader, Celer, Brasil) utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm com a referência de 630 nm. Como padronização dos brancos de reações foram utilizados 100 µL do meio de cultivo sem células e 10 µL do reagente WST-1 (Branco) e 100 µL do meio de cultivo com células e 10 µL do reagente WST-1 (só células). A intensidade da cor amarelo/laranja nos poços de controle negativo (DMSO 1%) foi designada como 100% de viabilidade e todas as comparações adicionais foram baseadas neste

nível de referência para determinar a concentração letal ( $LC_{50}$ ) para 50% de células cultivadas (GALVÃO & GOLDSTEIN, 2020).

O resultado foi considerado positivo quando a diferença entre os tratamentos for maior e diferente estatisticamente ( $p < 0,01$ ) na análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste correlativo de Tukey, em relação ao controle negativo, além da presença de uma curva dose-resposta.

Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração e duas vezes para confirmação dos resultados, figura 14.



Figura 14. Procedimento de ensaio WST-1

### 3.5.3 Ensaio LDH

Antes de realizar a leitura do Ensaio WST-1, foram retirados da placa de 96 poços 100  $\mu$ L de meio de cultura com o composto, a solução de LDH foi pipetada poço por poço e a placa abrigada da luz e reservada na bancada a temperatura ambiente por 15 a 30 min.

A leitura foi realizada por leitor de microplaca (Polaris Microplate Reader, Celer, Brasil) utilizando-se o comprimento de onda de 492 nm com a referência de 630 nm.

Como padronização dos brancos de reações foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultivo sem células e 10  $\mu\text{L}$  do reagente LDH (Branco 1) e 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultivo com células e 10  $\mu\text{L}$  do reagente LDH (só células). A intensidade da cor vermelha nos poços de controle positivo (Triton 5%) foi designada como 100% de dano celular e todas as comparações adicionais foram baseadas neste nível de referência para determinar a concentração letal ( $\text{LC}_{50}$ ) para 50% de células cultivadas (GALVÃO & GOLDSTEIN, 2020).

O resultado foi considerado positivo quando a diferença entre os tratamentos for maior e diferente estatisticamente ( $p < 0,01$ ) na análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste correlativo de Tukey, em relação ao controle negativo, além da presença de uma curva dose-resposta.

Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração e duas vezes para confirmação dos resultados, figura 15.



Figura 15. Procedimento de ensaio LDH

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise Qualitativa

Na tabela 03, podemos observar os resultados de citotoxicidade e mutagenicidade das amostras na concentração de 1mg/mL. Os resultados de citotoxicidade mostraram que o composto 7 apresentou o maior toxicidade em função da presença halo de inibição em todas as cepas testadas.

Em relação a mutagenicidade do composto 7, todas as cepas foram negativa, exceto na TA100. Esse resultado negativo pode ser atribuído a um falso negativo em função da alta toxicidade.

Os demais compostos apresentaram certa seletividade para respostas citotóxicas e mutagênicas perante as cepas avaliadas. Os compostos 8 e 9

apresentaram citotoxicidade em todas cepas, exceto TA97; enquanto os compostos 4 e 5 apresentaram citotoxicidade nas cepas TA100, TA102 e TA104. Já o composto 12 apresentou citotoxicidade nas cepas TA98, TA102 e TA104, enquanto que os compostos 3 e 10 apresentaram citotoxicidade nas cepas TA100 e TA104.

O composto 2 apresentou citotoxicidade nas cepas TA98 e TA100; já o composto 6 e o DMSO apresentaram citotoxicidade nas cepas TA102 e TA104.

Os compostos 1, 11 e 13 apresentaram citotoxicidade apenas nas cepas TA102, TA104 e TA100, respectivamente.

Para mutagenicidade, a cepa TA97 não apresentou crescimento de colônias nas proximidades do ponto de colocação de todos os compostos; a cepa TA98 apresentou crescimento de colônias nas proximidades do ponto de colocação dos compostos 2, 3 e 8; a cepa TA100 apresentou crescimento de colônias nas proximidades do ponto de colocação dos compostos 7 e 12; a cepa TA102 apresentou crescimento de colônias nas proximidades do ponto de colocação do composto 1; a cepa TA104 apresentou crescimento de colônias nas proximidades do ponto de colocação do composto 8.

**Tabela 03.** Resultado de Citotoxicidade e Mutagenicidade das amostras na concentração de 1mg/mL

Qualitativo	Código	Citotoxicidade					Mutagenicidade				
		TA97	TA98	TA100	TA102	TA104	TA97	TA98	TA100	TA102	TA104
Composto 2	PRCN011/17	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Composto 4	PRCN015/17	(-)	(-)	(+)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Composto 6	PRCN019/17	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Composto 9	PRCN033/18	(-)	(+)	(+)	(+)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Composto 12	PRCN062/19	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Composto 13	PRCN063/19	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Composto 10	PRCN060/19	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Composto 11	PRCN061/19	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Composto 1	PRCN001/19	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
Composto 7	PRCN022/19	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Composto 3	PRCN014/19	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Composto 5	PRCN015/19	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Composto 8	PRCN028/17	(-)	(+)	(+)	(+)	(++)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
DMSO 100%	-	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Legenda: Citotoxicidade das amostras: (-) Não há halo de inibição crescimento de colônias nas proximidades do ponto de colocação dos compostos, logo não há citotoxicidade observada; (+) 30 e 40mm, citotoxicidade moderada; (++) Acima de 40mm, citotoxicidade alta. Mutagenicidade das amostras: (-) Não apresenta crescimento de colônias nas proximidades do ponto de colocação dos

compostos, logo não há resposta mutagênica aparente; (+) apresenta crescimento de colônias nas proximidades do ponto de colocação dos compostos, com mutagenicidade induzida.

## 4.2 Análise Quantitativa

Os testes foram realizados a partir de 10% da maior concentração usada no qualitativo, pois foram analisados em função da permeabilidade do composto no meio e sua dispersão.

Nas tabelas abaixo podemos observar os resultados de citotoxicidade e mutagenicidade das amostras nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).

Para avaliação dos testes quantitativo de Ames e sobrevivência, levamos em consideração os parâmetros mutagenicidade quando Índice Mutagênico (IM) for maior ou igual a 2 e sobrevivência quando Sobrev. for menor ou igual a 70% (AIUB, 2011).

As doses/concentrações limites dos compostos foram baseadas nos resultados de mutagenicidade.

### 4.2.1. Grupo de resultados 1

Esses compostos 2, 4 e 6 apresentam diferença na posição da fenoxila em sua estrutura.

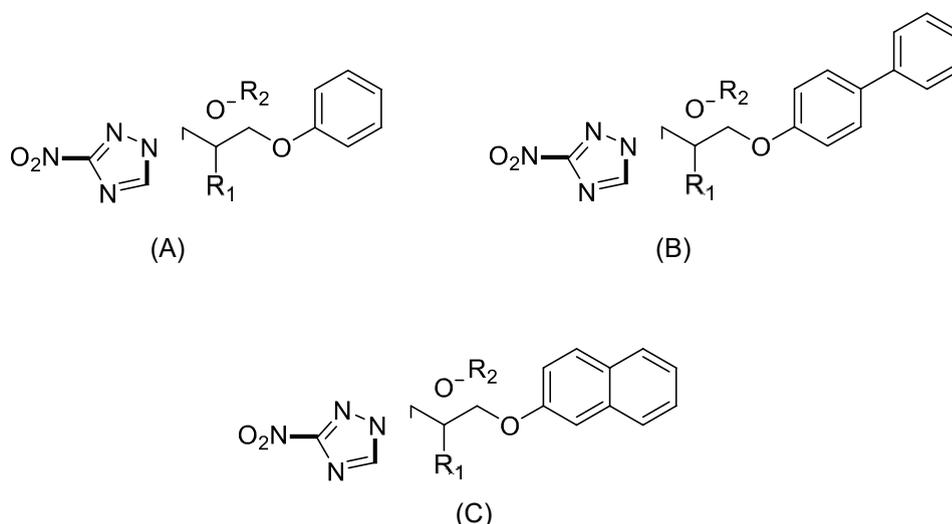


Figura 01. Estrutura química do composto 2 (PRCN 011/17) (A), do composto 4 (PRCN 015/17) (B) e do composto 6 (PRCN019/17) (C) (FRANÇA, 2018).

De acordo com o que foi visto na tabela 04.

O composto 2 (PRCN011/17) com uma fenoxila (Figura 01-A), induz mutação

gênica nas cepas TA97, TA98 e TA100 a partir de 10 µg/mL e na cepa TA102 a partir de 100 µg/mL. A citotoxicidade é observada na cepa TA 97 a partir de 10 µg/mL e na cepa TA98 a partir de 1 µg/mL.

O composto 4 (PRCN015/17) com uma fenila ligada na posição PARA da fenoxila (Figura 01-B), induz mutação gênica na cepa TA97 a partir de 10µg/mL e a citotoxicidade é observada na cepa TA98 a partir de 10µg/mL.

O composto 6 (PRCN019/17) com a naftila (Figura 01-C), induz mutação gênica detectada a partir da concentração 10µg/mL nas cepas TA97 e TA98 e não apresentando toxicidade nas condições avaliadas.

**Tabela 04.** Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade dos compostos 2 (PRCN 11/17), 4 (PRCN 15/17) e 6 (PRCN 19/17) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).

PRCN 11/17				
µg/mL		Rev. ± D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	76,00±20,38	100	1,00
0,1		105,0±45,10	89,0	1,39
1		97,0±48,60	71,2	1,29
10		392,0±49,49	72,8	5,18*
100		130,0±66,30	68,9	1,71
0	TA98	22,68±6,12	100,0	1,00
0,1		24,00±4,00	75,4	1,06
1		36,00±12,00	57,8*	1,59
10		140,00±42,32	50,1	6,18*
100		116,00±66,08	36,3*	5,12
0	TA100	78,00±33,06	100	1,00
0,1		94,02±33,06	100,0	1,18
1		102,00±15,9	71,6	1,28
10		202,02±109,08	85,3	2,53
100		133,98±71,58	82,6	1,68
0	TA102	20,82±8,02	100	1
0,1		22,50±10,60	80	1,08
1		20,82±6,30	100	1
10		40,00±13,92	100	1,92
100		43,32±8,77	100	2,08
0	TA104	151,71±26,00	100,0	1,00
0,1		182,00±39,00	100,3	1,20
1		203,71±54,08	100,0	1,34
10		208,00±128,70	100,0	1,37
100		195,00±36,79	100,0	1,29

Legenda: Os controles positivos: 10 µg/placa de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741±37 para TA97 e TA98; 1,25 µg/placa de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829±149 para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421±345 para TA102 e TA104. \* p≤0,05 vs. controle negativo; n=3 em triplicata para IM e n=2 em duplicata para sobreviv.; seguido pelo teste T de Student

PRCN 15/17				
$\mu\text{g/mL}$		Rev. $\pm$ D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	72,00 $\pm$ 24,00	100,0	1,00
0,1		66,00 $\pm$ 25,46	100,0	0,92
1		87,96 $\pm$ 48,50	100,0	1,22
10		144,00 $\pm$ 48,00	100,0	2,00
100		138,00 $\pm$ 59,40	100,0	1,92
0	TA98	183,3 $\pm$ 35,1	100,0	1,00
0,1		178,10 $\pm$ 7,8	70,0	1,00
1		176,8 $\pm$ 3,9	70,0	0,96
10		28,60 $\pm$ 7,8	52,0*	0,16
100		16,90 $\pm$ 5,2	69,0*	0,09
0	TA100	74,66 $\pm$ 28,08	100,0	1,00
0,1		81,34 $\pm$ 24,44	100,0	1,09
1		68,00 $\pm$ 26,23	100,0	0,91
10		140,00 $\pm$ 42,33	100,0	1,88
100		68,00 $\pm$ 44,56	100,0	0,91
0	TA102	183,00 $\pm$ 27,54	100,0	1,00
0,1		148,50 $\pm$ 31,86	100,0	0,81
1		139,50 $\pm$ 31,86	96,0	0,76
10		204,03 $\pm$ 37,44	100,0	1,11
100		173,97 $\pm$ 28,89	100,0	0,95
0	TA104	189,00 $\pm$ 46,68	100,0	1,00
0,1		187,98 $\pm$ 76,44	100,0	0,99
1		153,00 $\pm$ 21,24	97,2	0,81
10		153,00 $\pm$ 12,72	100,0	0,81
100		165,00 $\pm$ 12,72	100,0	0,87

Legenda: Os controles positivos: 10  $\mu\text{g/placa}$  de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741 $\pm$ 37 para TA97 e TA98; 1,25  $\mu\text{g/placa}$  de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829 $\pm$ 149 para TA100 e 0,5  $\mu\text{g/placa}$  de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421 $\pm$ 345 para TA102 e TA104. \*  $p \leq 0,05$  vs. controle negativo; n=3 em triplicata para IM e n=2 em duplicata para sobreviv.; seguido pelo teste T de Student

PRCN 19/17				
µg/mL		Rev. ± D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	82,60±39,02	100	1,00
0,1		120,40±54,65	100	1,46
1		132,30±26,72	100	1,60
10		245,00±285,30	100	2,97
100		63,00±35,64	100	0,76
0	TA98	18,30±4,52	100	1,00
0,1		32,66±21,59	100	1,79
1		32,66±20,12	100	1,79
10		39,20±33,26	86,4	2,14
100		35,28±14,14	100,0	1,93
0	TA100	127,50±38,95	100,0	1,00
0,1		178,50±34,00	76,6	1,40
1		133,17±35,39	97,9	1,04
10		240,83±203,70	100,0	1,89
100		189,83±63,80	76,6	1,49
0	TA102	157,50±103,94	100,0	1,00
0,1		110,25±51,97	100,0	0,70
1		78,75±7,42	100,0	0,50
10		105,00±73,50	82,0	0,67
100		171,50±188,22	83,0	1,09
0	TA104	198,00±27,18	100,0	1,00
0,1		167,40±23,54	100,0	0,85
1		223,20±26,64	100,0	1,13
10		187,20±32,55	81,6	0,95
100		137,70±80,19	82,9	0,70

Legenda: Os controles positivos: 10 µg/placa de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741±37 para TA97 e TA98; 1,25 µg/placa de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829±149 para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421±345 para TA102 e TA104. \*  $p \leq 0,05$  vs. controle negativo; n=3 em triplicata para IM e n=2 em duplicata para sobrev.; seguido pelo teste T de Student

Assim para o grupo de compostos analisados (grupo 1) podem ser resumidos de acordo com a Tabela 10.

**Tabela 10.** Concentração limite dos compostos 2, 4 e 6

Conc. limite das amostras		
Amostra		Concentração em µg/mL
<b>Composto 2</b>	PRCN011/17	1
<b>Composto 4</b>	PRCN015/17	1
<b>Composto 6</b>	PRCN019/17	1

#### 4.2.2. Grupo de resultados 2

Esses compostos 12, 13 e 9, apresentam diferença na posição do substituinte cloro presente na fenoxila e ausência ou presença de metila em sua estrutura.

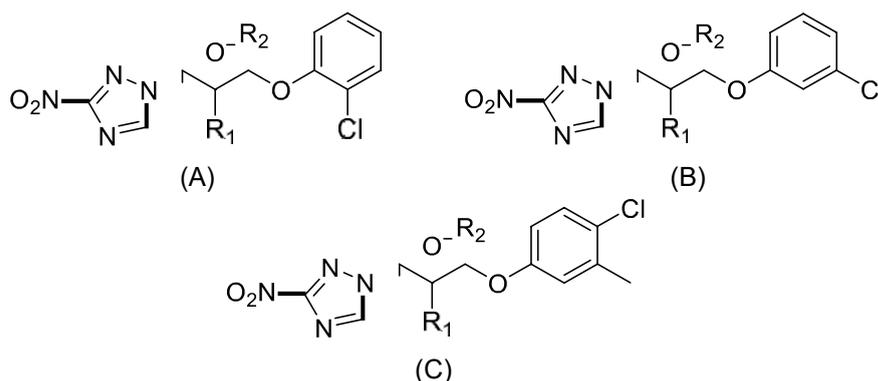


Figura 02. Estrutura química do composto 12 (PRCN062/19) (A), do composto 13 (PRCN063/19) (B) e do composto 9 (PRCN033/18) (C) (FRANÇA, 2018).

Conforme observado na tabela 05.

O composto 12 (PRCN062/19) com cloro na posição ORTO (Figura 02-A), induz mutação gênica na cepa TA97 partir de 1 µg/mL e TA100 partir de 10 µg/mL. A citotoxicidade é observada na cepa TA102 a partir de da concentração 1 µg/mL e na TA104 a partir de 0,1 µg/mL.

O composto 13 (PRCN063/19) com cloro na posição META (Figura 02-B), induz mutação gênica na cepa TA97 a partir de 10µg/mL e citotoxicidade nas cepas TA98 a partir de 100µg/mL e TA100 a partir de 10 µg/mL.

O composto 9 (PRCN033/18) com cloro na posição PARA e metila na posição META (Figura 02-C), induz mutação gênica na cepa TA97 a partir de 1 µg/mL e citotoxicidade na cepa TA98 a partir de 100 µg/mL e TA104 a partir de 10 µg/mL.

**Tabela 05.** Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade do composto 12 (PRCN062/19), 13 (PRCN063/19) e 9 (PRCN033/18) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).

PRCN 62/19				
µg/mL		Rev. ± D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	109,20±11,11	100,0	1,00
0,1		161,70±145,52	100,0	1,48
1		382,20±61,87	100,0	3,50*
10		357,00±368,26	100,0	3,27
100		161,00±59,74	100,0	1,47
0	TA98	22,75±0,92	100	1,00
0,1		23,40±13,70	100,0	1,03
1		21,67±12,62	100,0	0,95
10		19,50±13,19	100,0	0,86
100		13,87±6,41	100,0	0,61
0	TA100	71,67±21,22	100,0	1,00
0,1		65,33±13,61	100,0	0,91
1		110,00±40,63	100,0	1,53
10		166,00±77,95	100,0	2,32
100		156,00±32,19	100,0	2,18*
0	TA102	200,67±9,02	100	1,00
0,1		186,00±31,11	71,7	0,93
1		163,33±67,89	39,5	0,81
10		163,33±39,00	24,0	0,81
100		221,33±89,47	36,4	1,10
0	TA104	246,00±63,52	100	1,00
0,1		222,00±5,66	61,7	0,90
1		282,00±14,14	54,0*	1,15
10		206,00±44,14	60,6	0,84
100		150,66±9,24	48,2	0,61

Legenda: Os controles positivos: 10 µg/placa de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741±37 para TA97 e TA98; 1,25 µg/placa de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829±149 para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421±345 para TA102 e TA104. \* p≤0,05 vs. controle negativo; n=3 em triplicata para IM e n=2 em duplicata para sobreviv.; seguido pelo teste T de Student.

PRCN 63/19				
µg/mL		Rev. ± D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	99,40±42,90	100,0	1,00
0,1		89,66±14,75	98,1	0,90
1		184,80±70,15	97,9	1,86
10		267,44±119,48	97,9	2,69
100		228,26±129,60	94,1	2,30
0	TA98	21,20±7,24	100,0	1,00
0,1		29,40±2,54	100,0	1,39
1		25,60±16,38	100,0	1,21
10		31,20±15,70	96,5	1,47
100		13,20±6,79	37,2	0,62
0	TA100	149,10±45,48	100,0	1,00
0,1		158,23±60,33	90,6	1,06
1		165,27±110,25	99,5	1,11
10		69,30±36,43	59,6	0,46
100		80,85±25,24	65,3	0,54
0	TA102	182,00±34,12	100,0	1,00
0,1		227,07±44,23	100,2	1,25
1		209,73±78,75	82,5	1,15
10		201,07±34,62	80,4	1,10
100		291,20±80,89	89,9	1,60
0	TA104	226,80±18,48	100,0	1,00
0,1		183,96±8,32	100,0	0,81
1		214,00±109,91	100,0	0,94
10		172,20±27,33	100,0	0,76
100		216,22±92,34	100,0	0,95

Legenda: Os controles positivos: 10 µg/placa de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741±37 para TA97 e TA98; 1,25 µg/placa de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829±149 para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421±345 para TA102 e TA104. \*  $p \leq 0,05$  vs. controle negativo; n=3 em triplicata para IM e n=2 em duplicata para sobrev.; seguido pelo teste T de Student.

Assim para o grupo de compostos com diferença na posição do cloro, presente na fenoxila e ausência ou presença de metila (grupo 2), as concentrações preditivas para a mutagenicidade e citotoxicidade podem ser resumidos de acordo com a Tabela 11.

**Tabela 11.** Concentração limite dos compostos 9, 12, 13

Conc. limite das amostras		
Amostra	Concentração em µg/mL	
<b>Composto 12</b>	PRCN062/19	0,1
<b>Composto 13</b>	PRCN063/19	1
<b>Composto 9</b>	PRCN033/18	0,1

### 4.2.3. Grupo de resultados 3

Esses compostos 11 e 10 apresentam diferença na posição do grupo metoxilana fenoxila em sua estrutura.

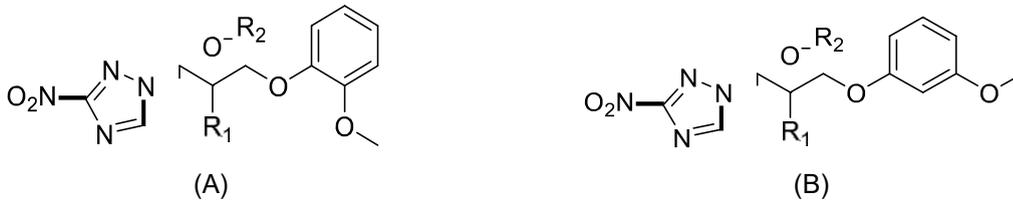


Figura 03. Estrutura química do composto 11 (PRCN061/19) (A) e do composto 10 (PRCN060/19) (B) (FRANÇA, 2018).

De acordo com o observado na tabela 06.

O composto 11 (PRCN061/19) com metoxila na posição ORTO (Figura 03-A), induz mutação gênica na cepa TA98 a partir de 1 µg/mL e na cepa TA97 a partir de 10 µg/mL. Nenhuma das cepas avaliadas apresentaram citotoxicidade nas condições testadas.

O composto 10 (PRCN060/19) com metoxila na posição META (Figura 03-B), induz mutação gênica na cepa TA100 a partir de 10 µg/mL e citotoxicidade na cepa TA100 a partir de 0,1 µg/mL e na cepa TA104 a partir de 1 µg/mL.

**Tabela 06.** Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade do composto 11 (PRCN061/19) e 10 (PRCN060/19) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).

PRCN 61/19				
µg/mL		Rev. ± D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	79,80±17,82	100,0	1,00
0,1		155,40±100,97	82,5	1,95
1		84,00±71,28	100,0	1,05
10		457,80±172,25	95,0	5,74
100		264,60±17,82	100,0	3,32*
0	TA98	20,00 ±4,00	100,0	1,00
0,1		66,00±8,48	89,9	1,30
1		50,68±43,04	82,4	2,53
10		73,32±23,08	76,9	3,67
100		70,68±15,16	74,2	3,53*
0	TA100	92,66 ±56,08	100,0	1,00
0,1		75,00±18,38	88,4	0,81
1		92,00±45,82	81,8	0,99
10		48,00±16,98	86,2	0,52
100		42,66±11,57	91,7	0,46
0	TA102	93,00±3,00	100,0	1,00
0,1		105,00±9,00	100,0	1,11
1		102,00±9,00	100,0	1,09
10		60,00±6,00	100,0	0,64
100		48,00±3,00	100,0	0,51
0	TA104	210,82±145,87	100,0	1,00
0,1		163,32±80,20	100,0	0,77
1		165,00±143,62	100,0	0,78
10		174,53±127,37	100,0	0,94
100		59,17±5,77	100,0	0,28

Legenda: Os controles positivos: 10 µg/placa de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741±37 para TA97 e TA98; 1,25 µg/placa de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829±149 para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421±345 para TA102 e TA104. \* p≤0,05 vs. controle negativo; n=3 em triplicata para IM e n=2 em duplicata para sobreviv.; seguido pelo teste T de Student.

PRCN 60/19				
$\mu\text{g/mL}$		Rev. $\pm$ D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	92,00 $\pm$ 30,79	100,0	1,00
0,1		100,67 $\pm$ 11,02	97,2	1,09
1		131,33 $\pm$ 28,31	89,7	1,43
10		164,00 $\pm$ 28,28	100,0	1,78
100		158,00 $\pm$ 2,83	100,0	1,72
0	TA98	21,87 $\pm$ 4,62	100,0	1,00
0,1		22,40 $\pm$ 4,23	100,0	1,02
1		18,67 $\pm$ 2,44	100,0	0,85
10		14,93 $\pm$ 2,44	100,0	0,68
100		12,27 $\pm$ 3,33	98,1	0,56
0	TA100	122,40 $\pm$ 68,99	100,0	1,00
0,1		217,60 $\pm$ 104,06	25,8	1,78
1		204,00 $\pm$ 125,03	28,1	1,67
10		249,90 $\pm$ 79,17	21,6	2,04
100		222,70 $\pm$ 41,22	46,9	1,82
0	TA102	110,00 $\pm$ 46,67	100	1,00
0,1		143,73 $\pm$ 68,18	92,8	1,31
1		173,07 $\pm$ 75,45	87,7	1,57
10		211,93 $\pm$ 122,38	74,7	1,93
100		195,80 $\pm$ 54,02	95,2	1,78
0	TA104	219,14 $\pm$ 12,39	100	1
0,1		142,98 $\pm$ 18,00	91,9	0,65
1		123,20 $\pm$ 8,75	60,3	0,56
10		123,20 $\pm$ 19,68	51,4*	0,56
100		109,02 $\pm$ 6,56	43,3*	0,5

Legenda: Os controles positivos: 10  $\mu\text{g/placa}$  de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741 $\pm$ 37 para TA97 e TA98; 1,25  $\mu\text{g/placa}$  de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829 $\pm$ 149 para TA100 e 0,5  $\mu\text{g/placa}$  de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421 $\pm$ 345 para TA102 e TA104. \*  $p \leq 0,05$  vs. controle negativo;  $n=3$  em triplicata para IM e  $n=2$  em duplicata para sobrev.; seguido pelo teste T de Student.

Assim para o grupo de compostos com diferença na posição do grupo metoxila (grupo 3), as concentrações preditivas para a mutagenicidade podem ser resumidos de acordo com a Tabela 12.

**Tabela 12.** Concentração dos compostos 10 e 11

Conc. limite das amostras		
Amostra	Concentração em $\mu\text{g/mL}$	
<b>Composto 11</b>	PRCN061/19	0,1
<b>Composto 10</b>	PRCN060/19	1

#### 4.2.4. Grupo de resultados 4

Esses compostos 1 e 7, apresentam diferença na posição do grupo metila na fenoxila em sua estrutura.

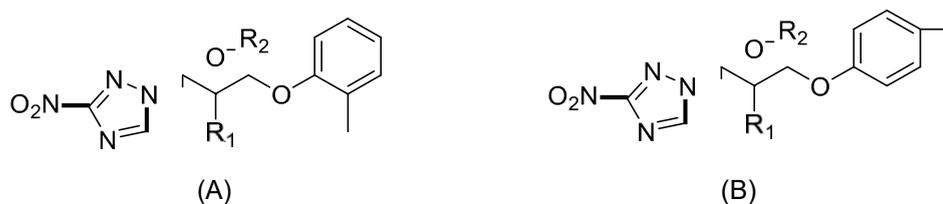


Figura 04. Estrutura química do composto 01 (PRCN01/19) (A) e do composto 07 (PRCN022/19.1) (B) (FRANÇA, 2018).

Conforme pode ser observado na tabela 07.

O composto 01 (PRCN001/19) com metila na posição ORTO (Figura 04-A), induz mutação gênica na cepa TA97 a partir de 1µg/mL, nas cepas TA98 a partir de 0,1µg/mL e citotoxicidade na cepa TA98 a partir de 100µg/mL, nas cepas TA100, TA102 e TA104 a partir de 1µg/mL.

O composto 07 (PRCN022/19.1) com metila na posição PARA (Figura 04-B), não apresentou mutação gênica induzida em nenhuma das cepas avaliadas, no entanto apresentou citotoxicidade nas cepas TA98, TA100, TA102 e TA104 a partir de 0,01µg/mL.

**Tabela 07.** Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade do composto 01 (PRCN01/19) e 07 (PRCN022/19.1) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).

PRCN 01/19				
µg/mL		Rev. ± D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	68,20±28,00	100	1
0,1		79,20±4,40	100	1,16
1		246,40±12,44	72,8	3,61
10		162,80±18,66	100	2,39
100		28,60±21,78	100	0,42
0	TA98	21,02±18,03	100	1
0,1		73,80±137,19	100	3,51
1		36,00±130,43	100	1,71
10		9,00±5,40	100	0,43
100		5,40±3,12	22,8	0,26
0	TA100	82±16,86	100	1
0,1		68±31,58	71,2	0,82
1		61±16,52	65,8*	0,9
10		61,33±21,46	70,4	1,01
100		59,33±3,51	57,7	0,97
0	TA102	102,67±19,22	100	1
0,1		98,27±22,04	79	0,96
1		75,53±5,08	65,7*	0,74
10		106,70±7,78	44,1*	1,04
100		76,27±13,26	48,4	0,74
0	TA104	204,75±52,34	100	1
0,1		125,48±41,42	79,1	0,61
1		97,50±37,17	55,5*	0,48
10		86,60±19,33	48,1	0,42
100		141,86±16,12	43,1	0,69

Legenda: Os controles positivos: 10 µg/placa de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741±37 para TA97 e TA98; 1,25 µg/placa de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829±149 para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421±345 para TA102 e TA104. \* p≤0,05 vs. controle negativo; n=3 em triplicata para IM e n=2 em duplicata para sobreviv.; seguido pelo teste T de Student.

PRCN 22/19.1				
$\mu\text{g/mL}$		Rev. $\pm$ D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	94,5 $\pm$ 11,27	100,0	1
0,1		87,50 $\pm$ 7,41	100,0	0,93
1		85,63 $\pm$ 8,35	100,0	0,91
10		80,97 $\pm$ 8,55	81,9	0,86
100		80,03 $\pm$ 7,01	98,8	0,85
0	TA98	20,33 $\pm$ 2,08	100,0	1
0,1		18 $\pm$ 7	46,4	0,89
1		11,33 $\pm$ 0,6	34,1	0,56
10		10,33 $\pm$ 1,53	60,1	0,51
100		7,67 $\pm$ 0,6	37,1	0,38
0	TA100	109,20 $\pm$ 40,99	100,0	1,00
0,1		117,60 $\pm$ 11,11	54,1	1,08
1		51,10 $\pm$ 11,94	60,0	0,47
10		154,70 $\pm$ 57,60	22,4	1,42
100		86,80 $\pm$ 26,59	31,4	0,79
0	TA102	101,20 $\pm$ 3,11	100,0	1
0,1		104,87 $\pm$ 10,85	68,3	1,04
1		88,00 $\pm$ 8,8	62,0	0,87
10		91,30 $\pm$ 1,56	65,6	0,9
100		75,90 $\pm$ 1,56	41,9	0,75
0	TA104	196,94 $\pm$ 105,67	100,0	1,00
0,1		198,33 $\pm$ 107,07	48,2*	1,00
1		213,62 $\pm$ 85,12	18,9*	1,08
10		219,64 $\pm$ 89,78	68,4	1,42
100		237,06 $\pm$ 65,68	48,2	1,20

Legenda: Os controles positivos: 10  $\mu\text{g/placa}$  de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741  $\pm$  37 para TA97 e TA98; 1,25  $\mu\text{g/placa}$  de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829  $\pm$  149 para TA100 e 0,5  $\mu\text{g/placa}$  de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421  $\pm$  345 para TA102 e TA104. \*  $p \leq 0,05$  vs. controle negativo;  $n=3$  em triplicata para IM e  $n=2$  em duplicata para sobreviv.; seguido pelo teste T de Student.

Assim para o grupo de compostos com diferença na posição do grupo metila (grupo 4), as concentrações preditivas para indução de mutagenicidade podem ser resumidas de acordo com a Tabela 13.

**Tabela 13.** Concentração dos compostos 1 e 7

Conc. limite das amostras		
Amostra	Concentração em $\mu\text{g/mL}$	
<b>Composto 7</b>	PRCN022/19.1	----
<b>Composto 1</b>	PRCN001/19	< 0,1

#### 4.2.5. Grupo de resultados 5

Esses compostos 5 e 3, apresentam diferença na posição dos grupos isopropila e metila na fenoxila em sua estrutura.

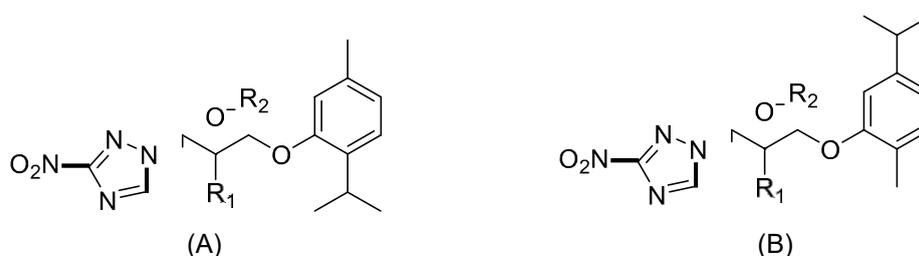


Figura 05. Estrutura química do composto 05 (PRCN015/19) (A) e do composto 03 (PRCN014/19) (B) (FRANÇA, 2018).

Conforme observado na tabela 08.

O composto 05 (PRCN015/19) com isopropil na posição ORTO e metila na posição META (Figura 05-A), não induziu mutação gênica em nenhuma das cepas nas condições testadas, mas apresentou citotoxicidade para a cepa TA97 a partir de 10µg/mL e nas cepas TA98, TA100, TA102 e TA104 a partir de 1µg/mL.

O composto 03 (PRCN014/19) com isopropila na posição META e metila na posição ORTO (Figura 05-B), não induziu mutação gênica em nenhuma das cepas nas condições testadas e apresentou citotoxicidade na cepa TA98 a partir de 0,1µg/mL.

**Tabela 08.** Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade do composto 05 (PRCN015/19) e 03 (PRCN014/19) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).

PRCN 15/19				
µg/mL		Rev. ± D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	179,33±37,22	100	1,00
0,1		132±13,11	80,6	0,74
1		92,66±21,20	71,3	0,52
10		64,66±8,08	68,2	0,36
100		36±31,75	58,1	0,2
0	TA98	23,42 ±4,79	100	1,00
0,1		22,80±6,57	71,4	0,97
1		8,23±1,08	54,9	0,35
10		7,60±3,29	45,1	0,32
100		5,70±5,02	24,2	0,24
0	TA100	106,64 ±11,56	100	1,00
0,1		118,64±23,08	71,5	1,11
1		114,64±30,28	39,3	1,08
10		84,00±4,00	37,6	0,79
100		69,32±12,20	16,3	0,65
0	TA102	244,67±8,08	100	1,00
0,1		179,00±36	73,1	0,73
1		126,00±10,82	65,7	0,51
10		122,33±14,74	56,8	0,5
100		100,33±14,57	51,2	0,41
0	TA104	218±26,66	100	1,00
0,1		186,33±25,38	76,4	0,85
1		192,66±32,25	48,6	0,88
10		175,66±30,30	36,1	0,81
100		174,66±17,01	54,2*	0,8

Legenda: Os controles positivos: 10 µg/placa de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741±37 para TA97 e TA98; 1,25 µg/placa de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829±149 para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421±345 para TA102 e TA104. \* p≤0,05 vs. controle negativo; n=3 em triplicata para IM e n=2 em duplicata para sobreviv.; seguido pelo teste T de Student.

PRCN 14/19				
$\mu\text{g/mL}$		Rev. $\pm$ D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	94,17 $\pm$ 10,51	100	1,00
0,1		71,96 $\pm$ 0,56	99,6	0,76
1		67,11 $\pm$ 5,10	95,3	0,71
10		64,49 $\pm$ 1,54	91,7	0,68
100		37,80 $\pm$ 7,58	75,5	0,4
0	TA98	21,80 $\pm$ 10,95	100	1,00
0,1		20,20 $\pm$ 5,92	59,7	0,93
1		15,72 $\pm$ 0,48	58,9	0,72
10		15,20 $\pm$ 0,84	58,4	0,7
100		14,32 $\pm$ 0,79	55,3	0,66
0	TA100	130,20 $\pm$ 23,21	100	1,000
0,1		99,17 $\pm$ 9,53	71,14	0,76
1		98,47 $\pm$ 9,32	84,08	0,76
10		92,63 $\pm$ 2,14	72,64	0,71
100		73,97 $\pm$ 7,74	92,04	0,57
0	TA102	158,60 $\pm$ 42,26	100	1,0000
0,1		151,67 $\pm$ 20,81	97,9	0,92
1		150,36 $\pm$ 2,71	94,1	0,99
10		136,07 $\pm$ 12,29	90,4	0,86
100		135,20 $\pm$ 2,25	70,2	0,85
0	TA104	189,00 $\pm$ 2,55	100	1,00
0,1		143,10 $\pm$ 16,54	107,8	0,76
1		139,20 $\pm$ 7,27	111,8	0,74
10		118,08 $\pm$ 67,51	88,8	0,78
100		143,40 $\pm$ 20,47	98,6	0,76

Legenda: Os controles positivos: 10  $\mu\text{g/placa}$  de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de revertentes: 741 $\pm$ 37 para TA97 e TA98; 1,25  $\mu\text{g/placa}$  de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829 $\pm$ 149 para TA100 e 0,5  $\mu\text{g/placa}$  de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421 $\pm$ 345 para TA102 e TA104. \*  $p \leq 0,05$  vs. controle negativo;  $n=3$  em triplicata para IM e  $n=2$  em duplicata para sobreviv.; seguido pelo teste T de Student.

Assim para o grupo de compostos com diferença na posição dos grupos isopropil e metila (grupo 5), as concentrações preditivas para indução de mutagenicidade podem ser resumidas de acordo com a Tabela 14.

**Tabela 14.** Concentração dos compostos 3 e 5

Conc. limite das amostras		
Composto	Amostra	Concentração em $\mu\text{g/mL}$
Composto 5	PRCN015/19	----
Composto 3	PRCN014/19	----

#### 4.2.6. Grupo de resultados 6

O composto 8 (PRCN028/17) apresenta metanotiol na posição PARA e metila na posição META (Figura 06).

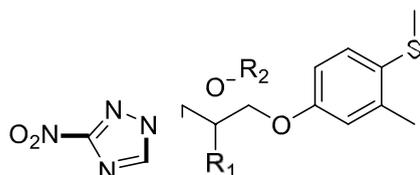


Figura 06. Estrutura química do composto 08 (PRCN028/17) (FRANÇA, 2018).

Não foram observadas mutação gênica induzidas de acordo com as condições avaliadas para o composto 8. No entanto, foi verificada citotoxicidade na cepa TA98 a partir de 100µg/mL e nas cepas TA100, TA102 e TA104 a partir de 10µg/mL, tabela 9.

**Tabela 09.** Resultados de citotoxicidade e mutagenicidade do composto 08 (PRCN028/17) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e controle negativo (NaCl 0,9%).

PRCN 28/17				
µg/mL		Rev. ± D.P.	Sobrev.	I.M.
0	TA97	79,34 ±14,04	100	1,00
0,1		72,00±8,00	95,4	0,91
1		56,66±5,04	85,6	0,71
10		36,66±20,04	82,4	0,46
100		54,66±19,22	78,5	0,44
0	TA98	49,33±5,51	100	1,00
0,1		28,67±2,08	84,2	0,58
1		27,00±3	82,7	0,55
10		24,33±1,53	77,6	0,49
100		17,33±1,15	68,9	0,35
0	TA100	82,67±16,86	100	1,00
0,1		78,33±0,58	98	0,95
1		89±4,00	84,7	1,08
10		105±30,32	66,3	1,27
100		62,67±33,65	61,2	0,76
0	TA102	195,67±48,58	100	1
0,1		195±35,34	94,2	1
1		149,33±41,74	81,2	0,76
10		171,33±66,86	68,8	0,88
100		80±25,24	59,7*	0,41
0	TA104	203,35±25,15	100	1
0,1		70±5,00	90,1	0,34
1		70,00±13,25	71,3	0,34
10		55,00±5,00	55,4*	0,27
100		50,00±5,00	41,6*	0,25

Legenda: Os controles positivos: 10 µg/placa de 4-nitro-O-phenilenodiamina (4NPD), número de

revertentes: 741±37 para TA97 e TA98; 1,25 µg/placa de azida sódica (AZS), número de revertentes: 829±149 para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C (MMC), número de revertentes: 1421±345 para TA102 e TA104. \*  $p \leq 0,05$  vs. controle negativo; n=3 em triplicata para IM e n=2 em duplicata para sobrev.; seguido pelo teste T de Student.

Assim para o grupo de composto com grupos metanotiol e metila (grupo 6), a concentração preditiva para indução de mutagenicidade pode ser resumida de acordo com a Tabela 15.

**Tabela 15.** Concentração do composto 8

<b>Conc. limite das amostras</b>		
<b>Amostra</b>		<b>Concentração em µg/mL</b>
<b>Composto 8</b>	PRCN028/17	----

Na tabela 16, observamos os resultados preditivos para mutagenicidade em µM após os testes de citotoxicidade e reversão bacteriana. Tendo as melhores concentrações limites de segurança considerando a mutagenicidade e citotoxicidade os compostos 4 (PRCN015/17), 6 (PRCN019/17), 13 (PRCN063/19) e 8 (PRCN028/17).

**Tabela 16.** Resultado final de citotoxicidade e mutagenicidade das amostras.

<b>Dose/Concentração final dos compostos</b>		
<b>Amostra</b>		<b>Concentração em µM</b>
<b>Composto 2</b>	PRCN011/17	0,266
<b>Composto 4</b>	<b>PRCN015/17</b>	<b>2,212</b>
<b>Composto 6</b>	<b>PRCN019/17</b>	<b>2,347</b>
<b>Composto 9</b>	PRCN033/18	0,236
<b>Composto 12</b>	PRCN062/19	<0,244
<b>Composto 13</b>	<b>PRCN063/19</b>	<b>2,439</b>
<b>Composto 1</b>	PRCN001/19	<0,256
<b>Composto 7</b>	PRCN022/19.1	<0,256
<b>Composto 10</b>	PRCN060/19	<0,246
<b>Composto 11</b>	PRCN061/19	0,246
<b>Composto 3</b>	PRCN014/19	<0,231
<b>Composto 5</b>	PRCN015/19	0,231
<b>Composto 8</b>	<b>PRCN028/17</b>	<b>2,293</b>

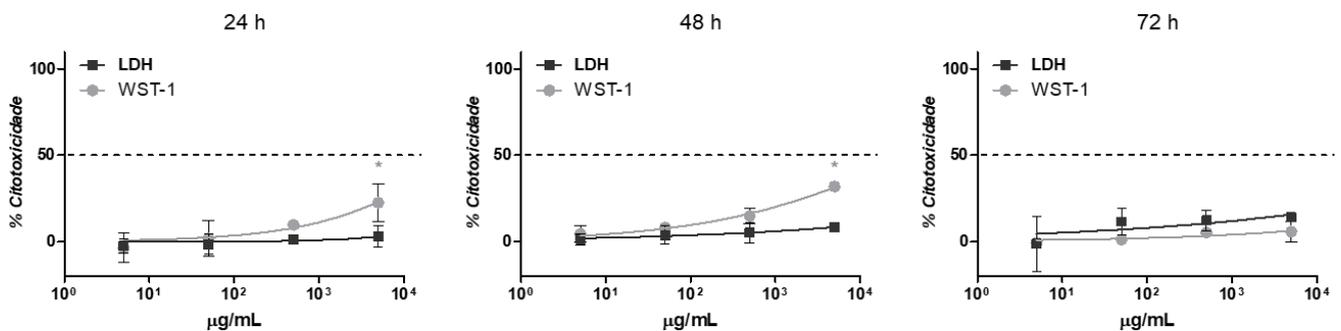
### 4.3 Determinação do potencial citotóxico em cultura de células HepG2

Em paralelo aos ensaios de mutagenicidade, foi realizado o ensaio colorimétrico de viabilidade celular com sal tetrazólio, WST-1 e LDH, para investigar se as concentrações testadas nos demais ensaios são capazes de induzir morte celular. Os resultados deste ensaio utilizando a linhagem HepG2, após exposição aos compostos após 24, 48 e 72 horas, estão apresentados nos gráficos abaixo.

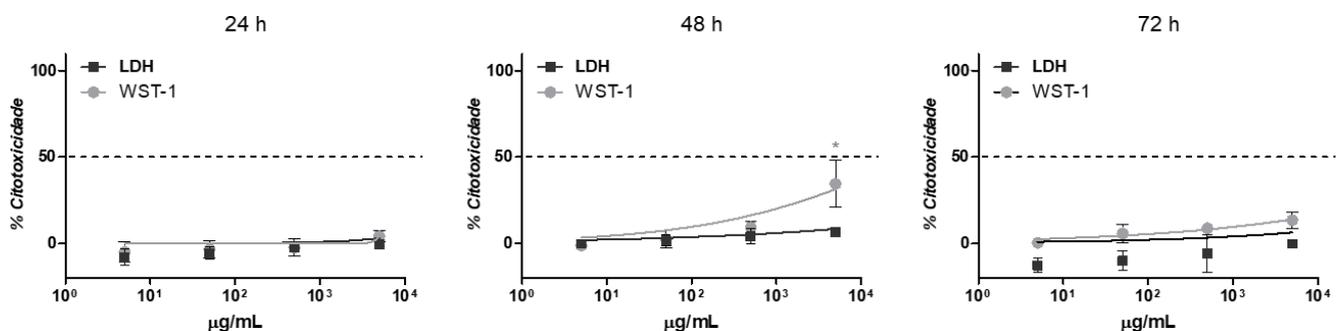
Para os ensaios foram testados os compostos PRCN 015/17, PRCN 019/17, PRCN028/17, PRCN001/19 e PRCN063/19 que se apresentaram ativos contra o *T. cruzi*.

**Gráfico 01** – Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 e LDH em diferentes concentrações dos compostos 4 e 6 após 24, 48 e 72 h de incubação.

#### PRCN 015/17 – Composto 4



#### PRCN 019/17 – Composto 6

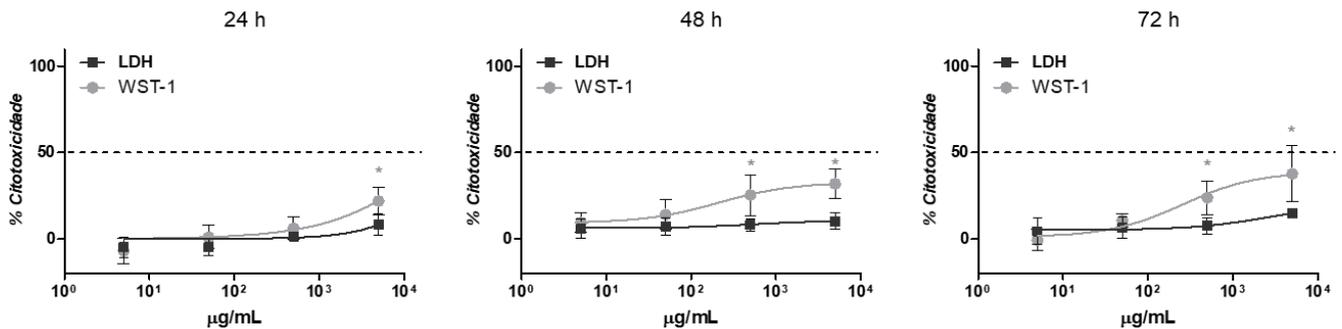


Legenda: A viabilidade celular relativa ao controle negativo está representada na forma de porcentagem. Controle negativo: dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%. LC50 (*lethal concentration*): concentração letal média para 50 % das células tratadas.

A partir do Gráfico 01, é possível observar que o composto 4 (PRCN 015/17), induziu morte celular dose-dependente e exibiu efeito citotóxico a partir 5 µg/mL no tratamento de 48 e 72 horas, respectivamente. Enquanto o composto 6, induziu morte celular dose-dependente e exibiu efeito citotóxico a partir 10 µg/mL no tratamento de 48 horas. LDH do composto 04 (PRCN 015/17) tem tendência de morte mais significativa em 72 horas, mas os valores não passaram de 10% de toxicidade.

**Gráfico 02** – Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 e LDH em diferentes concentrações do composto 13 após 24, 48 e 72 h de incubação.

### PRCN063/19 – Composto 13

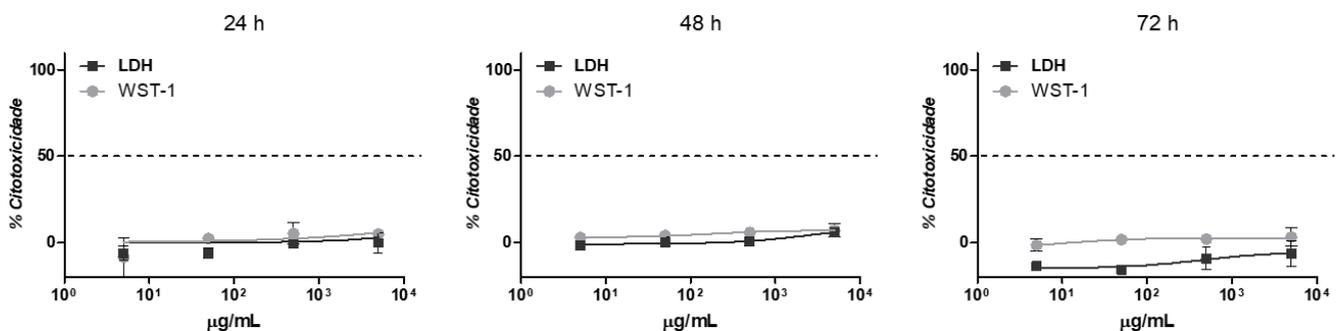


Legenda: A viabilidade celular relativa ao controle negativo está representada na forma de porcentagem. Controle negativo: dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%. LC50 (*lethal concentration*): concentração letal média para 50 % das células tratadas.

A partir deste Gráfico 02, é possível observar que o composto 13 (PRCN 063/19), induziu morte celular dose-dependente e exibiu efeito citotóxico a partir 50 µg/mL no tratamento de 24 e 72 horas e a partir 5 µg/mL no tratamento de 48 horas, respectivamente. Para LDH o composto teve tendência de morte mais significativa em 24 e 72 horas, mas os valores não passaram de 10% de toxicidade.

**Gráfico 03** – Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 e LDH em diferentes concentrações do composto 01 após 24, 48 e 72 h de incubação.

### PRCN 01/19 – Composto 01

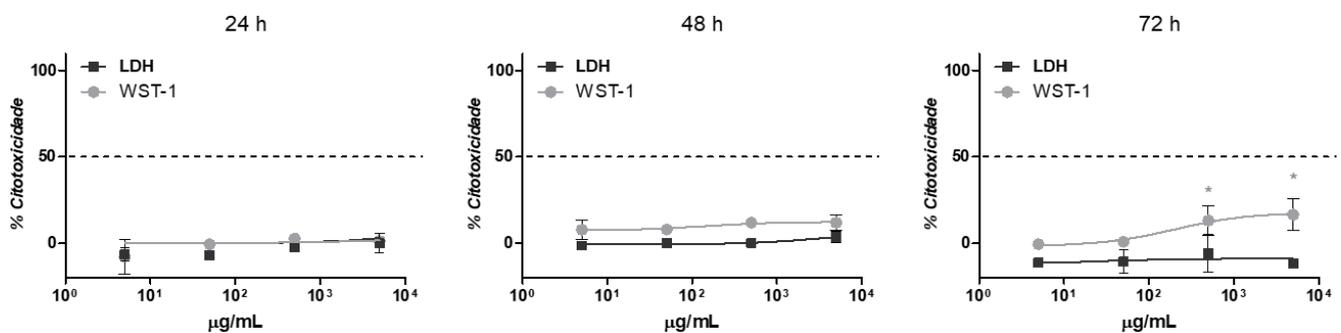


Legenda: A viabilidade celular relativa ao controle negativo está representada na forma de porcentagem. Controle negativo: dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%. LC50 (*lethal concentration*): concentração letal média para 50 % das células tratadas.

No Gráfico 3, é possível observar que o composto 01 (PRCN 01/19) não teve tendência de morte significativa em nenhuma concentração em 24, 48 e 72 horas e alguma toxicidade em 48 horas a partir de 5 µg/mL de concentração.

**Gráfico 04** – Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 e LDH em diferentes concentrações do composto 8 após 24, 48 e 72 h de incubação.

#### PRCN 028/17 – Composto 8



Neste Gráfico 04, é observado que o composto 8 (PRCN 028/17), induziu morte celular dose-dependente e exibiu efeito citotóxico a partir 5 µg/mL no tratamento de 48 horas e a partir 50 µg/mL no tratamento de 72 horas e para LDH não teve tendência de morte significativa em 24, 48 e 72 horas.

## 5 DISCUSSÃO

Na análise qualitativa observamos que todas as amostras apresentaram citotoxicidade (umas mais intensas do que outras) e algumas amostras não apresentaram mutagenicidade na concentração máxima de 1mg/mL, provavelmente, o efeito citotóxico pode ter provocado a morte celular levando a um resultado falso negativo para a mutagenicidade.

Os testes qualitativos servem para definir quais as concentrações devemos iniciar o teste quantitativo, e n t ã o diluímos as amostras em 10 vezes e dessa forma, iniciamos com a concentração máxima de 100µg/mL para os testes quantitativo de Ames e sobrevivência.

Já na análise quantitativa, para os testes gerais de mutagenicidade são recomendados principalmente cepas TA97, TA98, TA100 e TA102. As cepas TA97 e TA98 têm a capacidade de detecção de agentes mutagênicos que induzem mutação

que altera o quadro de leitura (*Frameshit*), esses agentes geralmente atuam em unidades repetitivas do DNA fazendo com que haja restauração do quadro de leitura envolvida na biossíntese de histidina. Na cepa TA97, a reversão para o genótipo *his+* ocorre pela adição de pares de base G:C; para TA98 a mutação *hisD3052*, leva a reversão por deleção de pares de base G:C. A mutação *hisG46* em TA100 detectam mutágenos que causam substituições de pares de bases, principalmente em um desses pares G-C. TA102 contém a mutação no gene *hisG*. esta cepa detecta substituições de pares de base A:T (MARON & Ames, 1983). A cepa TA 104 é semelhante a cepa TA 102 o local de mutação *hisG428* detecta substituições de pares de base A:T e a mutação está inserida no cromossomo bacteriano (GALVÃO, 2019).

Apesar de não ser mais referência desde 2020 (OECD, 2020), foi utilizada a cepa TA104, pois houve um interesse em avaliar o dano oxidativo visto que os compostos nitro provocam esse dano por estresse oxidativo quebrando o DNA por mutação OCRE que é uma mutação que afeta o stop códon UAA terminando o processo de leitura.

As cepas 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 nas cepas.

As cepas TA100 e TA98 são deficientes em nitroredutase, sendo utilizadas para a detecção de nitrocarcinógenos. Essas cepas deficientes em nitroredutase servem para demonstrar a ativação mutagênica de alguns agentes terapêuticos contendo nitro e mostram que nitroredutases hepáticas de mamíferos também podem ativar esta classe de carcinógenos (MARON & AMES, 1983).

Para avaliação dos testes quantitativo de Ames e sobrevivência, levamos em consideração os parâmetros mutagenicidade quando Índice Mutagênico (IM) for maior ou igual a 2 e sobrevivência quando Sobrev. for menor ou igual a 70% (AIUB, 2011).

Proliferação celular e ensaios de viabilidade são de particular importância para aplicações de rotina e em nosso estudo utilizamos células HepG2. Sais de tetrazólio, como WST-1, são especialmente úteis para ensaiar a quantificação de células viáveis, porque elas são clivadas para formar um corante formazan (coloração amarelo/laranja - que é quantificado em espectrofômetro) apenas por células metabolicamente ativas (ROCHE, 2011).

Outro método utilizado na análise da viabilidade celular é a determinação da atividade da desidrogenase láctica (LDH) liberada das células danificadas ou mortas

no meio. (DECKER e LOHMANN-MATTHES, 1988; KORZENIEWSKI e CALLEWAERT, 1983).

A molécula principal do composto é inédita (Figura 07), contendo o núcleo 3-nitro-1,2,4-triazol. A simplificação da cadeia lateral dos IBEs de última geração, como o posaconazol, foi realizada através da inclusão de fenoxilas comercialmente disponíveis e de baixo custo. Desta forma, os derivados foram planejados para poderem atuar em dois possíveis mecanismos de ação, através da inibição da CYP51 ou sofrendo bioativação pelas enzimas nitroredutases (FRANÇA, 2018).

A inclusão de fenoxilas alteram mutagenicidade e citotoxicidade dos compostos.

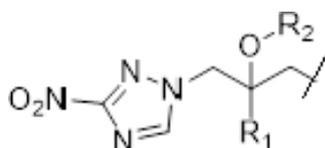


Figura 07. Estrutura básica dos compostos.

Os compostos PRCN 011/17, PRCN 015/17 e PRCN019/17 são positivos na indução de mutação que altera o quadro de leitura (*Frameshit*), por estarem presentes nas cepas TA97 e 98 que são complementares, então houve indução de mutação por deleção dos pares de base G:C. Sem os resultados S9 esses compostos induziram a deleção a partir da concentração de 10µg/mL. Diferente do apresentado no teste de Ames, o composto PRCN 015/17, apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 5µg/mL em 48 e 72 horas e o composto PRCN019/17 citotoxicidade a partir da concentração de 10µg/mL em 48 horas com morte celular na avaliação de viabilidade celular WST-1, porém não apresentou significativa lesão de membrana após ensaio LDH.

Tais características podem estar relacionadas a estrutura do anel, que tem interferência da ressonância na citotoxicidade e na mutagenicidade. No composto PRCN019/17 pode ser observado que os anéis benzênicos estão diretamente ligados um ao outro facilitando a ressonância eletrônica, tornando o composto mais estável aromaticamente.

Os compostos PRCN062/19, PRCN063/19 e PRCN033/18 são positivos na indução de mutação que altera o quadro de leitura (*Frameshit*), por estar presente somente na cepa TA97, então houve indução de mutação por adição ou deleção dos pares de base G:C. O composto PRCN033/18 se mostrou com maior caráter mutagênico (IM 6,55), porém mantendo a sobrevivência. Independente da posição a

presença do halogênio cloro interfere na mutagenicidade.

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados somente para o composto PRCN063/19, visto que apesar de apresentar mutagenicidade foi o único que se mostrou ativo para o tripanossoma. No ensaio WST-1, se mostrou citotóxico em 24 horas a partir de 50µg/mL com comportamento concentração dependente, em 48 horas a partir de 5µg/mL, e menos citotóxico em 72 horas devido ao aumento da toxicidade em 48 horas levando a morte celular com conseqüente queda na metabolização elevando a concentração para apresentar citotoxicidade e não apresentou lesão de membrana significativa após ensaio LDH.

Para os compostos PRCN061/19 e PRCN060/19, somente o composto PRCN061/19 apresentou positividade para indução de mutação que altera o quadro de leitura (*Frameshit*), por estarem presentes nas cepas TA97 e 98 que são complementares ficou caracterizado indução de mutação por deleção dos pares de base G:C, o que não ocorre no composto PRCN060/19 que apresentou mutagenicidade para a cepa TA100, o que indica que houve substituições de pares de bases, principalmente em um desses pares G-C. Para esses compostos não foram realizados ensaios de viabilidade celular, devido não serem ativos para o *T. cruzi*.

A posição da metoxila no anel pode ser determinante desse comportamento no composto PRCN060/19, visto que há efeito estérico que permite a rotação da metoxila, além da posição estereoeletrônica (ressonância), já que a fenoxila favorece que as posições orto, para fiquem negativa e a posição meta positiva e o oxigênio da metoxila está carregado negativamente sendo doador de elétron favorecendo a ligação na posição meta, ficando o composto mais estável nessa posição.

Entre os compostos PRCN01/19 e PRCN022/19.1, o composto PRCN01/19 apresentou positividade para indução de mutação que altera o quadro de leitura (*Frameshit*), por estarem presentes nas cepas TA97 e 98 que são complementares ficou caracterizado indução de mutação por deleção dos pares de base G:C, o que não ocorre no composto PRCN022/19.1 que não apresentou mutagenicidade, porém com alta toxicidade exceto para cepa TA97, a ausência da indução de mutação pode ter sido mascarada pela citotoxicidade levando a uma resposta falso negativa.

Esses compostos, por ação da toxicidade, podem estar promovendo uma quebra na fita de DNA causando um dano irreversível não permitindo, dessa forma, o reparo da fita pela topoisomerase. Esse comportamento pode ser oriundo da grande interferência da influência estérica.

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados somente para o composto PRCN01/19, visto que apesar de apresentar mutagenicidade foi o único que se mostrou ativo para o tripanossoma. No ensaio WST-1, mostrou baixo percentual citotóxico, talvez por ação da topoisomerase e não apresentou lesão de membrana significativa após ensaio LDH.

O composto PRCN015/19 foi mais citotóxico do que o composto PRCN014/19 e ambos não apresentaram indução de mutagenicidade, foi observado que a inclusão de um grupo volumoso (isopropil) na molécula dos compostos diminuiu a mutagenicidade. E o comportamento do composto PRCN015/19 pode ser proveniente da ação estérica e do volume do isopropil em relação a metila, visto que o efeito do volume interfere na rotação e conseqüentemente na interação da molécula com enzimas mutagênicas alterando a mutagenicidade, ou ainda interfere na estabilidade molecular.

Não foram realizados ensaios de viabilidade celular para esses compostos, devido não serem ativos para o *T. cruzi*.

O composto PRCN028/17 não induziu mutagenicidade e embora apresente citotoxicidade foi o mais potente na avaliação contra o *T. cruzi*, provavelmente pela interferência do enxofre que é queratolítico, antisséptico moderado e parasiticida.

No ensaio WST-1, se mostrou citotóxico a partir de 5µg/mL em 48 horas e a partir de 50µg/mL em 72 horas e não apresentou lesão de membrana após ensaio LDH.

## 6 Conclusão

A doença de Chagas ainda é causa de uma grande quantidade de morbimortalidade no Brasil, com isso há a necessidade no aprofundamento no estudo epidemiológico, demográfico e de novos fármacos que possam atender a população.

Diversos fármacos têm sido testados e um grande avanço já foi obtido. Dentre esses fármacos temos o grupo nitrotriazóis. Nesse estudo nos foram cedidos 13 compostos que foram testados quanto a sua mutagenicidade, citotoxicidade e viabilidade celular.

Apesar do teste de Ames utilizar bactérias que apresentam disfunções, ou seja alterações mutagênicas, é um teste com papel fundamental na toxicologia genética por ser fácil de realizar, de baixo custo, poder ser utilizado com pouca quantidade de amostra.

Dos compostos analisados, 8 (PRCN 011/17, PRCN 015/17, PRCN 019/17,

PRCN062/19, PRCN063/19, PRCN033/18, PRCN061/19 e PRCN01/19) apresentaram mutação por indução de mutação que altera o quadro de leitura (*Frameshit*) por adição e/ou deleção dos pares de base G:C, podendo ter como causa a estrutura raiz das moléculas dos compostos.

Os 5 (PRCN 015/17, PRCN 019/17, PRCN063/19, PRCN01/19 e PRCN028/17) compostos que se mostraram ativos contra o *T. cruzi* foram testados em ensaios de viabilidade celular e todos apresentaram efeito citotóxico dose dependente com perda - morte celular, porém nenhum com lesão celular significativa.

O composto mais promissor foi o composto 8 PRCN028/17, provavelmente pelo fato da molécula apresentar o halogênio enxofre que tem característica queratolítica, anti-séptica moderada e parasiticida (ÍNDICE, 2021).

A presença de citotoxicidade e a indução de mutagenicidade podem ser decorrentes dos grupos funcionais, do efeito estérico e/ou de ressonância que levam a alteração da estabilidade, metabolismo, potência dos compostos analisados.

## REFERÊNCIAS

AIUB, C. A. F; FELZENSZWALB, I. **Os Princípios do Teste de Ames (Salmonella/ Microsomo) e sua aplicabilidade**. Revista Genética na Escola – SBG, Ribeirão Preto, v. 6, n. 2, p. 11-16, 2011.

ALMEIDA, B. R.; SANTILIANO, F.C. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, n.14; p. 1586, 2012.

ALVES, D. F. et al. **Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização** - Revista RBAC, Fortaleza, 2018.

CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C. **Drogas Tripanossomicidas**: Estudos pré-clínicos da doença de Chagas. Portal da Doença de Chagas, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/tratamento/>>. Acesso em: 22 jan. 2020.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <[http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio\\_PCDT\\_Doenca\\_de\\_Chagas.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio_PCDT_Doenca_de_Chagas.pdf)>. Acesso em: 22 jan. 2020.

DECKER, T.; LOHMANN-MATHES, M. L. **A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity**, Journal of Immunological Methods, v. 115, p. 61-69. 25 november 1988.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, DF, v.25, n. esp, jun. 2015. Disponível em: <[http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-49742016000500007](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742016000500007)>. Acesso em: 22 jan. 2020.

DIAS, L. C. et al. **Quimioterapia da doença de Chagas**: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 9, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000900038](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900038)>. Acesso em: 22 jan. 2020.

FERREIRA, R. T. B. et al. **Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açai: um desafio para a Vigilância Sanitária**, Vig Sanit Debate, v.2, N.04, p.4-11, 2014.

FRANÇA, R. R. F. **Novos derivados nitrotriazólicos com Agentes anti-Trypanossomacruzi**. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos/FIOCRUZ, 2018.

GALVÃO, B. V. D. **Estudo farmacológico da eficácia e segurança do extrato hidrometanólico da folha de Myrciaria cauliflora sobre o Trypanosoma cruzi**, Rio de Janeiro: Instituto Biomédico – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2019.

GALVÃO, B. V. D.; GOLDSTEIN, A. **Procedimentos Labmut – Introdução a cultura celular**, Rio de Janeiro: Laboratório de Mutagênese Ambiental - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2020.

GARCIA, U. O.; AIUB, C. A. F. **Investigação da citotoxicidade e mutagenicidade de compostos triazólicos**: Terapêutica promissora para doença de Chagas. Rio de Janeiro: Instituto Biomédico – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, p. 51, 2017.

ÍNDICE. **Toda sua saúde**. Tupam Editores SA, 11 de novembro de 2021. Disponível em: <<https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/enxofre/informacao->

