



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RODRIGO HINOJOSA VALDEZ

**“INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
COMPOSTO CARBOLÍNICO SOBRE *TRYPANOSOMA
CRUZI*”**

Londrina
2007

RODRIGO HINOJOSA VALDEZ

**“INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
COMPOSTO CARBOLÍNICO SOBRE *TRYPANOSOMA
CRUZI*”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Londrina
2007

RODRIGO HINOJOSA VALDEZ

**“INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
COMPOSTO CARBOLÍNICO SOBRE *TRYPANOSOMA
CRUZI*”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 19 de outubro de 2007.

Dedico este trabalho as minhas irmãs

Carolina “*in memoriam*”, Virginia e aos meus pais, cujo amor, esforço incondicional e exemplo, criaram as bases morais e emocionais que regem minha vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, por sua valiosa orientação, confiança e acolhida em seu laboratório, no qual tive a oportunidade de desenvolver este trabalho, e pela caminhada que temos pela frente.

À Profa Dra Sueli Fumie Yamada-Ogatta, pelo apoio, incentivo e pertinentes conselhos.

À Profa Dra Lucy Megumi Yamauchi Lioni por sua ajuda com valorosas sugestões sobre o trabalho.

Aos professores Benicio Alves de Abreu Filho, Tânia Ueda-Nakamura e Benedito Prado Dias Filho, pela colaboração e conhecimentos compartilhados.

Aos professores da Pós-graduação, por contribuírem para minha formação profissional e aos colegas do mestrado, pela companhia e amigável convívio durante os créditos.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Maringá, que estiveram sempre dispostos a colaborar: Kelly Ishida, Adriana Oliveira dos Santos, Raíssa B. Pedroso, Nilza L. R. Bittencourt, Karin J. Pelizzaro Rocha, Eliana H. Endo, Patrícia R. Santos, Flaviano J. Marçal, Mariele C. M. N. Puhl, Daniel R. Silva, Jackeline T. Guinoza-Siraichi, Erika R. F. Ramos, Thelma Onozato, Andréa M. Koroishi, Karine Zanoli, Érika Izumi.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

As Agências Financiadoras; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPQ, Financiadora de Estudos e Projetos/ FINEP, Programa de Apoio a núcleos de Excelência/Fundação Araucária - PRONEX.

A todos que se fizeram presentes ao meu lado em toda esta jornada.

OBRIGADO.

“Un pueblo ignorante es un instrumento
ciego de su propia destrucción”

Simon Bolívar, 1819.

VALDEZ, Rodrigo Hinojosa. **Investigação de atividade biológica de composto carbolínico sobre *Trypanosoma Cruzi***. 2007. 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, a qual afeta 18 milhões de pessoas em toda a América Latina. A terapêutica disponível atualmente é limitada e parcialmente eficaz, em função disto torna-se evidente que novos compostos com atividade tripanocida devem ser desenvolvidos. Alguns compostos carbolínicos têm demonstrado atividades biológicas interessantes tais como, anti-tumoral, inseticida e antiparasitário. No presente trabalho foi realizado um estudo com quinze compostos carbolínicos, a fim de avaliar a sua atividade anti-proliferativa sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*. O composto que obteve o melhor resultado, denominado **C4** (*N*-butil-1- (4dimethylamino)fenil-1,2,3,4-tetrahydro - β - carbolínico - 3 - carboxamida), apresentou o valor de IC₅₀ de 14,9 μ M. Dessa forma, avaliou-se a atividade deste composto, **C4**, sobre a viabilidade de formas tripomastigotas e amastigotas, na interação do parasita com células de mamífero, na morfologia e ultraestrutura do parasita através de técnicas de microscopia eletrônica bem como avaliar o potencial citotóxico sobre linhagens de células de mamífero. O **C4** demonstrou possuir atividade antiparasitária sobre as três formas evolutivas do protozoário e uma baixa citotoxicidade. A concentração que lisou 50 % (EC₅₀) das formas tripomastigotas a 4 °C foi de 77 μ M, e a 37 °C de 45 μ M. Já sobre as formas amastigotas o EC₅₀ a 4° C foi 149 μ M e a 37 °C de 33 μ M. Na concentração de 128 μ M o composto diminuiu em 93,5 % o número de parasitas intracelulares. A microscopia eletrônica de transmissão revelou que os parasitas tratados apresentaram um inchaço da mitocôndria, o aparecimento de vacúolos e o cinetoplasto apresentou-se difuso. Estes resultados obtidos encorajam o aprofundamento de estudos *in vitro* e *in vivo* dos compostos carbolínicos, para compreender melhor o seu modo de ação e desenvolver uma formulação farmacêutica para o tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Tripanocida. Microscopia eletrônica. Doença de Chagas. Carbolínico.

VALDEZ, Rodrigo Hinojosa. **Investigação de atividade biológica de composto carbolínico sobre *Trypanosoma Cruzi***. 2007. 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas' disease, which afflicts 18 million people in Latin America. The available treatment is very limited and clearly new compounds with trypanocidal effect must be found. Carboline compounds showed biological activities like, anti-tumoral, insecticidal, and anti-parasitic. In the present study was made a screening with fifteen carbolines compounds evaluating his anti-proliferative activity against epimastigote form of *T. cruzi*. The *N*-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl- 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide (carboline **C4**), showed an IC₅₀ value of 14.9 μ M and was chosen to further analysis. Therefore, **C4** was evaluated on the viability of trypomastigote and amastigote forms, on the interaction of parasites with mammalian cells, carried through techniques of electron microscopy in order to observe the morphology and ultrastructure of the parasite cell, and was also evaluated the citotoxic effects on mammalian cells. The compound **C4** showed good activity against all three forms of *T. cruzi* and small toxicity. The concentration that lised 50 % (EC₅₀) of the trypomastigote forms at 4 °C was 77 μ M, and at 37 °C was 45 μ M. On the amastigote forms the EC₅₀ at 4 °C was 149 μ M and at 37 °C was 33 μ M. The compound at 128 μ M was able to reduce in 93.5 % the number of intracellular parasites. Transmission electron microscopy showed ultrastructural alteration which a swelling of the mitochondrion, the appearance of vacuoles and a diffuse kinetoplast. The present results support the trypanocidal effect of this class of compounds against *T. cruzi* an stimulate further assays *in vitro* and *in vivo* models, with the intention of better understand its mode of action and develop a pharmaceutical formulation for the treatment of Chagas disease.

Keywords: Trypanocidal. Electron microscopy. Chagas disease. Carbolines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PBS	Tampão Salina Fosfato
pH	Potencial de Hidrogênio
IC₅₀	Concentração inibitória de 50%
IC₉₀	Concentração inibitória de 90%
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ml	Mililitro
μ l	Microlitro
μ m	Micrômetro
MS	Mass Spectrometry
μ g	Micrograma mg Miligrama
LIT	Liver Infusion Tryptose
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
M	Molar
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
°C	Graus Celsius
EC₅₀	Concentração efetiva 50%
DMSO	Dimetil Sulfóxido

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
A DOENÇA DE CHAGAS E TRYPANOSOMA CRUZI.....	12
TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	17
COMPOSTOS CARBOLÍNICOS	20
OBJETIVOS	22
OBJETIVO GERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
REFERÊNCIAS	23
ANEXOS	29
ARTIGO	34
CONCLUSÕES	66

INTRODUÇÃO

Diversas doenças tropicais afligem milhões de pessoas ao redor do mundo e muitas delas são ocasionadas por protozoários, como é o caso da doença de Chagas que é causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Este protozoário é um parasita flagelado da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, é considerado heteroxênico, pois possui em insetos triatomíneos seu hospedeiro invertebrado e em mamíferos seu hospedeiro vertebrado.

A doença de Chagas constitui um grave problema de saúde pública no Brasil, pois três milhões de pessoas possuem esta enfermidade. Esta apresenta duas fases distintas, a fase aguda que começa nos primeiros dias após a infecção e a fase crônica, que surge algumas semanas após, quando o parasita coloniza os tecidos e ocorre uma intensa resposta inflamatória. O tratamento desta enfermidade tem resultado apenas na fase aguda e os medicamentos de escolha são o Nifurtimox e o Benzonidazol. Estes são parcialmente eficazes e muito tóxicos. Já na fase crônica o tratamento é apenas sintomático já que esses medicamentos não apresentam um resultado terapêutico significativo.

Diante deste quadro de ineficiência medicamentosa torna-se necessária a busca de alternativas de tratamento, onde substâncias derivadas de produtos naturais e sintéticas mostram-se promissoras para um futuro tratamento de doenças como a doença de Chagas. Considerando estes fatos, a pesquisa envolvendo compostos carbolínicos e sua possível ação específica sobre *T. cruzi* merece atenção, pois resultados positivos nos experimentos pré-clínicos podem ter continuidade em futuros estudos na busca de um fármaco eficiente e seguro.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

Também conhecida como tripanossomíase americana a doença de Chagas foi descrita pela primeira vez pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas em 1909, quando encontrou vestígios de um parasita flagelado na corrente sanguínea de uma criança chamada Berenice, na localidade de Lassance Minas Gerais. Em um fato raro na história da medicina, Chagas conseguiu estabelecer a etiologia e o ciclo parasitário, descrever a doença e seu diagnóstico, identificar reservatórios domésticos e silvestres da nova tripanossomíase, abrangendo assim todos os aspectos básicos de sua epidemiologia e patologia.

Atualmente, quase um século após a descoberta, estima-se que na América latina cerca de 18 milhões de pessoas são acometidas por esta enfermidade (WHO, 2002), e no Brasil em torno de 3,5 milhões de pessoas (DIAS, 2002). No estado do Paraná estima-se que 166.000 pessoas estejam infectadas (SILVEIRA; RESENDE, 1994), e a prevalência da doença de Chagas é em torno de 4 % da população rural (CAMARGO *et al.*, 1984).

A doença de Chagas tem uma grande relevância na saúde pública da América latina, sendo a segunda enfermidade associada a vetor, em prevalência e mortalidade (após a malária). Estima-se que ocorram aproximadamente 200.000 novos casos por ano e em torno de 21.000 mortes associadas à doença de Chagas (WHO Expert Committee on the control of Chagas Disease, 2002). Esta enfermidade é considerada a parasitose latino-americana de maior impacto socioeconômico, uma vez que a transmissão natural está diretamente relacionada às condições de vida da população nas áreas de risco, estudos epidemiológicos anteriores na região, constataram que cerca de 25 % da população encontra-se em risco de contrair a doença (GURTLER *et al.*, 2003).

O agente causador da doença de Chagas é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae chamado *Trypanosoma cruzi*, que apresenta uma complexa variação morfológica e fisiológica e possui três principais formas evolutivas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Os membros desta ordem possuem uma única mitocôndria que percorre todo o corpo celular e se caracterizam pela presença de uma organela denominada cinetoplasto, que é uma região diferenciada da

mitocôndria onde se concentra o DNA mitocondrial, organizado em mini e maxi- círculos, denominado k-DNA (BRENER, 2000).

A família é constituída de protozoários parasitas uniflagelados, monoxênicos ou heteroxênicos, na qual também estão presentes outros parasitas de importância médica, veterinária e agrônômica como *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, responsáveis pela tripanossomíase africana também chamada doença do sono; *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, *L. peruviana*, *L. tropica* responsáveis pelas leishmanioses tegumentares; *L. donovani* e *L. infantum* responsáveis pela leishmaniose visceral (REY, 2001), e tripanosomatídeos do gênero *Phytomonas* sp. que são protozoários fitopatógenos que apesar de não parasitarem o homem têm uma grande importância econômica já que podem parasitar culturas de mandioca, coqueiros, tomate e café causando prejuízos, como por exemplo *P. francai*, *P. serpens* e *P. staheli* (ABREU-FILHO *et al.*, 2000).

Além do cinetoplasto *T. cruzi* apresenta no citoplasma, algumas estruturas peculiares como o blefaroblasto que é um corpúsculo basal do flagelo formado pela continuação dos microtubulos deste; o acidocalcissomo, vacúolo que armazena íons cálcio para posterior utilização na célula; o glicosomo, vacúolo que possui em seu interior as enzimas da via glicolítica, onde esta ocorre; reservossomo, vacúolo presente apenas na forma epimastigota e responsável pelo armazenamento de lipídios e proteínas, em especial a cisteína protease denominada cruzipaína que é uma enzima proteolítica de natureza glicoprotéica a qual parece estar evolvida na diferenciação e penetração do parasita na célula hospedeira sendo então um importante fator de virulência do *T. cruzi* (CAZZULO *et al* 1997). Este parasita possui ainda uma camada de microtubulos subpeliculares responsável pela rigidez de seu corpo celular (DE SOUZA, 2002). Outra estrutura interessante presente em *T. cruzi* e compartilhada com outros protozoários é o citóstoma, uma estrutura especializada formada pela invaginação de uma porção da membrana plasmática na região próxima a bolsa flagelar (região de onde emerge o flagelo), encontrada nas formas epimastigotas e amastigotas (DE SOUZA *et al.*, 1978; NAKAMURA *et al.*, 2005).

Trypanosoma cruzi apresenta muitas variações morfológicas, fisiológicas e ecológicas, além de variações quanto à sua infectividade e patogenicidade o que levou autores a classificá-lo em cepas ou estirpes, como a Y e Esmeraldo. Outras classificações levando em conta características filogenéticas comuns entre cepas de *T. cruzi* foram realizadas, como uma caracterização molecular do parasita, propondo 2 subdivisões, *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII), sendo esta última subdividida em 5 grupos (a-e). Acredita-se que estas subdivisões

estejam relacionadas com a evolução do protozoário juntamente com seus hospedeiros mamíferos principais e também o seu potencial patogênico. A TcI estaria presente principalmente no ciclo silvestre e o hospedeiro mais comum seriam mamíferos marsupiais, enquanto que a TcII seria principalmente do ciclo doméstico tendo os tatus como principais hospedeiros. Outra avaliação seria a distribuição geográfica, que caracteriza a TcI predominante nos países da região amazônica e a TcII nos países do cone sul (YEO *et al.*, 2005; ZALLOUM *et al.*, 2005).

Existe também uma classificação baseada em como as populações de *T. cruzi* diferem entre si pelo perfil eletroforético de algumas isoenzimas específicas, os grupos foram chamados de zimodemas (REY, 2001). Alguns autores reuniram em três grandes grupos (Z1, Z2 e Z3), onde parasitas com perfil isoenzimático de zimodema Z1 tem a característica de serem do ciclo silvestre os parasitas que se agrupam no Z2 são característico do ciclo domiciliar e no Z3 encontram-se outros representantes não agrupados nos anteriores. Outros autores preferem utilizar outra nomenclatura (ZA, ZB, ZC, ZD) (FERNANDES *et al.*, 1994; TIBAYRENC, 2003).

A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer de duas maneiras; naturalmente através de fezes ou urina contaminadas de insetos triatomíneos hematófagos, via oral e transplacentária, ou pode ocorrer também de maneira artificial em decorrência do próprio avanço da medicina, podendo ser por transfusão sanguínea, transplante de órgãos infectados e por acidentes de laboratório.

Os vetores responsáveis pela transmissão do parasita pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae e sub-família Triatominae, e são os chamados hospedeiros invertebrados. Os triatomíneos têm hábito noturno e são hematófagos em todos os estágios da vida, possuem a característica de defecar logo após o repasto sanguíneo sendo, portanto transmissores em potencial da doença de Chagas. A fêmea põe até 500 ovos durante a vida e o tempo de incubação varia de 15 a 30 dias. A duração do ciclo de vida do inseto até seu último estágio adulto depende da temperatura, alimentação, umidade relativa e espécie, variando entre 100 dias a 2 anos (LENT *et al.*, 1979).

Três gêneros foram identificados como responsáveis pela transmissão: *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*, que juntos abrangem mais de 100 espécies distribuídas por todo o território latino-americano. A Organização Mundial de Saúde, em um levantamento feito em 1990, reportou as seis espécies de maior importância: *R. prolixus*, *T. infestans*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. brasiliensis* e *P. megistus*. No ano 2000, 10 anos depois, um novo estudo mostrou apenas 3 espécies ainda significativas: *R. prolixus*, *T. infestans* e *T.*

dimidiata. A diminuição de casos de transmissão vetorial, bem como a diminuição do número de espécies significativas decorre da melhoria nas condições habitacionais e o controle populacional dos vetores através do uso de inseticidas em áreas circunvizinhas as comunidades em risco (MONCAYO, 2003).

A transmissão congênita ocorre em um número muito menor que a vetorial sendo que até o ano 2000 em torno de 100 casos tinham sido relatados no Brasil e no Chile, a transmissão ocorre quando existem ninhos de amastigotas na placenta, e em consequência tripomastigotas originários destes ninhos podem alcançar a circulação fetal, causando assim a transmissão via transplacentária. A transmissão por via oral ocorre de forma natural, e em várias situações, desde animais ingerindo triatomíneos infectados, pessoas ingerindo alimentos contaminados com fezes ou urina de triatomíneos infectados. A penetração do parasita pode, nestes casos, ocorrer pela mucosa da boca íntegra ou lesada (NEVES, 2003).

Entre as formas de transmissão conhecidas como artificiais, pois não ocorrem na natureza, esta a transmissão via transfusão sanguínea que é diretamente relacionada com a prevalência da infecção entre os candidatos a doadores e a qualidade do sangue e hemoderivados transfundidos (SILVEIRA; REZENDE, 1994). Também existem relatos de detecção de casos de infecção através de transplante de órgãos, porém o controle já é realizado com exames dos doadores. Apesar de todos os esforços individuais e conjuntos, o controle da doença apresenta resultados diferentes, visto que os investimentos e a legislação de cada país impedem que a transmissão seja erradicada totalmente e simultaneamente (DIAS *et al.*, 2002).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, um vetor invertebrado e um vertebrado (mamífero). As formas epimastigotas (forma replicativa extracelular) se multiplicam no intestino médio do triatomíneo. Após esta multiplicação estas formas migram para a porção final do intestino do inseto e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (forma infectiva, não replicativa). Estas formas infectivas são liberadas nas fezes do inseto vetor após sua alimentação (repasto sanguíneo) nos hospedeiros vertebrados, e penetram através de uma lesão ou diretamente em uma mucosa. Uma vez penetrando no hospedeiro vertebrado as formas tripomastigotas interagem com células do sistema fagocitário-mononuclear da derme ou mucosas. Ocorre também a penetração na corrente sanguínea e consequente interiorização através das seguintes etapas; em um primeiro momento a adesão, contato e reconhecimento através de receptores levando a fixação dos tripomastigotas à superfície da célula hospedeira; em um segundo momento a interiorização com a ativação dos componentes celulares que participam da endocitose.

Após a entrada ocorre a formação de um vacúolo parasitário e conseqüente escape do parasita para o citoplasma, diferencia-se para a forma amastigota (forma replicativa intracelular). Estas formas se multiplicam continuamente por divisão binária simples e ainda no interior da célula hospedeira se diferenciam em tripomastigotas que após ruptura da célula são liberados na corrente sanguínea e podem invadir novas células ou infectar um inseto vetor, durante um novo repasto (DE SOUZA, 2002).

A principal resposta imune inata aos protozoários é a fagocitose, porém algumas espécies são capazes de resistir e se multiplicar dentro das células hospedeiras, mesmo dentro de macrófagos, como é o caso de *T. cruzi*. O processo de invasão celular ainda não é bem esclarecido, porém sabe-se da participação de lisossomos na formação do vacúolo parasitóforo. A forma tripomastigota se adere à membrana plasmática da célula hospedeira, desencadeando processos de sinalização intracelular que resultam na elevação da concentração de Ca^{2+} . Essa alteração na concentração de íons cálcio livres induz a migração gradual de lisossomos para o local da membrana onde o parasita está aderido. Enquanto os lisossomos se fundem à membrana, o parasita se internaliza em um vacúolo formado pelas membranas lisossomais. Após determinado tempo o vacúolo parasitóforo é rompido, liberando o protozoário no citoplasma. Ocorre então a diferenciação para a forma amastigota que se replica por fissão binária em ciclos aproximados de 12 horas (TAN; ANDREWS, 2002).

A virulência do parasita depende da linhagem (cepa), assim como as condições que prevalecem entre uma cepa de *T. cruzi* e o hospedeiro. É conhecido o fato de a doença de Chagas ser mais benigna em certas regiões geográficas que em outras. Além da virulência, os mecanismos pelos quais o *T. cruzi* determina as lesões devem ser multifatoriais e destes depende o aparecimento ou não das formas anatomoclínicas da doença.

No homem a doença de Chagas apresenta um curso clínico bastante variado apresentando uma fase clínica e crônica. Na fase aguda é comum o paciente apresentar uma lesão inflamatória no local de entrada do parasita chamado chagoma, quando a entrada deste ocorre pela mucosa do olho, pode-se visualizar após pouco tempo o assim chamado sinal de Romana, caracterizado pelo inchaço de um dos olhos. A fase aguda, que em geral dura poucas semanas, pode apresentar quadro febril discreto, náuseas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia e em casos mais graves podem ocorrer taquicardia, arritmias cardíacas, podendo evoluir a óbito do paciente (TANOWITZ *et al.*, 1992).

A maioria dos casos não é detectada e, portanto não tratada, ocasionando a evolução da doença para forma crônica indeterminada que consiste na presença da infecção

comprovada por sorologia e métodos parasitológicos diretos, porém sem apresentar sintomatologia e sinais clínicos como as alterações cardíacas e digestivas (DIAS *et al.*, 2002). Embora raro, em alguns casos, principalmente quando há alterações cardíacas na fase aguda, pode ocorrer uma evolução direta para a fase crônica determinada, passando por uma fase conhecida como subaguda, em que, de forma súbita em adultos jovens, manifesta-se uma gravíssima cardiopatia com insuficiência cardíaca congestiva refratária causando a morte na maioria dos casos (RASSI; LUQUETTI, 1992).

Do ponto de vista clínico-epidemiológico as formas mais graves são as formas crônicas, face aos grandes impactos médicos e sociais que causam. Estas se caracterizam por manifestações mórbidas, como a cardiopatia chagásica crônica, aneurismas e as megasíndromes (megaesôfago, megacólon e cardiomegalia). Além da observação das alterações sintomáticas o diagnóstico se baseia em exames laboratoriais, onde são realizados testes sorológicos e pesquisa direta do parasita com o xenodiagnóstico e hemocultura (BRENER, 1987). Além da problemática da patologia da doença em si, existe sobre o paciente chagásico o peso do preconceito, em que a sensação de ser portador de uma doença que apresenta um caráter marginalizante e estigmatizante, uma vez que de acordo com o conhecimento popular a doença de Chagas não tem cura e está relacionada à pobreza (ARAÚJO *et al.*, 2000).

Tratamento da Doença de Chagas

A doença de Chagas está entre as parasitoses mais prevalentes no mundo e como tantas outras não apresenta uma terapêutica eficaz. A eficácia de um fármaco antiparasitário depende do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia em geral dos parasitas. No passado, pessoas que supostamente estavam com uma parasitose eram tratadas com produtos extraídos de plantas, por administração exclusivamente oral, pois se acreditava que o sítio das infecções era o trato intestinal.

Os avanços nos conhecimentos anatômicos, bioquímicos, fisiológicos e o entendimento do ciclo de vida de quase todos os parasitas do homem, permitem que se realize atualmente o processo de planejamento dos fármacos de maneira mais racional, com ênfase no mecanismo de ação, visando atingir diretamente os alvos específicos e essenciais do parasita (FRAYHA *et al.*, 1997).

Desde a descoberta da doença por Carlos Chagas no início do século XX, até os dias atuais, foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento sem obter, no entanto, um medicamento totalmente eficaz. Muitas substâncias naturais, sintéticas e semi-sintéticas apresentaram atividade tripanocida *in vitro*, mas estão longe de se tornarem um fármaco aprovado em todos os testes clínicos (MAYA *et al.*, 2007). Apesar de imensos esforços investigativos nenhum fármaco tornou-se disponível para o tratamento da doença desde 1970 quando foram introduzidos os dois fármacos atuais no mercado Benzonidazol e Nifurtimox (COURA *et al.*, 2002).

Não existe até o presente momento, um tratamento preventivo para a doença de Chagas sendo que vacinas testadas são ineficazes, pois este parasita tem um notável mecanismo de fuga do sistema imunológico do hospedeiro e o controle epidemiológico esbarra nas condições sócio-econômica dos países latino-americanos (CASTILHO *et al.*, 2003).

Os fármacos disponíveis atualmente no mercado mundial para o tratamento da doença de Chagas são os chamados derivados nitroheterocíclicos; o Nifurtimox, do grupo dos nitrofuranos, e o Benzonidazol, do grupo dos nitroimidazóis (Tabela-1). Ambos os medicamentos são ativos durante a fase aguda da doença e na fase crônica em curto prazo. Tanto testes em laboratório como ensaios clínicos têm revelado que a eficiência destas drogas varia com a linhagem do parasita (BRAESTRUP *et al.*, 1980). Além destes fatores limitantes estes medicamentos apresentam fortes efeitos colaterais como anorexia, distúrbios gastro-intestinais, neuropatias, erupções cutâneas do tipo eritema polimorfo não-bolhoso, distúrbios da hematopoese (com granulocitopenia ou agranulocitopenia) e dermatotoxicidade, sendo o seu uso parenteral controverso (GORLA *et al.*, 1988; CROFT *et al.*, 2005).

Estudos recentes têm elucidado os mecanismos de ação e toxicidade destas drogas, sendo que o Nifurtimox parece agir via redução do grupamento nitro a radicais nitroânion instáveis, os quais reagem entre si produzindo metabólitos reduzidos do oxigênio altamente tóxicos (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio). *T. cruzi* tem demonstrado ser deficiente em ter mecanismos de antagonizar metabólitos do oxigênio, principalmente o peróxido de hidrogênio e é mais sensível a este stress oxidativo que as células de mamíferos. Benzonidazol parece agir de maneira distinta, a qual envolve modificações covalentes de macromoléculas por nitroredução (URBINA; DOCAMPO, 2003). Estudos anteriores sugerem que diferentes níveis de resistência, de diversas cepas de *T. cruzi* a esses derivados nitroheterocíclicos pode ser um fator importante para explicar a baixa cura de pacientes chagásicos (MURTA *et al.*, 1998).

Para eliminação do parasita em sangue contaminado de bancos de sangue a única substância utilizada como quimioprofilático é a violeta genciana (Tabela-1) adicionada na concentração de 250 μ g/mL, o que resulta em 100% de eliminação das formas infectantes. Porém seu uso também é limitado pelos efeitos colaterais e pela coloração à pele e a urina dos pacientes transfundidos (DOCAMPO; SCHMUÑIS, 1997).

Uma vez que o arsenal de drogas disponíveis para o tratamento da doença de Chagas é extremamente limitado torna-se imprescindível a descoberta de novos protótipos, e não obstante o desprezo pela pesquisa de uma cura para esta enfermidade pelas indústrias farmacêuticas, notáveis avanços na compreensão da biologia, ciclos metabólicos e ultra-estrutura do *T. cruzi* tem sido feito nas últimas décadas em institutos de pesquisa básica que, contudo não se materializaram em novos e eficientes medicamentos para o tratamento da doença de Chagas (CROFT *et al.*, 2005).

Para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e eficientes é importante a seleção do alvo terapêutico, o que permite uma busca por agentes que provoquem a resposta desejada específica para o controle da doença. O maior foco para descoberta de novos fármacos antichagásicos nas últimas décadas tem sido a identificação e caracterização bioquímica, estrutural e molecular dos alvos (CROFT *et al.* 2005). Levando

em conta estas condições diversas abordagens têm sido adotadas por diversos pesquisadores, tais como inibidores da cruzipaina, cisteína protease essencial presente nos três estágios morfológicos e principal antígeno do *T. cruzi* (CAZZULO *et al.*, 1997).

Existem relatos sobre a possibilidade de se usar drogas que atuem nas proteínas quinases do parasita, explorando as diferenças entre estas e as dos hospedeiros, conferindo assim uma seletividade (NAULA *et al.*, 2005). A adaptação de medicamentos utilizados em outras infecções para terapêutica anti-chagásica tem sido adotada, principalmente com alguns antifúngicos, uma vez que os protozoários compartilham com os fungos algumas características estruturais interessantes, como a presença de ergosterol na membrana plasmática. Estudos recentes utilizando derivados triazóis mostraram que estes compostos promoveram cura parasitológica da ordem de 70 a 100% em camundongos infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção (URBINA *et al.*, 1996; URBINA, 1999). Estes resultados foram também confirmados utilizando-se cepas naturalmente resistentes ao Benzonidazol (MOLINA *et al.*, 1997).

Utilizando estas estratégias, nos últimos anos a bioprospecção de compostos

ativos derivados de compostos naturais com ação tripanocida tem aumentado, principalmente pela vantagem de mostrar eficiência e baixa ou nenhuma citotoxicidade (NAGAFUJI *et al.*, 2004; LUIZE *et al.*, 2006; SÜLSEN *et al.*, 2006). Diversos produtos têm demonstrado atividade tripanocida, como o extrato aquoso de *Camellia sinensis* que parece inibir a enzima arginina quinase do parasita interferindo assim com seu metabolismo (PAVETO *et al.*, 2004), neolignanais isoladas de folhas de *Piper regnellii* (LUIZE *et al.*, 2006), extrato etanólico obtido de *Populus nigra* (DANTAS *et al.*, 2006), óleos essenciais obtidos de *Syzygium aromaticum*, *Achillea millefolium* e *Ocimum basilicum* (SANTORO *et al.*, 2007), e ainda isoquinolinas isoladas de *Ocotea lancifolia* que possuem intensa atividade sobre tripomastigotas sanguíneas (FOURNET *et al.*, 2007).

Além dos produtos naturais alguns compostos sintéticos e semi-sintéticos têm demonstrado atividade tripanocida, como demonstrado anteriormente com o risedronato bisfosfonato (GARZONI *et al.*, 2004), L-leucina-metil éster que parece ter atividade sobre o crescimento de *T. cruzi* (ADADE *et al.*, 2007) e ainda β -Lapachonas semi-sintéticas demonstraram ser promissores agentes tripanocidas *in vitro* (MENNA-BARRETO *et al.*, 2005). Outros compostos sintéticos conhecidos como WSP® demonstram atividade antiproliferativa sobre formas epimastigotas (BRAGA *et al.*, 2005), Derivados triazóis como o UR-9825® e albacazol que são inibidores da biossíntese do ergosterol têm apresentado resultados interessantes na inibição do *T. cruzi* sendo que este último demonstrou ser eficiente na diminuição da parasitemia em animais infectados (GUEDES *et al.*, 2004).

Compostos Carbolínicos

Entre os compostos que se apresentam como prósperos agentes tripanocidas se situam os compostos carbolínicos, que originalmente são encontrados distribuídos na natureza tanto em diversos seres vivos como vegetais, fungos, animais e inclusive em fluidos de seres humanos (RIVAS *et al.*, 1999). Os carbolínicos são uma classe de compostos alcalóides que, além de apresentarem um núcleo indólico, possuem um anel piridínico hidrogenado de seis membros (Figura-1) (Henriques *et al.*, 1999). Os carbolínicos podem ser divididos em três grupos estruturais dependendo do grau de saturação do anel: (a) totalmente aromáticos, (b) dihidro-carbolínicos ou derivados do harmalano, (c) tetrahydro- β -carbolínicos com anel piridínico totalmente saturado (Figura-1) (GLENNON *et al.*, 2000).

Alcalóides β -carbolínicos naturais e sintéticos tem sido alvo de diversos estudos químicos e biológicos, e na natureza os β -carbolínicos se originam do triptofano, através da condensação entre a triptamina (produto de descarboxilação do triptofano) e um aldeído ou α -cetoácido, como demonstrado em estudos utilizando a marcação isotópica C-14 (^{14}C) e Trítio (^3H) (HUSSON, 1985). A obtenção destes compostos pode ser realizada em laboratório e o método mais utilizado para sua síntese é a reação de Pictet- Spengler (Figura-2) (COX *et al.*, 1995), a qual envolve a condensação sucessiva do triptofano metil éster com aldeídos, originando uma molécula primária de tetrahydro- β - carbolína que sofrendo substituições dos seus radicais origina moléculas distintas e com atividades distintas. Dentre as atividades biológicas descritas de compostos carbolínicos estão ação anticonvulsivante, antioxidante, ansiolítico, sedativo, antimicrobiano, inseticida e antiparasitário (CAO *et al.*, 2005).

Possíveis efeitos tóxicos destes compostos foram objeto de estudo de grupos de pesquisa o qual constataram que efeitos tóxicos e mutagênicos são dependentes da estrutura e concentração utilizada, porém a existência de alguns tipos de β -carbolínicos no ser humano sugere a presença de vias metabólicas e biosintéticas para estes compostos, tais que o corpo humano seria capaz de interagir com estes compostos, reduzindo assim seus efeitos tóxicos (RIVAS *et al.*, 1999).

Apesar do mecanismo de ação dos β -carbolínicos não estar totalmente elucidado, trabalhos anteriores têm sugerido que os compostos β -carbolínicos poderiam intercalar-se no DNA das células alvo, supondo que, o anel β -carbolínico presente na molécula possuindo uma estrutura planar se depositaria nos pares de bases do DNA, e esta intercalação contribuiria para sua atividade biológica (Figura-3) (BORSEREAU; COLDHAM, 2004; ZHAO *et al.*, 2006). Estudos anteriores cogitaram a possibilidade dos carbolínicos terem a capacidade de induzir apoptose *in vitro* (HANS *et al.* 2005) e como agente tripanocida seu modo de ação parece envolver alterações na síntese de DNA e inibição da cadeia respiratória (RIVAS *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação antiparasitária de compostos tetrahydro- β -carbolínicos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mostrar o efeito dos compostos sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- Verificar o efeito do composto carbolínico, **C4**, na viabilidade de formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Testar a atividade do carbolínico **C4** na interação parasita-célula hospedeira;
- Visualizar as alterações morfológicas e ultraestruturais nas formas epimastigota, amastigota e tripomastigota de *T. cruzi* causadas pelo **C4**, através de microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão e varredura;
- Avaliar a citotoxicidade do composto carbolínico em eritrócitos e células de linhagem de mamíferos-LLCMK₂;

REFERÊNCIAS

- ABREU-FILHO, BA. DIAS FILHO, BP. VERMELHO, AB. JANKEVICIUS, SI. JANKEVICIUS, JV. DOS SANTOS, RL. 2000. Surface Component Characterization as Taxonomic Tools for *Phytomonas* spp Identification. *Parasitol. Res.*, 87: 138-144.
- ADADE, CM. FIGUEIREDO, RCBQ. DE-CASTRO, SL. SOARES MJ. 2007. Effect of L-leucine Methyl Ester on Growth and Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.*, 101: 69-79.
- ARAÚJO, SM. ANDÓ, MH. CASSAROTTI, DJ. D'ARCE-MOTA DCG. BORGES, SMR. GOMES ML. 2000. Programa Achei: Atenção ao Chagásico com Educação Integral no Município de Maringá e Região Noroeste do Paraná, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 33: 565-572.
- BORSEREAU, Y. COLDHAM, I. 2004. Synthesis and Biological Studies of 1-Amino β -Carbolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 5841-5844.
- BRAESTRUP, C. NIELSEN, M. OLSEN, CE. 1980. Urinary and Brain β -Carboline-3-carboxylates as Potent Inhibitors of Brain Benzodiazepine Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 2288-2292.
- BRAGA, MV. MAGARACI, F. LORENTE, SO. GILBERT, I. DE SOUZA, W. 2005. Effects of Inhibitors of Delta24(25)-sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc. Microanal.*, 11: 505-515.
- BRENER, Z. 1987. The Pathogenesis and Immunopathology of Chronic Chagas' Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 205-212.
- BRENER, Z. ANDRADE, ZA. BARRAL-NETO, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. *Guanab. Koogan*, Rio de Janeiro.
- CAMARGO, ME. SILVA, GR. CASTILHO, EA. SILVEIRA, AC. 1984. Inquérito Sorológico da Prevalência da Infecção Chagásica no Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 26: 192-204.
- CAO, R. CHEN, H. PENG, W. 2005. Design, Synthesis and *in vivo* Anti-tumor Activities of Novel β -Carboline Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 40: 991-1001.

- CASTILHO, MV. PAVÃO, F. OLIVA, G. 2003. Evidence for the Two Phosphate Binding Sites of an Analogue of the Thioacyl Intermediate For the *Trypanosoma cruzi* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Catalyzed Reaction, From its Crystal Structure. *Biochemistry*, 42: 7143-7151.
- CAZZULO, JJ. STOKA, V. TURK, V. 1997. Cruzipain, the Major Cysteine Proteinase From the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Chem.*, 378: 1-10.
- COURA, JR. JUNQUEIRA, ACV. FERNANDES, O. VALENTE, SAS. MILES, MA. 2002. Emerging Chagas Disease in Amazonian Brazil. *Trends. Parasitol.*, 18: 171-176.
- COX, ED. COOK, JM. 1995. The Pictet-Spengler Condensation: A New Direction for an Old Reaction. *Chem. Rev.*, 1797-1842
- CROFT, SL. BARRET, MP. URBINA, JA. 2005. Chemotherapy of Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Trends. Parasitol.*, 21: 508-512.
- DANTAS, AP. SALOMÃO, K. BARBOSA, HS. 2006. The Effect of Bulgarian Propolis Against *Trypanosoma cruzi* and During its Interaction With Host Cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101: 207-11.
- DE SOUZA, W. PALOMO, AM. ROBLES, AG. 1978. Cell Surface of *Trypanosoma cruzi*: Cytochemistry and freeze fracture. *J. Cell. Sci.*, 33: 285-292.
- DE SOUZA, W. 2002. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.*, 8: 269-285.
- DIAS, JCP. SILVEIRA, AC. SCHOFIELD, CJ. 2002. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97: 603-612.
- DOCAMPO, R. SCHMUÑIS, GA. 1997. Sterol Biosynthesis Inhibitors: Potential Chemoterapeutics against Chagas Disease. *Parasitol. Today*, 13: 129-130.
- FERNANDES, AJ. DIOTAIUTI, L. DIAS, JCP. ROMANHA, AJ. CHIARI, E. 1994. Inter-Relações entre os Ciclos de Transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Município de Bambuí, Minas Gerais. *Cad. Saúde Pública*, 10: 473-480.
- FOURNET, A. FERREIRA, ME. ROJAS DE ARIAS, A. GUY, I. GUINAUDEAU, H. HEINZEN, H. 2007. Phytochemical and Antiprotozoal Activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia*, 78: 382-384.

FRAYHA, GJ. SMYTH, JD. GOBERT, JG. SAVEL, J. 1997. The Mechanism of Action of Antiprotozoan and Antihelminthic Drugs in Man. *Gen. Pharmacol.*, 28: 273- 299.

GARZONI, LR. CALDERA, A. MEIRELLES, MNL. DE CASTRO, SL. DOCAMPO, R. MEINTS, GA. OLDFIELD, E. URBINA, JA. 2004. Selective effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risnedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 23: 273-285.

GLENNON, RA. DUKAT, M. GRELLA, B. HONG, SS. CONSTANTINO, L. TEITLER, M. SMITH, C. EGAN, C. DAVIS, K. MATSON, MV. 2000. Binding of β -Carboline and Related Agents at Serotonin (5HT-2) and (5HT-1A) Dopamine D2 and Benzodiazepine Receptors. *Drug Alcohol Depend.*, 60: 121-132.

GORLA, NB. LEDESMA, OS. BARBIERI GP. LARRIPA, IB. 1988. Assessment of Cytogenetic Damage in Chagasic Childrens Treated With Benznidazole. *Mutat. Res.*, 206: 217-220.

GUEDES, PMM. URBINA, JA. LANA, M. AFONSO, LCC. VELOSO, VM. TAFURI, WL. MACHADO-COELHO, GLL. CHIARI, E. BAHIA, T. 2004. Activity of the New Triazole Derivative Albacazole Against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in Dog Hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 4286-4292.

GURTLER, RE. SEGURA, EL. COHEN, JE. 2003. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 29-32.

HANS, G. MALGRANGE, B. LALLEMEND, F. CROMMEN J. WISLET- GENDEBIEN, S. BELACHEW, S. ROBE, P. ROGISTER, B. MOONEN, G. RIGO, JM. 2005. β -Carbolines Induces Apoptosis in Cultured Cerebellar Granule Neurons via the Mitochondrial pathway. *Neuropharmacology*, 48: 105-117.

HENRIQUES, AT. KERBER, VA. MORENO, PRH. 1999. Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos In: SIMÕES, CMO. *et al. Farmacognosia-Da planta ao medicamento*. Ed. Universidade/UFRS. Ed. UFSC. Porto Alegre/Florianópolis.

HUSSON, HP. 1985. The Simple Indole Alkaloids. In: BROSSI, A. *The Alkaloid: Chemistry and Pharmacology*. Academic in Press Inc. Orlando, 26: 35-50.

LENT, H. WYGODZINSKY, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and Their Significance as Vectors of Chagas Disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 163: 123–520.

LUIZE, PS. UEDA-NAKAMURA, T. DIAS-FILHO, BP. CORTEZ, DAG. VATARU-NAKAMURA, C. 2006. Activity of Neolignans Isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK Against *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Pharm. Bull.*, 29: 2126-2130.

MAYA, JD. CASSELS, BK. ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P. FERREIRA, J. FAÚNDEZ, M. GALANTI N. FERREIRA, A. MORELLO, A. 2007. Mode of Action of Natural and Synthetic Drugs Against *Trypanosoma cruzi* and Their Interaction With the Mammalian Host. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146: 601-620.

MENNA-BARRETO, RFS. HENRIQUES-PONS, A. PINTO, AV. MORGADO-DIAZ, JA. SOARES, MJ. CASTRO, SL. 2005. Effect of a β -Lapachone - Derived Naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: Identification of Target organelles. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56: 1034-1041.

MOLINA, J. ARAUJO, MSS. PEREIRA, MES. BRENER, Z. URBINA, J A. 1997. Activity of the Bis-Triazole D0870 Against Drug-Resistant *Trypanosoma cruzi* Strains. ICAAC. Abstracts 37: B41b.

MONCAYO, A. 2003. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends After the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98: 577-591.

MURTA, SM. ROMANHÃ, AJ. 1998. *In vivo* Selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and Clones Resistant to Benznidazole. *Parasitology*, 116: 165-171.

NAGAFUJI, S. OKABE, H. AKAHANE, H. ABE, F. 2004. Trypanocidal Constituents in Plants – Withanolides From the Aerial Parts of *Physalis angulata*. *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 193-197.

NAKAMURA, CV. UEDA-NAKAMURA, T. DE SOUZA, W. 2005. Visualization of the Cytostome in *Trypanosoma cruzi* by High Resolution Field Emission Scanning Electron Microscopy Using Secondary and Backscattered Electron imaging. *FEMS Microb. Lett.*, 242: 227-230.

NAULA, C. PARSONS, M. MOTTRAM, JC. 2005. Protein Kinases as Drug Targets in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Biochim. Bioph. Acta*, 1754: 151-159.

NEVES, DP. 2003. Parasitologia Humana. *Atheneu*. São Paulo. 73-96.

PAVETO, C. GUIDA, MC. ESTEVA, MI. MARTINO, V. COUSSIO, J. FLAWIÁ, MM. TORRES, HN. 2004. Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 69-74.

RASSI, A. LUQUETTI, AO. 1992. Therapy of Chagas' Disease In: WENDEL, S. BRENER, Z. CAMARGO, M.E. RASSI, A. (Eds). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): It's Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT Brazil'92. São Paulo. 237-247.

REY, L. 2001. Parasitologia. *Guanab. Koogan*, Rio de Janeiro. 151-200.

RIVAS, P. CASSELS, BK. MORELLO, A. REPETTO, Y. 1999. Effects of Some β -Carboline Alkaloids on Intact *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 122: 27-31.

SANTORO, GF. CARDOSO, MG. GUIMARÃES, LGL. 2007. *Trypanosoma cruzi*: Activity of Essential Oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L., *Ocimum basilicum* L. on Epimastigotes and Trypomastigotes. *Exp. Parasitol.*, 116: 283- 90.

SILVEIRA, AC. RESENDE, DF. 1994. Epidemiologia e Controle da Transmissão vetorial da Doença de Chagas no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 27: 11-22.

SÜLSEN, V. GÜIDA, C. COUSSIO, J. PAVETO, C. MUSCHIETTI, L. MARTINO, V. 2006. In Vitro Evaluation of Trypanocidal Activity in Plants Used in Argentine Traditional Medicine. *Parasitol. Res.*, 98: 370-374.

TAN, H. ANDREWS, NW. 2002. Don't Bother to Knock—The Cell Invasion Strategy of *Trypanosoma cruzi*. *Trend. Parasitol.*, 18: 427-428.

TANOWITZ, HB. KIRCHHOFF, LV. SIMON, D. MORRIS, SA. WEISS, LM. WITTNER, M. 1992. Chagas's Disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 5: 400-419.

TIBAYRENC. M. 2003. Genetic Subdivisions Within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinet. Biol.Dis.*, 12: 1-6.

URBINA, JA. PAYARES, G. MOLINA, J. SANOJA, C. LIENDO, A. LAZARDI, K. PIRAS, MM. PIRAS, R. PEREZ, N. WINCKER, P. RYLEY, JF. 1996. Cure of Short and Long-Term Experimental Chagas Disease Using D0870. *Science*, 273: 969-971.

URBINA, JA. 1999. Parasitological Cure of Chagas Disease: is it Possible? Is it Relevant?. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 349-355.

URBINA, JA. DOCAMPO, R. 2003. Specific Chemotherapy of Chagas Disease: Controversies and Advances. *Trends Parasitol.*, 19: 495-501.

ZALLOUM, L. GOMES, ML. KINOSHITA, AT. TOLEDO, MJO. PRIOLI, AJ. ARAÚJO, SM. 2005. *Trypanosoma cruzi*: Two Genetics Groups in Paraná State, Southern Brazil. *Exp. Parasitol.*, 111: 55-58.

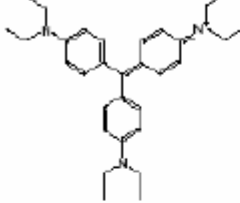
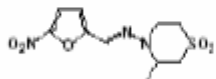
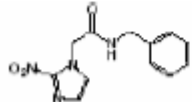
ZHAO, M. BI, L. WANG, W. WANG, C. BAUDY-FLOCH, M. JU, J. PENG, SHIQI. 2006. Synthesis and Cytotoxic Activities of β -Carboline Amino Acid Ester Conjugates. *Bioorg. Med. Chem.*, 14: 6998-7010.

WHO – World Health Organization. 2002. Expert Committee on the Control of Chagas Disease. *Control of Chagas Disease*. 1-95.

YEO, M. ACOSTA, N. LLEWELLYN, M. SANCHEZ, H. ADAMSON, S. MILES, GAJ. LOPEZ, E. GONZALEZ, N. PATTERSON, JS. GAUNT, MW. ARIAS, AR. MILES, MA. 2005. Origins of Chagas Disease: *Didelphis* Species are Natural Hosts of *Trypanosoma cruzi* I and Armadillos Hosts of *Trypanosoma cruzi* II, Including Hybrids. *Int. J. Parasitol.*, 35: 225–233.

ANEXOS

Tabela 1. Estruturas dos dois fármacos atuais contra a Doença de Chagas e do único agente quimioprolático encontrado no mercado.

Estrutura química	Fármaco
 <p>The structure shows a central carbon atom bonded to three aromatic rings: two 4-(diethylamino)phenyl groups and one 4-(diethylamino)phenyl group. The word "or" is placed to the right of the structure.</p>	Violeta genciana
 <p>The structure consists of a 5-nitro-1,2,4-oxadiazole ring connected via a methylene group to a methylene group, which is further connected to a methylene group attached to a 4-methyl-2-nitro-1,4-piperazine ring.</p>	Nifurtimox
 <p>The structure features a 5-nitro-1,2,4-oxadiazole ring connected via a methylene group to a methylene group, which is further connected to a methylene group attached to a benzimidazole ring system.</p>	Benznidazol

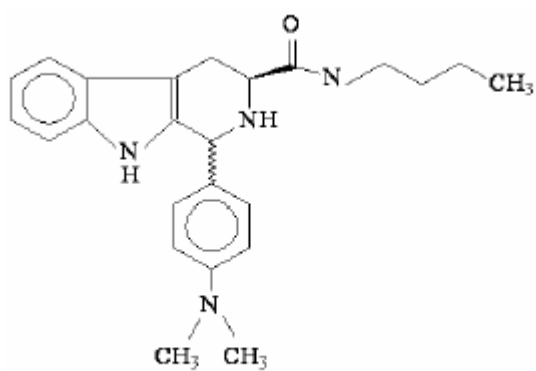


Figura-1: Estrutura molecular do composto – 4 *N*-butil-1-(4-dimethylamino)fenil-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolínico-3-carboxamida.

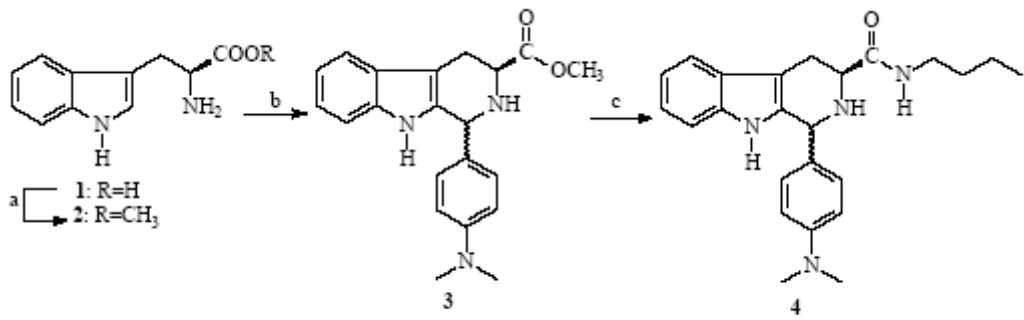


Figura -2: Representação esquemática da reação pictet spengler a partir do triptofano metil éster.

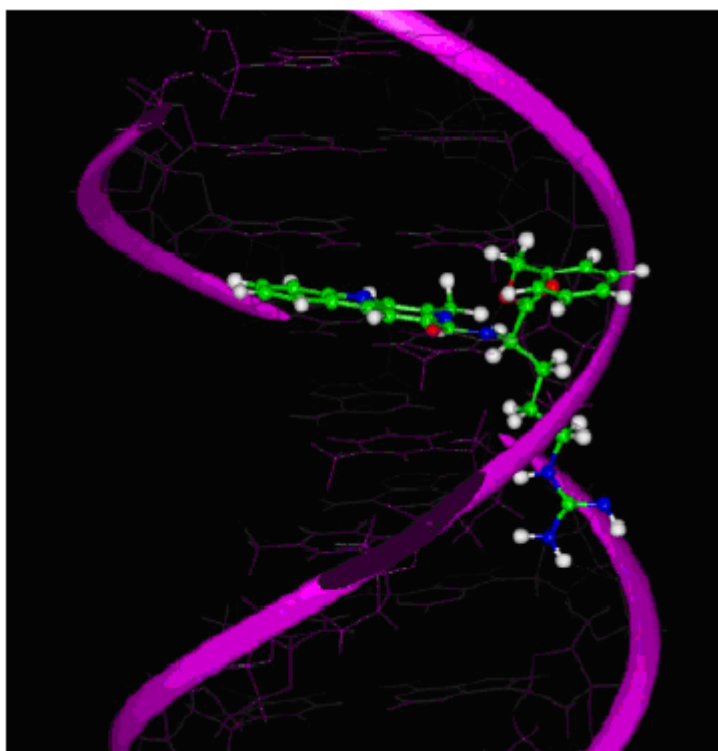


Figura-3: Modelo tridimensional da ligação do composto carbolínico com a molécula de DNA, adaptado de Zhao *et al.*, 2006.

ARTIGO

Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides against***Trypanosoma cruzi***

*Rodrigo Hinojosa Valdez*¹; *Lilian Tatiani Düsman*²; *Tânia Ueda-Nakamura*³;
Benedito Prado Dias Filho^{1,3}; *José Andrés Morgado-Díaz*⁴; *Maria Helena Sarragiotto*²;
Celso Vataru Nakamura

¹.- Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, CEP 86051-990, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brazil; ².- Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá; ³.- Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Bloco I-90 Sala 123 CCS, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil; ⁴.- Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

* Address for correspondence: Celso Vataru Nakamura, Universidade Estadual de Maringá; Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Bloco I-90 Sala 123 CCS, Avenida Colombo, 5790; BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil. Phone number: +55 44 3261-4863. Fax: +55 44 3261-4860. E-mail address: cvnakamura@uem.br

ABSTRACT

Several β -carboline compounds were evaluated for in vitro trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi* and their potential toxic effects was also assessed. β -carboline derivative 4 showed good activity against epimastigote, trypomastigote, and amastigote forms of *T. cruzi*, with a dose-dependent inhibitory effect. It showed an IC_{50} of 14.9 μ M against the epimastigote form and an EC_{50} of 45 μ M and 33 μ M against trypomastigote and amastigote forms, respectively. Additionally 4 was able to be active on mammalian cell - protozoan interaction, reducing the number of infected cells and the number of internalized parasites. The compound showed low cytotoxicity, with a selective index 31 times higher to the parasite than for mammalian cells. In human red-blood cells β -Carboline 4 at 14.9 μ M not caused haemolysis. Observed at electron microscopy 4- treated epimastigotes showed abnormal swelling of the mitochondrion, a diffuse kinetoplast, and distortions of the parasite cell body. The present data support the potential effect of this class of compounds against *T. cruzi* and encourage further experiments in vitro to evaluate the action mechanism of this drug and also with in vivo models.

Keywords: Trypanocidal; Carbolines; Chemotherapy; Electron Microscopy.

INTRODUCTION

Chagas' disease, also called american trypanosomiasis is a parasitic disease caused by the kinetoplastid protozoon, *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. It is endemic from México to Argentine, which afflicts 16 to 18 million people. Mortality indices range from 8 % to 12 % depending on the age and the physiological state of the patient.¹

The current treatment for this disease is very limited and the development of vaccines has far been unsuccessful.² The available drugs for that clinical treatment are the nitroderivatives Benznidazole and Nifurtimox, both unsatisfactory. It present variable healing effects according to the geographical region and require long term treatment, besides presenting frequent toxic side effects and are only effective against acute infection, during which most patients do not know they are infected with *T. cruzi*. In addition, it has limited efficacy in the chronic stage.³ Furthermore, important differences in susceptibility to these drugs have been detected among different parasite strains isolated in various parts of American continent.⁴

A number of new drugs have been reported to be effective *in vitro* or *in vivo* against *T. cruzi*, but no one has been found completely satisfactory, for either the treatment of Chagasic patients or for prophylaxis of blood to prevent infection via blood transfusion. Clearly, new drugs and new approaches for facin these problems are necessary.⁵ In this context, exist an exhaustive search for new synthetic and natural products for treatment of Chagas disease.⁶ The carbolines which are widespread in nature have been isolated from fungi, plant species, marine organisms and mammalian and showed a good activity against *T. cruzi*.⁴

Natural and synthetic β -carbolines and tetrahydro- β -carbolines alkaloids are well-known compounds that posses a variety of biological properties, such as anticonvulsive,

ansiolytic, sedative, antimicrobial, antithrombotic, anti-HIV, antiproliferative, insecticidal, and parasiticidal.⁷ This class of compounds has been tested in trypanocidal assays and some papers have reported the activity of β -carbolines and tetrahydro- β -carbolines against *T. cruzi*.⁸ In our previous work⁹ twelve tetrahydro- β -carbolines derivatives bearing an N-alkyl or cycloalkyl carboxamide group in the 3- position and a substituted phenyl group at 1- position, were synthesized. The tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides were prepared from L-tryptophan (**1**), through a Pictet- Spengler condensation¹⁰ of the L-tryptophan methyl ester (**2**) with a series of aromatic aldehydes, followed by the reaction of the methyl tetrahydro- β -carboline-3-carboxylates intermediates with different amines.

In this paper we report an screening of anti-trypanosomal activity of several carbolines and investigated the effect of compound *N*-butyl-1-(4- dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide (Table 1) against epimastigote, amastigote, and trypomastigote forms of *T. cruzi*.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The aldehydes and amines used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), Acros-Organics (Geel, Belgium) and Merck (Darmstadt, Germany). L-tryptophan was purchased from Synth (São Paulo, Brazil) and trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Carlo Erba (Milan, Italy). The chemicals were used without further purification.

Synthesis of N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide (4)

The methyl tetrahydro- β -carboline-3-carboxylate (**3**) (Figure 1) was prepared through a Pictet-Spengler reaction of the L-tryptophan methyl ester (**2**) with 4-dimethylaminobenzaldehyde, accordingly to the procedure previously reported (Bailey, 1987)¹⁰. A mixture of L-tryptophan methyl ester (0.5 mmol), 4-dimethylaminobenzaldehyde (0.5 mmol) and trifluoroacetic acid (trace) in CH₂Cl₂ (10 mL) was stirred at 0 °C, over molecular sieves. After 24 h, an excess of TFA (1.0 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 6 h followed by evaporation of the solvent. Treatment of the crude product with 10% Na₂CO₃, extraction with EtOAc (3×10 mL), drying of organic layer under anhydrous Na₂SO₄, filtration and solvent evaporation afforded a residue which was purified on chromatographic column (silica flash; hexane-EtOAc 20%) to give the compound **3** as a *cis/trans* mixture.

The *N*-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide (**4**) was obtained from the reaction of the corresponding ester **3** with Butylamine (Figure 1), accordingly to the procedure previously reported.¹¹ A solution of the methyl-1-(4-

dimethylamino) phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylate (**3**) (1.0 mmol) and the butylamine (5 ml) was refluxed for 24 h; then the excess of amine was removed under vacuum. The residue was crystallized by using MeOH as solvent to give the compound **4** as a *cis/trans* mixture. The synthesized compound was characterized by spectral (^1H and ^{13}C NMR, MS and IR) data. The stereochemistry of *cis* and *trans* isomers was assigned on the basis of ^{13}C NMR data.⁹

Chemistry

The reactions were monitored by TLC, using Dragendorff's reagent. Electron impact mass spectra (EIMS) were taken on a spectrometer Shimadzu-CG/MS model QP 2000A, at 70 eV. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra were recorded in a Varian spectrometer model Mercury plus BB 300 MHz with deuterated chloroform (CDCl_3) using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard (chemical shifts in δ , ppm). Infrared (IR) spectra (KBr) were recorded on a Bomem spectrophotometer, MB-100 model (ν_{max} in cm^{-1}). The melting points were measured in a Quimis apparatus. The compounds were characterized by the above-mentioned techniques and the data are listed below.

Compound **3** (*cis/trans*). IR (KBr, cm^{-1}) 1733 (ν , C=O). ^1H -NMR (300 MHz; CDCl_3/TMS , δ): 7.59/7.72 (s, 1H, NH); 6.64-7.54 (m, Ar-H); 5.10 (t, 1H, H-1, $J = 2.1$ Hz)/ 5.27 (bs, 1H, H-1); 3.91-3.97 (m, 2H, H-3); 3.78/3.69 (s, 3H, OCH₃); 2.97-3.28 (m, 4H, H-4); 2.93/2.91 (s, 6H, N(CH₃)₂); ^{13}C -NMR (75.5 MHz; CDCl_3/TMS , δ): 174.4, 173.5, 150.9, 150.6, 136.3, 136.2, 135.7, 134.2, 129.8, 129.6, 129.4, 128.3, 127.4, 127.3, 121.9, 119.6, 119.5, 118.3, 112.8, 112.6, 111.1, 108.8, 108.4, 58.2, 57.2, 54.6, 52.6, 52.3, 40.7, 24.9, 26.0. MS (m/z) 349 (M^+). Yield: 88%.

Compound 4 (cis/trans). IR (KBr, cm^{-1}) 1651 (v, C=O). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3/TMS , δ): 6.63-7.57 (m, Ar-H); 5.08 (t, 1H, H-1, $J = 2.1$ Hz)/5.14 (bs, 1H, H-1); 3.62-3.73 (m, 2H, H-3); 3.15-3.42 (m, 4H, H-4); 2.95/2.91 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 2.76-2.90 (m, 4H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1.46 (m, 4H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1.34 (m, 4H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 0.91 (m, 6H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz; CDCl_3/TMS , δ): 173.3, 172.9, 150.9, 150.4, 136.4, 136.3, 135.6, 134.1, 129.6, 129.5, 129.1, 128.2, 127.5, 127.4, 122.0, 119.7, 119.6, 118.6, 112.7, 112.5, 111.0, 110.3, 110.1, 58.6, 58.4, 55.0, 52.6, 40.7, 39.0, 31.9, 31.8, 25.8, 24.9, 20.3, 14.0; MS (m/z) 391 (M^+). Yield: 75%.

Parasite. Epimastigote form of *T. cruzi* Y strain was grown at 28° C in Liver Infusion Tryptose (LIT) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Invitrogen Corporation, New York, USA) at 28° C for 96 h. Trypomastigote and amastigote forms were obtained by infection of LLCMK₂ cell monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Invitrogen Corporation, New York, USA) at 37 °C and 5% Co₂ atmosphere.

Cells Culture. LLCMK₂ (monkey kidney cells) were maintained in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 50 mg/L gentamicin and buffered with sodium bicarbonate.

Antiproliferative activity of Carboline C4 in epimastigote form.

Epimastigote form of *T. cruzi* in the logarithmic phase was used for this assay. The β -carboline compound was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and LIT medium to obtain concentrations of 3, 13, 26, 128, 256 μM . The final concentration of DMSO did not exceed 1% and for each experiment there was a growth control with and without DMSO.

A cell density of 1×10^6 epimastigotes/mL was cultured in the presence of several

concentrations of β -carboline compound (3 to 256 μ M). In 24 well microplate, obtaining final volume of 1 mL. The cells were incubated at 28 °C and the growth was determined by counting the parasites with haemocytometer chamber every day for 7 days and IC₅₀ (inhibition concentration) was calculated. Benznidazole - Rochagan® (Roche Pharmaceuticals, Rio de Janeiro, Brazil) was used as reference drug.

Effect of the Carboline C4 on viability of trypomastigote and amastigote forms

The tissue culture-derived parasites trypomastigote and amastigote forms were resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with FBS containing 10% of mouse blood in a concentration of 10⁷ parasites/mL. In 96 well microplate 100 μ L of this suspension was added to the same volume of the drug diluted in DMSO and DMEM at the twice the desire final concentration (8, 16, 32, 64, 128, 256, 513, 1026, 2051 μ M), and incubated for 24 h at 4 °C and 37 °C. To the viability of trypomastigotes the parasites were counted by Pizzi-Brener method¹². For this an aliquot of 5 μ l of each sample were placed on slides plus coverslips and immediately counted in an optical microscopy (Brener et al., 1962), subsequently the EC₅₀ (concentration which lysed 50% of the parasites) was calculated. In the case of amastigote forms where is impossible to distinguish the mobility of viable and unviable cells, the viability of free amastigotes was determined by counting in a haemocytometer chamber (Improved Double Neubauer) with a light microscope, after addition of 0.4% erythrosine B. Crystal violet (Inlab, São Paulo, Brazil) was used as the reference drug. The EC₅₀ value was

also evaluated.

Effect of the Carboline C4 on the intracellular amastigote in LLCMK₂ cell line.

In the 24-well microplate containing glass coverslips, a 500 μL aliquot of the LLCMK₂ cells (2.5×10^5 cells/mL) was seeded in each well and incubated for 24 h at 37 °C with 5% CO₂. Next, the LLCMK₂ cell monolayer was infected with trypomastigotes (10:1) for 24 h, then washed with 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2, and fresh medium with and without the drug in different concentrations (16, 32, 64, 128 μM) was added to the wells. The microplate was incubated for 96 h at 37 °C with 5% CO₂ atmosphere. The cells were fixed with methanol and stained with May-Grunwald- Giemsa (Gibco, Invitrogen Corporation, New York, USA) for 20 min, then the glass coverslips were permanently prepared with Entellan[®] (Merck, Darmstadt, Germany). The percentage of infected cells and the number of intracellular parasites were estimated by observing 200 cells with a light microscope (Olympus CX31), and the survival index (product of the percentage of cells infected and the number of amastigotes per cell) and EC₅₀ value (effective concentration) were determined. Benznidazole was used as reference drug.

Ultrastructural analysis.

Transmission electron microscopy.

Epimastigote forms of *T. cruzi* after treatment with 14.9 μM (IC₅₀) of Carboline C4, were harvested by centrifugation, washed in PBS and fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 for 1 h at 4° C. After, the cells were post-fixed in solution containing 1% OsO₄, 0.8 % potassium ferrocyanide, 10 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer at room temperature for 60 min, washed with 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in ethanol, and embedded in Epon[®] resine. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed in a Zeiss EM900 transmission electron microscopy.

Scanning electron microscopy

Epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* treated with Carboline C4 at IC₅₀/EC₅₀ values respectively, were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for 2 h at room temperature, washed three times in cacodylate buffer and adhered on poly-L-Lysine coated coverslips. Then, parasites were dehydrated in an ascending ethanol series, critical-point dried with CO₂, sputtering with gold, and observed in Shimadzu SS-550 scanning electron microscope.

Citotoxicity assay

The LLCMK₂ cells were seeded onto 96 well microplates at concentration of 2.5 x 10⁴ cells/mL and incubated for 24 h in DMEM supplemented with 10 % FBS. The monolayer obtained was treated with different concentration of β-carboline (25, 128, 256, 1282 μ M). DMSO was used as a negative control and Benznidazole (Rochagan[®], Roche pharmaceuticals Rio de Janeiro - Brazil) was used as reference drug. After incubation at 37° C with 5% CO₂ for 96 h the evaluation of cell growth was made by the sulforhodamine B technique.¹³ Then was calculated the CC₅₀ of the drug (concentration of drug that lysis 50% of cells).

Red blood cell lysis assay.

The potential haemolytic effect of β-carboline was evaluated in this assay. A 4% suspension of fresh defibrinated human blood was prepared in sterile 5% glucose solution. One of several concentrations (3, 13, 26, 126, 256, 1282 μ M) of the β- carboline compound was added to each test tube and gently mixed, and the tubes incubated at 37 °C. After 1 h of incubation, the visual reading was made, and after 2 h the samples were centrifuged at 1000 X g for 10 min. The absorbance of the supernatant was determined at 540 nm for estimation

of haemolysis. The results were expressed as percentage of haemolysis, by the equation $\text{Haemolysis: (\%)} = 100 - [(A_p - A_s)/(A_p - A_c) \times 100]$; where A_p , A_s and A_c are the absorbance of the positive control, test sample and negative control, respectively. Amphotericin B (Cristalia, São Paulo, Brazil) was used as the reference drug, Triton X-100 (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) was used as the positive control, and the cell suspension only was used as the negative control.

Statistical analyses:

Statistical analysis was performed with the program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Student's t test was applied and a p - value less than 0.05 was regarded as significant.

RESULTS

Synthesis

The *N*-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide (**4**) was synthesized through a Pictet-Spengler condensation¹⁰ of the L-tryptophan methyl ester (**2**) with 4-dimethylaminobenzaldehyde, followed by the reaction of the methyl tetrahydro- β -carboline-3-carboxylate (**3**) with butylamine. The physicals data of compounds **3** and **4** are shown in Materials and methods, and their structures in Figure 1.

The IR spectrum of compound **3** showed a band at 1733 cm⁻¹ attributed to the carbonyl group. The ¹H-NMR spectrum of **3** showed a triplet at δ 5.10 and a broad singlet at δ 5.27 relative to H-1 for the isomer *cis* and *trans*, respectively. The signals of the aromatic hydrogens at δ 6.64-7.54 and the signals at δ 3.78/3.69, corresponding to the methyl group, evidenced the formation of the methyl-1-(4-dimethylamino)phenyl- 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylate (**3**).

Compound **4** showed a band at 1651 cm⁻¹ in the IR spectrum, due the absorption of the carbonyl of amide. The ¹H-NMR spectrum of **4** showed signals in the region of the δ 0.91-2.76 attributed to the hydrogens of the N-butyl group of amide. The stereochemistry of *cis* and *trans* isomers was assigned on the basis of ¹³C-NMR values which were previously reported in literature.⁹

Effects of Carboline C4 on growth of epimastigote form

The β -carboline compounds showed good activity against the proliferation of epimastigote which is the form present in reduviid vector. Comparison of the 50% inhibition concentration values (IC₅₀ in μ M) for trypanocidal activity of twelve compounds synthesized showed that the compound bearing a 4-dimethylaminophenyl and an N-butylcarboxamide

groups in the 1- and 3-positions of the tetrahydro- β - carboline ring (compound **4**, Figure 1), respectively, showed the most active with IC_{50} of 14.9 μ M (Table 1).

The presence of the Carboline C4 in the culture of Y strain of epimastigotes led to a progressive parasite injury, compared with the untreated cells, and was observed a dose-dependent effect. At the time of 96 h of incubation, with 256 μ M of the compound, the highest concentration tested induced complete growth arrest. The IC_{50} and the IC_{90} values of Carboline C4 were 14.9 μ M \pm 6,5 μ M and 76.9 μ M \pm 13.2 μ M, respectively (Figure 2). IC_{50} to Benznidazole was 7.7 μ M \pm 2.9 μ M.

Effect of Carboline C4 on the viability of trypomastigote and amastigote forms

We evaluated the activity of β -carboline **4** on the viability of the trypomastigote and amastigote forms. A lytic activity with a dose-dependent trypanocidal effect was observed (Table 2). Against the trypomastigote form, in the presence of mouse blood, was observed a 50% effective concentration (EC_{50}) of 45 μ M \pm 3.9 μ M, at 37 °C after 24 h.

In the amastigote form, the highest concentration of the compound tested was 256 μ M and showed a good lytic effect at 37 °C. After 24 h of treatment, in the presence of mouse blood the effective concentration (EC_{50}) was 33 μ M \pm 5.6 μ M (Table 2). The effect of crystal violet over *T. cruzi* is well known, and against trypomastigote forms EC_{50} was 12.8 μ M \pm 2.6 μ M, and 6.7 μ M \pm 2.1 μ M against amastigote forms.

Effect of Carboline C4 on the intracellular amastigote in LLCMK₂ cell line.

The treatment of LLCMK₂ infected with amastigote forms showed that the compound had good activity, with a dose-dependent trypanocidal effect (Figure 4), leading to considerable reduction in both the percentage of infected cells and the mean of number of parasites per infected cells. After 96 h of incubation, the percentage of LLCMK₂ cells with

internalized parasites was higher for the control than for cells infected and treated with β -carboline **4** (Figure 5). At that time, the control showed a mean 31.9 amastigotes per cell and 72% of cells infected. Cells treated with 32 μ M showed a mean 4.9 internalized amastigotes, with 45% of cells infected. Treatment of the cells with 128 μ M resulted in only 11% infected cells and 2.1 parasites per cell. The effective concentration (EC_{50}) against intracellular amastigotes was 20.2 μ M \pm 3.5 μ M, meanwhile the EC^{50} value for Benznidazole was 26.1 μ M. C4 also showed a lower value of SI_{50} at 17.5 μ M (survival index of 50%) when compared with Benznidazole with SI_{50} at 28.7 μ M.

Ultrastructural effects

Transmission electron microscopy

Electron microscopy analysis of epimastigote forms treated with 14.9 μ M (IC_{50}) of β -carboline **4**, showed alterations of the typical morphology of the parasite, such as: swelling of the mitochondrion, diffuse kinetoplasts, electron lucent reservosomes, and appearance of vacuoles (Figure 6).

Scanning electron microscopy

Morphological alterations in epimastigote and trypomastigote forms treated with carboline C4 were visualized by scanning electron microscopy. In epimastigote, the $IC_{50/96\text{ h}}$ (14.9 μ M) caused largely distortions of the parasite cell body, like rounding and swelling of cell body, and a shortening of flagellum (Figure 7). In trypomastigote forms treated with EC_{50} (45 μ M) the alterations observed in cell body were the lost of the normal shape and a reduction in the size of the flagellum (Figure 7).

Cytotoxic effect of Carboline C4 on LLCMK₂ cells

This assay was made to evaluate the potential toxic effects of this drug on LLCMK₂ lineage, after 96 h of treatment (Figure 8a). The viability was checked by sulforhodamine assay in ELISA reader. The cells treated with 256 μ M led to 38.7% of cellular inhibition and with 128 μ M the cellular inhibition was 18.4%. Concentrations below 26 μ M no lytic effect was observed. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was 462 μ M $462 \mu M \pm 112.1 \mu M$ (Table 2). The cytotoxic effects for LLCMK₂ cells and activity against the parasite were compared by using the selectivity index (SI), ratio (CC₅₀ for LLCMK₂/IC₅₀ for parasite). The β -carboline compound was more selective against the parasite than the mammalian cells, with the SI of 31.

Haemolytic assay

In this experiment we evaluated the toxicity for human red-blood cells of β -carboline **4** incubated at 37 °C for 120 min (Figure 8b). β -carboline **4** at 14.9 μ M (IC₅₀) caused only 2.2% haemolysis, and at the highest concentration tested (1282 μ M) caused only 28% lysis, therefore, the HC₅₀ (haemolytic concentration that causes 50% of lysis) was not calculated. Amphotericin B showed a strong haemolytic effect, with 70% haemolysis at 14.9 μ M. Triton X-100 used as a positive control was considered 100% lysis, Benznidazole showed low levels of haemolysis, and 1% DMSO did not cause lysis (Table 2).

DISCUSSION

In the research of new trypanocidal compounds many sources have been chosen, like natural and synthetic products. Natural products or derivatives play an important role in the development of all types of drugs, and some natural compounds or extracts have been showed trypanocidal activity, like ethyl acetate fraction obtained from *Camellia sinensis*¹⁴, crude extract of *Annona crassiflora*¹⁵, neolignans isolated from leaves of *Piper regnellii*¹⁶, ethanolic extract from *Populus nigra*¹⁷, essential oils extracted from *Syzygium aromaticum*, *Achillea millefolium* and *Ocimum basilicum*.¹⁸ Besides of the natural products, some synthetic compounds have demonstrated activity against *T. cruzi*, as observed previously with bisphosphonate risedronate in epimastigote and intracellular amastigote forms¹⁹ and L-leucin methyl ester that inhibit the growth and caused ultrastructure alterations on *T. cruzi*.²⁰ In addition, β -lapachones-derived naphthoimidazole and reversed diamidines presented trypanocidal effect.^{21,22}

Some drugs used for the treatment of diseases caused by other microorganisms, like fungal diseases, have been tested against *T. cruzi*. The azoles derivatives demonstrated good activity *in vitro* and *in vivo* on this protozoa.²³ Other derived synthetic compounds have demonstrated trypanocidal activity *in vivo*, like the phenyl-substituted analogue of furamide DB569.²⁴ In addition, some synthetic compounds like lysophospholipid analogue showed anti-proliferative synergy with ketoconazole, against *T. cruzi*.²⁵

Although carbolines are widespread in nature and have been isolated from many sources only a few reports about trypanocidal activity have been made. Some earlier papers have reported antimicrobial, antiproliferative, insecticidal, and parasiticidal activity with carbolines.⁷ The results obtained in this work (table 2) showed that treatment of epimastigotes with chemically modified Carboline C4 during 7 days resulted in growth inhibition dose-

dependent and at 24 h the compound already showed significant inhibitory effect at 256 μ M ($p < 0.05$). After 96 h, concentrations above 26 μ M showed antiproliferative activity significant when compared with the control growth ($p < 0.01$), and with 256 μ M occurred complete growth arrest. Transmission electronic microscopy analysis of epimastigotes treated with IC_{50} of Carboline C4 demonstrated swelling of mitochondrion, presence of vacuoles and a kinetoplast diffuse, while the cytoplasmic membrane remained preserved. These alterations were also found in *T. cruzi* treated with other synthetic compounds such as risedronato, which mitochondrial swelling was among the most prominent ultrastructural alterations seen in both epimastigote and amastigote forms.¹⁹ Additionally, Scanning electronic microscopy study showed that epimastigote treated with C4 presented some distortions on the surface of the parasite, like rounding and swelling of the cell body, and a reduction in the size of the flagellum as compared to control cells, but plasma membrane and subpellicular microtubules it seems that were preserved. These alterations are similar with previous reports, like caused by essential oil of *Syzygium aromaticum*¹⁷ and eupomatenoid-5 isolated from *iper regnellii*.²⁶ The carboline compound showed activity against trypomastigote form causing very damage and large lytic effects. The compound was more active when the parasites were incubated at 37 °C, after 24 h in concentrations above 16 μ M which presented significant activity when compared with the control test ($p < 0.01$). When observed in SEM the cell surface was altered and the cells showed a short flagellum. In free amastigotes was observed a seemed situation which the drug was more active at 37 °C, all concentrations presented significant activity compared with control test ($p < 0.01$).

Besides, against the clinically relevant form (intracellular amastigote) was observed a huge reduction in the number of infected cells as well as in the number of intracellular amastigotes. The drug was able to penetrate in the host cell and act in confined parasite, and not show deleterious effects on host cells.

Cytotoxicity assays were made and it was demonstrated that C4 carboline was 31 more toxic

for parasite than LLCMK₂ lineage. In haemolytical assay C4 carboline show only 28% of haemolysis at 1282 μ M (a concentration 72 times greater than the IC₅₀ for epimastigotes). The endogenous occurrence of some β -carbolines in man suggests the presence of biosynthetic and metabolic pathways for these compounds, which could be advantageous to drug metabolization and to reduce their toxic.⁴

Although the action mechanism of carbolines compounds is unknown, recent reports have been made about significant activity as anticancer agent, and there are evidences that such compounds can intercalate DNA. It can be envisaged that the β -carboline ring system, having a planar aromatic structure, could stack in the base pairs of DNA and such intercalation could contribute to the biological activity.²⁷ Other reports have showed that high concentration of β -carboline was able to induce apoptosis *in vitro* tests.²⁸ Furthermore, inhibition of respiratory chain seems to be important action mechanism of the majority of the β -carbolines studied in Tulahuén strain of *T. cruzi*.⁴

The present data showed the potential effect of the carbolines compounds, especially C4 against the three forms of *T. cruzi*, which supports further screening of new analogs, and more *in vitro* and *in vivo* studies of this drug. These studies are necessary to increase our understanding of the action mechanism of this drug and the possibility to be used alone or in combination with other drugs for a future treatment of Chagas disease.

REFERENCES

1. WHO-World Health Organization. Control of Chagas disease. *Technical reports series* 2002; **905**: 1-109.
2. Maya JD, Cassels BK, Vasquez PI *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol* 2006; **Part A**: 1-20.
3. Coura JR, De castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; **97**: 3-24.
4. Rivas P, Cassels BK, Morello A *et al.* Effects of some β -caroline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Bio Physiology* 1999; **122**: 27-31.
5. Bernacchi AS, Cazzulo BF, Castro AH *et al.* Trypanocidal action of 2,4-dichloro-6-phenylphenoxyethyl diethylamine (Lilly 18947) on *Trypanosoma cruzi*. *Acta Pharm Sinica* 2002; **23**: 399-404.
6. Croft SL, Barret MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2005; **21**: 509-12.
7. Cao R, Chen H, Peng W *et al.* Design, synthesis and in vivo antitumor activities of novel beta-carboline derivatives. *Eur J Med Chem* 2005; **40**: 991-1001.
8. Calvin J, Krassner S, Rodriguez E. Plant derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol* 1987; **19**: 89-94.
9. Dusman LT, Bocca CC, Basso EA *et al.* Conformational and NBO analysis on cis and trans isomers of methyl-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-9H- β -carboline-3-carboxylate. *J Molec Struct* 2005; **754**: 45-50.
10. Bailey PD, Hollinshead SP, McLay NR. Exceptional stereochemical control in the Pictet-Spengler reaction. *Tetrahedron Lett* 1987; **28**: 5177-80.

11. Coutts R T, Micetich R G, Baker G B *et al.* Some 3-carboxamides of β -carboline and tetrahydro β -carboline. *J. Heterocycles* 1984; **22**: 22-131.
12. Brener Z. Therapeutic activity criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1962; **4**: 386-96.
13. Skehan P, Storeng R, Scudeiro D *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Nat Cancer Inst* 1990; **82**: 1107-12.
14. Paveto C, Guida M C, Esteva M I *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 69-74.
15. Mesquita M L, Desrivot J, Bories C *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; **100**: 783-7.
16. Luize P S, Nakamura-Ueda T, Dias-Filho B P *et al.* Activity of Neoligans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. Var. *pallescens* (C.DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. *Biol Pharm Bull* 2006a; **10**: 2126-30.
17. Dantas A P, Salomão K, Barbosa H S *et al.* The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Mem Inst Oswaldo cruz* 2006; **101**: 207-11.
18. Santoro G F, Cardoso M G, Guimarães L G L *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzigium aromaticum* L., *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol* 2007; **116**: 283- 90.
19. Garzoni L R, Caldera A, Meirelles M N L *et al.* Selective *in vitro* effects of the farnesyl pyrophosphatase synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Inter J Antimicrob Agents* 2004; **23**: 273-85.
20. Adade C M, Figueiredo R C B Q, De Castro S L *et al.* Effect of L-leucine methyl ester on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2007; **101**: 69-79.

21. Menna-Barreto R F S, Henrique-Pons A, Pinto A V *et al.* Effect of a β -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *J Antimicrob Chemoter* 2005; **56**: 1034-41.
22. Silva C F, Batista M M, Mota R A *et al.* Activity of reversed diamidines against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Biochem Pharm* 2007; **73**: 1939-46.
23. Urbina J A, Lira R, Visbal G *et al.* In Vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemoter* 2000; **44**: 2498- 502.
24. De souza E M, Lansiaux A, Bailly C *et al.* Phenyl substitution of furamidine markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *Biochem Pharmacol* 2004; **68**: 593-600.
25. Santa-Rita R M, Lira R, Barbosa H S *et al.* Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemoter* 2005; **55**: 780-4.
26. Luize P S, Nakamura-Ueda T, Dias-Filho B P *et al.* Ultrastructural alterations induced by the neoligands dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2006b; **100**: 31-7.
27. Boursereau Y, Coldham I. Synthesis and biological studies of 1-amino β -carbolines. *Biorg & Med Chem Lett* 2004; **14**: 5841-4.
28. Hans G, Malgrange B, Lallemand F *et al.* β -Carbolines induce apoptosis in cultured cerebellar granule neurons via the mitochondrial pathway. *Neuropharmacol* 2005; **48**: 105-117.

Table 1. General structure for carbolines and its IC₅₀ (μM) values for 1-substituted- 1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxamides (**4-15**) against *T. cruzi* epimastigotes.

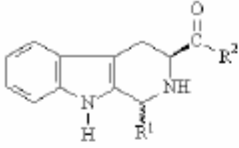
























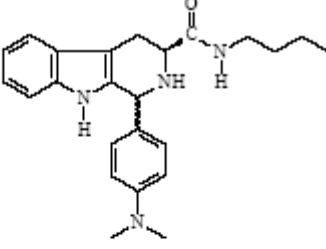
	R ₁	R ₂	Isomer	IC ₅₀
4			<i>cis+trans</i>	14.9
5			<i>trans</i>	>100
6			<i>trans</i>	79.6
7			<i>cis+trans</i>	33.9
8			<i>cis</i>	49.6
9			<i>cis</i>	>100
10			<i>cis</i>	>100
11			<i>cis</i>	>100
12			<i>cis+trans</i>	24.4
13			<i>cis+trans</i>	>100
14			<i>cis</i>	28.1
15			<i>trans</i>	>100

Table 2. Effects of C4 on *Trypanosoma cruzi* (Y Strain) and toxic effects on different mammalian cells.

Formule	
IC₅₀	14.9 ± 6.5
EC_{50a}	45 ± 3.9
EC_{50b}	33 ± 5.6
EC_{50c}	20.2 ± 3.5
CC₅₀	462 ± 112.1
HC₅₀	>1.282

The values (μM) of IC₅₀ represent the 50% concentration inhibition against epimastigote forms (28 °C), EC_{50a} the 50% effective concentration on trypomastigote forms (37 °C), EC_{50b} 50% effective concentration on amastigote forms (37 °C), EC_{50c} 50% effective concentration on mammalian cell-parasite interaction, CC₅₀ refers to 50% cytotoxic concentration on LLCMK₂ (37 °C) and HC₅₀ refers to 50% haemolytic concentration of red blood cells (37 °C).

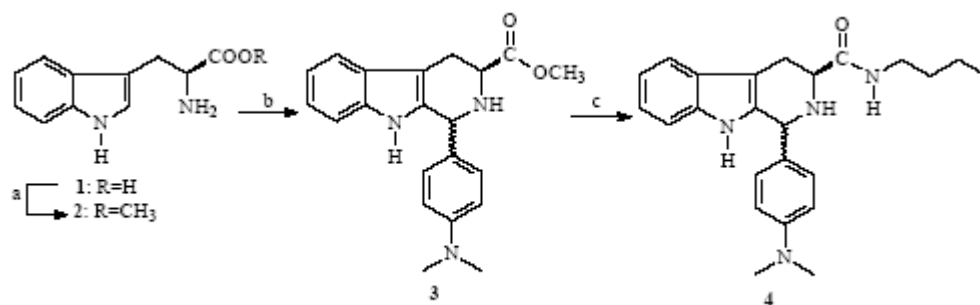


Figure 1: General procedure for the synthesis of N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxamide (**4**). Reagents and conditions: a) H₃COH, H₂SO₄, reflux, 12 h; b) 4-dimethylaminobenzaldehyde, CH₂Cl₂, molecular sieves, TFA (trace), 0 °C, 24 h, TFA (2.0 mol eq.), rt, 6 h; c) butylamine, reflux, 24 h.

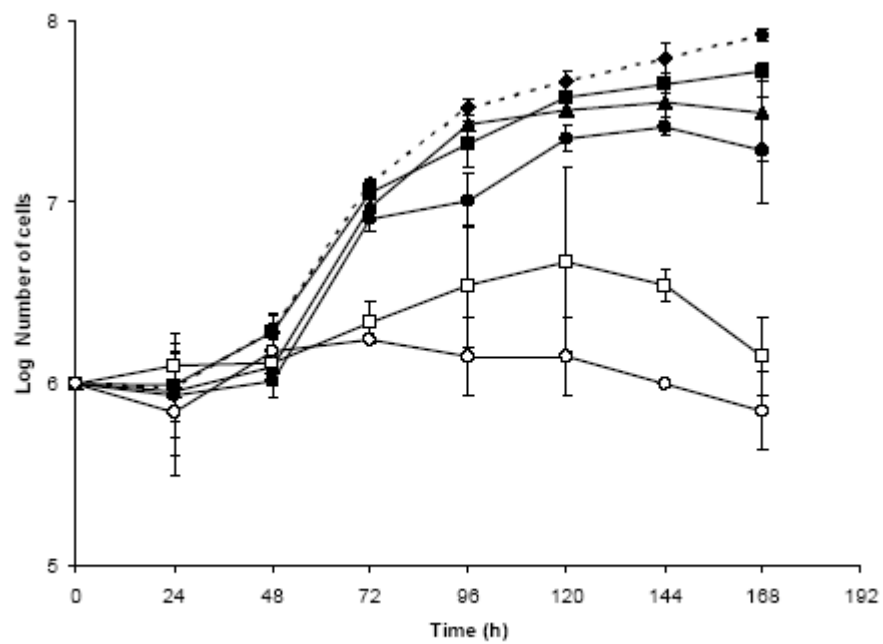


Figure 2: Effects of Carboline C4 on the proliferation of epimastigote of *Trypanosoma cruzi*. Parasites were cultivated in LIT medium at 28 °C as described in Materials and Methods. A initial cell density was 1×10^6 epimastigotes/mL. . Control ; 3 μM ; 13 μM ▲; 26 μM ; 128 μM ; 256 μM . Values are the means from three independent experiments.

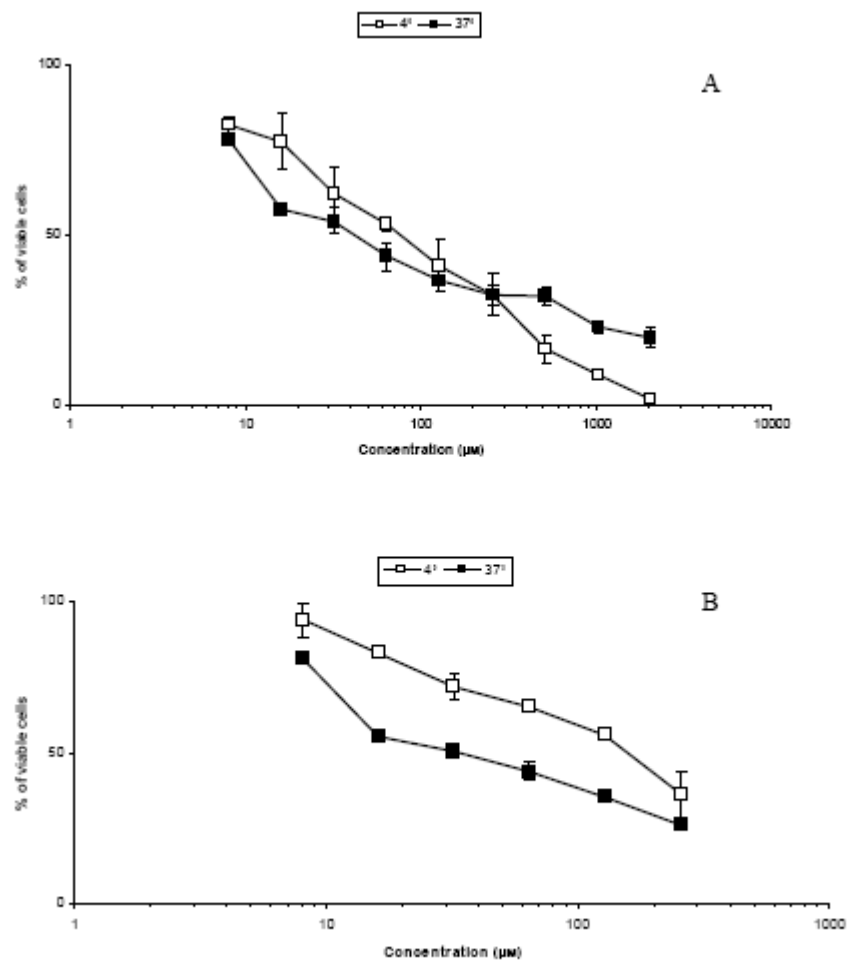


Figure 3: Effect of Carboline C4 on viability of trypomastigote form (A) and amastigote form (B) of *Trypanosoma cruzi*, after 24 h of treatment at 4°C ; 37°C

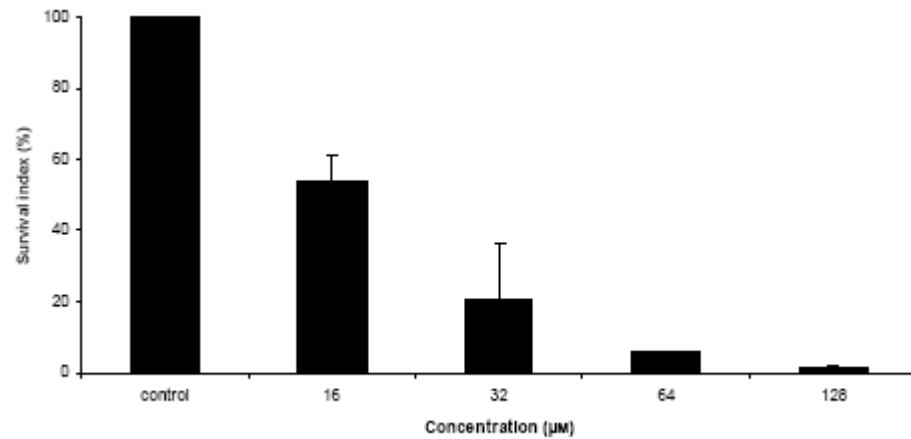


Figure 4: Effect of Carboline C4 on *Trypanosoma cruzi* – LLCMK₂ cell interaction. LLCMK₂ cells were infected with trypomastigote forms, after 24 h treated with 16, 32, 64 and 128 µ M, After 96 h the SI (survival index in percent) was calculated by the equation $(P2/P1) \times 100$, where P1 is the SI for the control and P2 is the SI for treated cells . SI was calculated by multiplying the percentage of LLCMK₂ cells with internalized parasites and the mean number of internalized parasites per cell. The data correspond to the average of three different experiments.

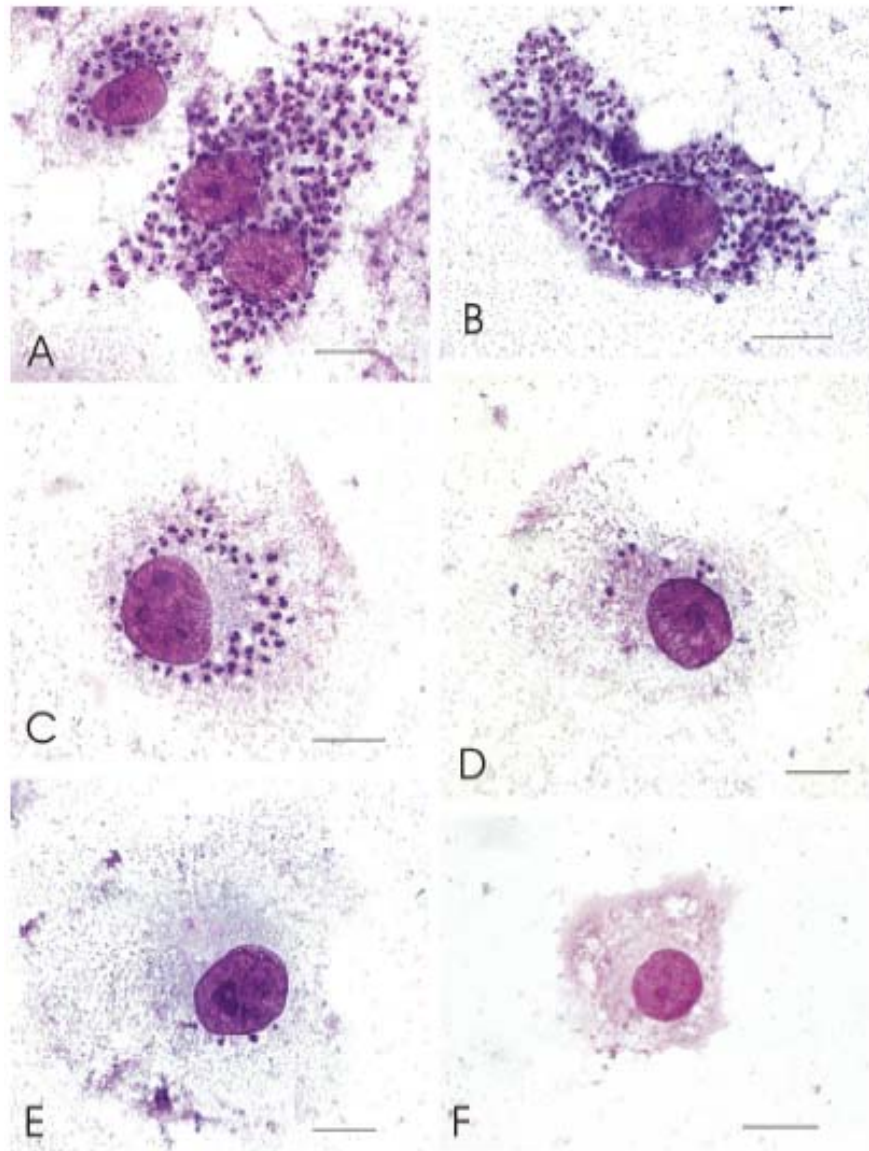


Figure 5: Light microscopy of intra-cellular amastigotes and interaction with LLCMK₂ cells treated with Carboline C4 during 96 h. (**A** and **B**) untreated cells, (**C**) cells treated with 18 μ M; (**D**), cells treated with 32 μ M; (**E**), cells treated with 64 μ M; and (**F**) cells treated with 128 μ M; Bars = 10 μ m

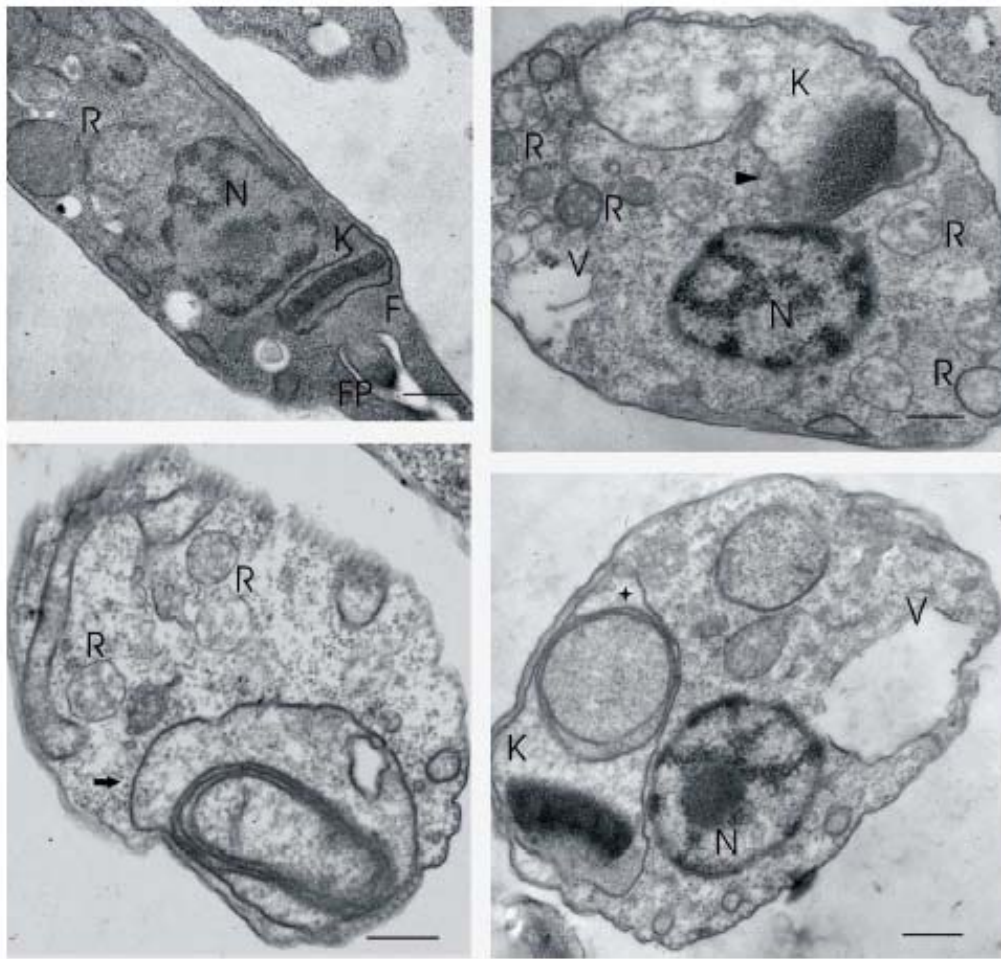


Figure 6: Transmission electron microscopy of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (Y strain) treated with β -carboline **4** for 96 h. (A) Control parasite showing characteristic organelles: the kinetoplast (K), nucleus (N), reservosome (R) and flagellar pocket (FP). (B, C, D) epimastigotes treated with β -carboline **4** at 14.9 μ M. (B) a diffuse kinetoplast (arrowhead), with a vacuole present in cytoplasm (V) and altered reservosomes (R). (C) an altered mitochondrion (arrow). (D) a large vacuole (V) and a coiled mitochondrion with interruption in mitochondrial membrane (star). Bars = 1 μ m.

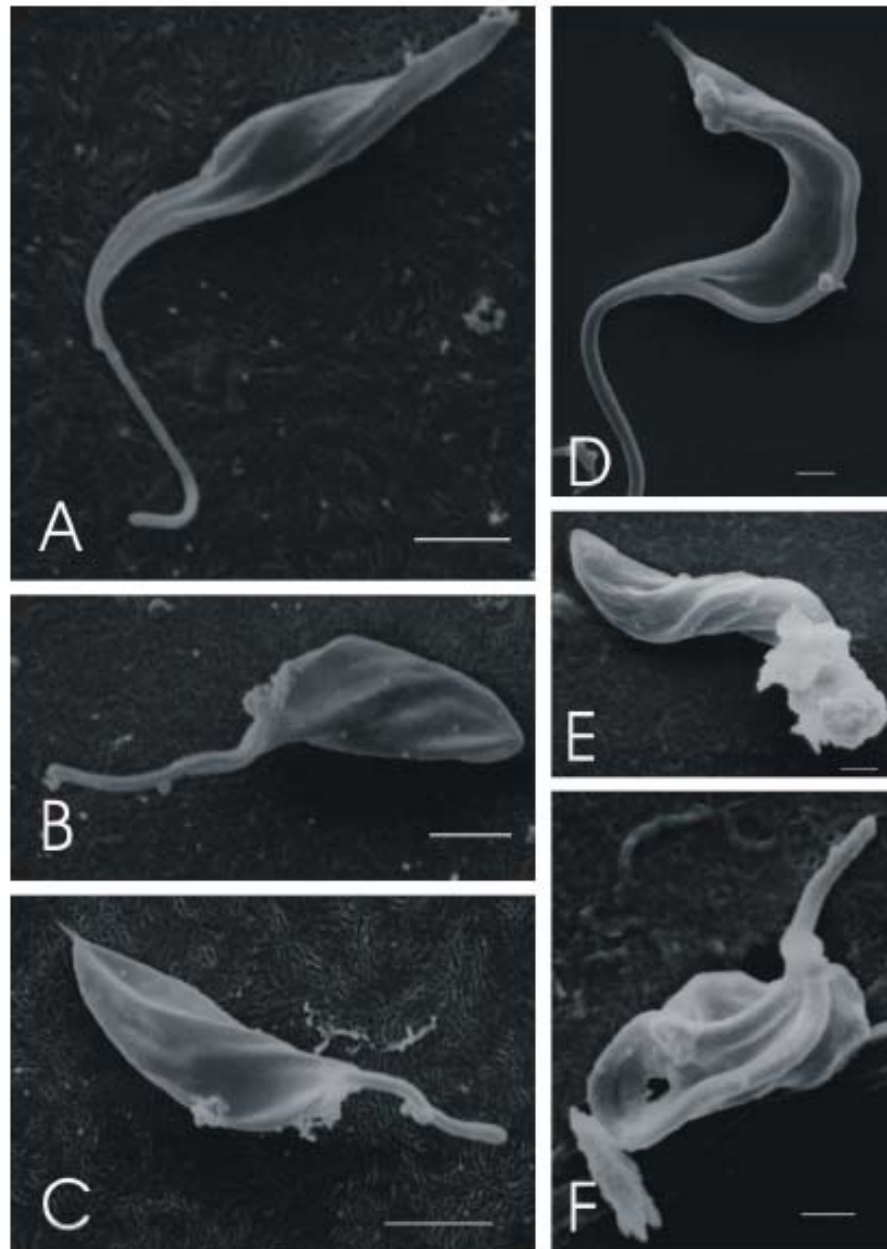


Figure 7: Scanning Electron microscopy of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (**A**, **B**, **C**) and trypomastigotes (**D**, **E**, **F**) treated with Carboline C4, 96h and 24h respectively. Control parasites (**A**, **D**) showing respectively the typical elongated body with terminal flagellum. (**B**) and (**C**) epimastigotes treated with $14.9 \mu\text{M}$ presenting rounding cell body, small flagellum. (**E**) and (**F**) trypomastigotes treated with $45 \mu\text{M}$ in which it is observed a distortion in cell body, size reduction and what seems to be the loss of intracellular material (**E**). (**A**, **B**, **C**) Bar = $2 \mu\text{m}$. (**D**, **E**, **F**) Bar = $1 \mu\text{m}$.

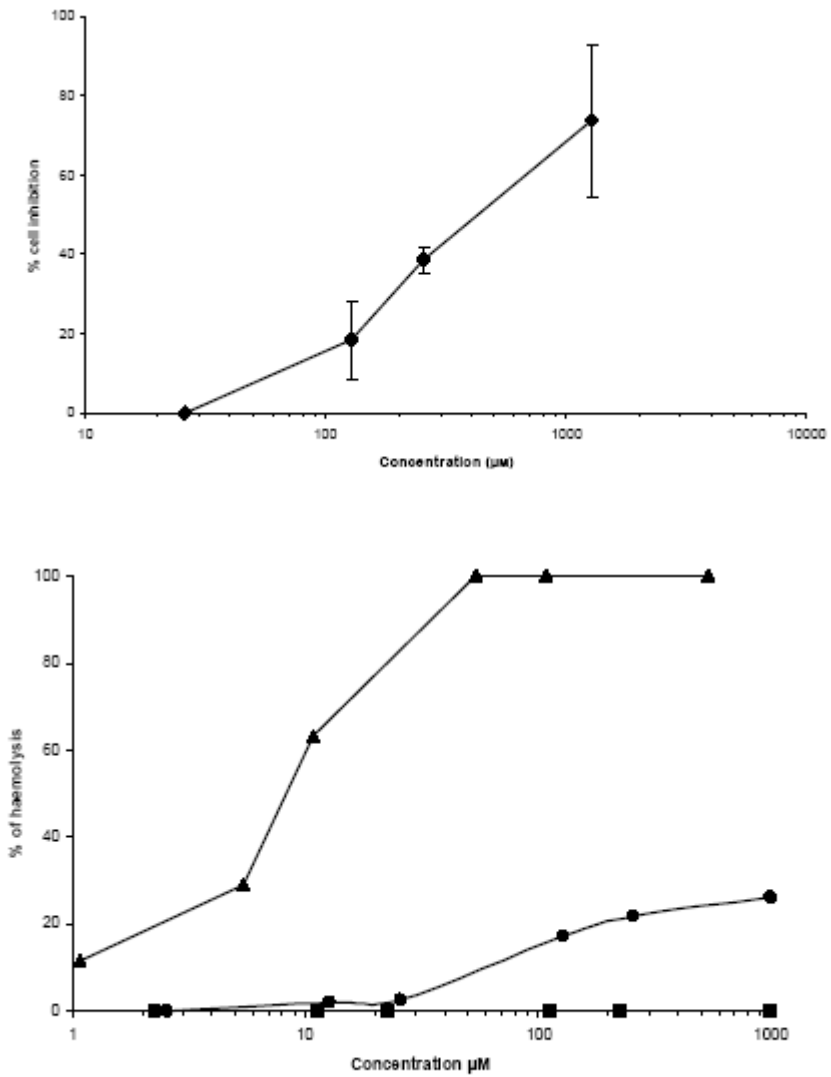


Figure 8: Toxic effects of Carboline C4 against LLCMK₂ cells (A) and human red cells (B). The cytotoxicity (A) was evaluated after 96 h of cells treatment at 37 °C. Expressed in % of inhibition. The percent of haemolysis (B) of the Amphotericin B ▲; Carboline C4 ●; Benznidazole ■; was measured after 2 h of incubation at 37 °C.

CONCLUSÕES

Diversas substâncias isoladas das mais variadas fontes têm demonstrado alguma atividade biológica sobre *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Porém até o presente momento nenhuma se mostrou totalmente eficaz para ser utilizada nas diferentes fases da doença, e as únicas liberadas pelos órgãos reguladores de medicamentos apresentam inúmeros efeitos colaterais e são eficazes somente no início das doenças. Além destes fatores a não existência de imunobiológicos para a prevenção da doença é um agravante a mais desta situação.

Em função disto é imperativo que novos medicamentos sejam descobertos e todo esforço na pesquisa e desenvolvimento destes é justificado. Neste contexto, os compostos carbolínicos surgem como uma alternativa promissora de compostos bioativos. No presente trabalho foi demonstrado o potencial destes compostos como agentes tripanocidas, uma vez que apresentaram atividade antiproliferativa sobre formas epimastigotas, em especial o **C4**, que inibiu 50 % dos protozoários (IC₅₀) na concentração de 14,9 µ M. Este composto apresentou também boa atividade sobre as formas tripomastigota e amastigota inclusive na sua forma intracelular em que o **C4** foi capaz de agir sobre o parasita interiorizado apresentando uma dose dependência. Adicionalmente este composto se mostrou seletivo uma vez que apresentou uma citotoxicidade baixa, tanto em células epiteliais como sanguíneas com um índice de seletividade de 31 vezes mais tóxico para o parasita do que as células de mamífero.

Pode-se considerar que os resultados obtidos no presente trabalho ajudam a enriquecer o conhecimento da biologia e da terapêutica do *T. cruzi* e doença de Chagas, respectivamente. Ademais disso o período dedicado a realização dos diversos experimentos descritos acima, serviu para aprimorar técnicas e melhorar o conhecimento teórico e prático em relação ao tema.

Somado a isso estes resultados podem ser considerados animadores e incentivam novas pesquisas e análises destes compostos carbolínicos, aprofundando os experimentos *in vitro* a fim de compreender seu modo de ação bem como avaliar sua ação *in vivo* sobre modelos animais.