

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de alcaloides de Amaryllidaceae e análogos de poliaminas: análise química, semi-síntese e investigação do mecanismo de ação

RAQUEL BRANDT GIORDANI

Orientador: Prof. Dr. José Angelo Zuanazzi

Co-Orientador: Profa. Dr. Tiana Tasca

PORTO ALEGRE, 2010.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de alcaloides de Amaryllidaceae e análogos de poliaminas: análise química, semi-síntese e investigação do mecanismo de ação

Tese apresentada por **Raquel Brandt Giordani** para
obtenção do GRAU DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Angelo Zuanazzi

Co-Orientador: Profa. Dr. Tiana Tasca

Porto Alegre, 2010.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 11.08.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa Dr. Amélia T. Henriques
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa Dr. Carla Denise Bonan
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa Dr. Marilise B. Rott
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

G497a Giordani, Raquel Brandt
Atividade anti-trichomonas vaginalis de alcalóides de amaryllidaceae e análogos de poliaminas: análise química, semi-síntese e investigação do mecanismo de ação / Raquel Brandt Giordani. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xviii, 226 p.

Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Trichomonas vaginalis. 2. Amaryllidaceae. 3. Alcalóides. 4. Poliaminas. I. Zuanazzi, José Angelo Silveira. II. Tasca, Tiana. III. Título.

CDU: 547.94:582.572.4

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Farmacognosia e de Pesquisa em Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os procedimentos envolvendo química orgânica foram desenvolvidos no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Durante todo o trabalho foi recebida bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de doutorado que possibilitou minha dedicação exclusiva a este trabalho e à UFRGS, especialmente à Faculdade de Farmácia onde aprendi tudo que sei e da qual me orgulho em fazer parte.

Ao Prof. Dr. José Angelo Zuanazzi, por tudo que aprendi durante esse ciclo de conhecimento que começou há 7 anos, quando ingressei na iniciação científica, e culmina com essa tese. Obrigada pela amizade, pelas oportunidades e por sempre acreditar em mim.

À Prof^a. Dr. Tiana Tasca, quem eu admiro muito e para mim é um exemplo de professora, pesquisadora e ser humano. Obrigada pelas oportunidades, por acreditar junto comigo em objetivos que pareciam tão distantes e que hoje, em sua maioria, foram atingidos. Obrigada pela amizade construída nesses 3 anos e pelo muito que aprendi.

Ao Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida, por permitir minha estada em seu laboratório na UFJF, pela parceria e pelo aprendizado.

A todos os colaboradores desta tese: Prof. Dr. Geraldo Attilio De Carli, Prof. Dr. Jaume Bastida, Prof. Dr. Maurício Reis Bogo, Prof^a. Dr. Cristina Bonorino, Prof. Dr. Hugo Verli, Denis Brook Rosemberg e Jean Paulo de Andrade.

A todos os co-autores das publicações relacionadas a esta tese, pela dedicação e parceria. Muito obrigada.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, especialmente à Moema, pela ajuda e paciência nos procedimentos.

Ao Laboratório de Farmacognosia, Prof^a. Dr. Amélia Henriques, Prof^a. Dr. Miriam Apel e a todos os colegas. Obrigada pela amizade construída durante muitos anos e pela troca de conhecimentos. Especialmente agradeço: Carolina, Eduardo, Leandro e Marina.

Ao Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e à Júlia. Às colegas, obrigada pela bonita amizade que construímos, pelo companheirismo, paciência e auxílio nos longos experimentos. Especialmente agradeço à Patrícia e à Marina que desde o primeiro dia, com paciência e amizade, me ensinaram a trabalhar com parasitos.

Ao Laboratório de Síntese Orgânica da UFJF, a todos os colegas que me acolheram com muita amizade e tanto me ensinaram.

A todos os professores da Faculdade de Farmácia da UFRGS que participaram da construção da minha vida acadêmica e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Muito obrigada.

À minha família, aos amigos e especialmente ao Marcelo pelo incentivo constante, pela compreensão na ausência e pelo conforto nos momentos difíceis. Obrigada.

RESUMO

A família Amaryllidaceae é reconhecida como fonte de compostos bioativos, sendo o isolamento e elucidação estrutural de seus alcaloides, aliado às avaliações farmacológicas, um tema importante. Estudos mostram que o mecanismo de ação da citotoxicidade desses alcaloides é seletivo e depende da linhagem celular. *Trichomonas vaginalis* é um protozoário parasita que causa a tricomonose, a doença sexualmente transmissível de origem não viral mais comum no mundo. Além de ser considerado um importante organismo patogênico, suas características bioquímicas peculiares, como a ausência de mitocôndrias, torna o tricomonas um adequado modelo para estudos de vias metabólicas de morte celular. A atividade anti-*T. vaginalis* dos alcaloides de Amaryllidaceae licorina e candimina, assim como o potencial citotóxico de diaminas sintéticas, foram investigados. Estudos de semi-síntese com a licorina também foram desenvolvidos. Nossos resultados mostraram que a licorina e candimina induzem importantes alterações na ultraestrutura dos parasitos e nenhum marcador morfológico clássico de apoptose, como corpos apoptóticos, foi observado. Além disso, nem a fragmentação do DNA genômico nem a exposição de resíduos de fosfatidilserina foram detectadas. Por outro lado, ambos os alcaloides atrasaram o ciclo celular do parasito e inibiram a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, importantes na manutenção da relação parasito/hospedeiro. O alcaloide pró-apoptótico licorina e a candimina induziram morte celular no parasito amitocondriado *T. vaginalis* por um mecanismo de ação que não cumpre as características morfológicas de apoptose. Entretanto, similaridades com a morte celular denominada paraptose foram observadas: intensa vacuolização citoplasmática periférica aliada à integridade nuclear. Considerando que a citotoxicidade dos alcaloides pode ser considerada moderada (250 µM), derivados de poliaminas foram escolhidos para desenvolver estudos de semi-síntese com a licorina e aperfeiçoar a atividade do alcaloide. Poliaminas são moléculas catiônicas de estruturas simples, essenciais para a diferenciação celular e regulação do ciclo celular. Neste trabalho demonstrou-se a síntese e avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* de uma série de derivados de diaminas, dos quais *N*-hexadecil-1,4-butanodiamina apresentou CIM igual a 2,5 µg/ml, duas vezes mais ativo em comparação ao metronidazol, utilizado

como composto de referência. A hibridização molecular da licorina com as diaminas foi prejudicada pela instabilidade da licorina mesilada, intermediário chave para prosseguir a rota sintética. No entanto, seis derivados inéditos da licorina, todos ésteres, aromáticos ou alifáticos, foram sintetizados.

Palavras-chave: Amaryllidaceae, alcaloides, licorina, candimina, *Trichomonas vaginalis*, poliaminas.

ABSTRACT

Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the Amaryllidaceae alkaloids and polyamine analogs: chemistry, semi-synthesis and mechanism of action

Amaryllidaceae family has proven to be plentiful sources for therapeutic agents. Hence, the isolation, biology and chemistry of the Amaryllidaceae alkaloids make an important subject. Investigations on cytotoxic mechanisms of these alkaloids indicate a promising selective cell-type-dependent cytotoxicity. *Trichomonas vaginalis* is a parasite that causes trichomonosis, the number one non-viral sexually-transmitted disease in the world. However, whilst *T. vaginalis* is a prime pathogenic target, its lack of mitochondria makes it a suitable biochemical model to study cell death-related mechanisms. Anti-*T. vaginalis* activity of lycorine and candimine alkaloids were investigated, as well as the cytotoxic potential of diamine analogs. Finally, studies on lycorine semi-synthesis were developed. Our results showed that, after lycorine and candimine treatment, no hallmark suggestive of apoptosis were observed, such as apoptotic bodies, but instead several important ultrastructural alterations, assessed by electronic microscopy. Additionally, DNA fragmentation and membrane phosphatidylserine exposure were not detected. Analysis showed that lycorine and candimine arrested *T. vaginalis* cell cycle and inhibited the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities, important enzymes on parasite/host relationship. The proapoptotic alkaloid, lycorine, and the lactone alkaloid, candimine, caused cell death in the amitochondriate *T. vaginalis* by a mechanism of action that fails to completely fulfill the criteria for apoptosis. However, some similarities were observed to paraptotic cell death, like intense cytoplasmic periferic vacuolization and nuclear integrity. Since the cytotoxic potential of the alkaloids was moderated (250 μ M), the polyamines analogs were chosen to investigate the anti-*T. vaginalis* activity and to develop semi-synthesis studies with lycorine in order to improve the alkaloid cytotoxicity. Polyamines are simple structured aliphatic amines essential for cell proliferation and differentiation and it has been shown that interfering with their function or biosynthesis the cellular growth can be blocked. Our results showed the synthesis of a series of diamine derivatives, and *N*-hexadecil-1,4-butanediamine was

found to be the most active compound *in vitro* against *T. vaginalis* with MIC of 2.5 µg/mL, twice more active in comparison to the reference drug metronidazole. The molecular hybridization of lycorine with diamines was impaired by the unsuccessful synthesis of the lycorine mesilate, a key intermediary on the synthetic route. However, six new lycorine ester derivatives were synthesized.

Keywords: Amaryllidaceae, alkaloids, lycorine, candimine, *Trichomonas vaginalis*, polyamine.

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

| | |
|--|----|
| Figura 1. Biossíntese dos alcaloides de Amaryllidaceae..... | 7 |
| Figura 2. Características morfológicas de <i>T. vaginalis</i> | 14 |
| Figura 3. Classificação dos tipos de morte celular | 16 |
| Figura 4. Topografia de membrana das E-NTPDases e da ecto-5'-nucleotidase | 24 |
| Figura 5. Estruturas da putrescina, espermina e espermidina | 27 |

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Figure 1. Chemical structures of compounds 1-8 | 49 |
| Figure 2. The most stable candimine (2) conformer | 50 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| Figure 1. Cytotoxic effect of lycorine on <i>T. vaginalis</i> trophozoites, as demonstrated by the dose-response curve and kinetic parameters | 78 |
| Figure 2. Effect of lycorine (250 µM) on the <i>T. vaginalis</i> kinetic growth curve | 79 |
| Figure 3. Lycorine arrests the cell cycle of <i>T. vaginalis</i> | 80 |
| Figure 4. 24h-lycorine treated <i>T. vaginalis</i> were inoculated with fresh medium without alkaloid | 81 |
| Figure 5. Scanning electron microscopy (SEM) of <i>T. vaginalis</i> after 6h and after 24h of lycorine treatment..... | 82 |
| Figure 6. Transmission electron microscopy (TEM) of <i>T. vaginalis</i> after lycorine treatment (250 µM; 6h) | 83 |
| Figure 7. Transmission electron microscopy (TEM) of <i>T. vaginalis</i> observed after lycorine treatment (250 µM; 24h)..... | 84 |
| Figure 8. Annexin V binding..... | 85 |
| Figure 9. DNA fragmentation assay demonstrated no differences in 6h and 24h-treated trophozoites and control | 86 |

CAPÍTULO 3

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Cytotoxicity of the candimine is demonstrated by a reduction on <i>T. vaginalis</i> viable trophozoites number | 106 |
| Figure 2. Kinetic growth curve profile of the candimine-treated <i>T. vaginalis</i> trophozoites (250 µM) | 107 |
| Figure 3. 12h-candimine treated <i>T. vaginalis</i> were inoculated with fresh medium without alkaloid | 108 |
| Figure 4. Scanning electron microscopy (SEM) of <i>T. vaginalis</i> after 6 h and after 24 h of candimine treatment | 109 |

| | |
|---|-----|
| Figure 5. Transmission electron microscopy (TEM) of <i>T. vaginalis</i> after candimine treatment (250 μ M; 6 h) | 110 |
| Figure 6. Transmission electron microscopy (TEM) of <i>T. vaginalis</i> after candimine treatment (250 μ M; 24 h) | 111 |
| Figure 7. Analysis of the cellular granularity by flow cytometry after (A) 6 h and (B) 24h-candimine treated trophozoites | 112 |
| Figure 8. Analysis of the cellular size by flow cytometry after (A) 6 h and (B) 24h-candimine treated trophozoites..... | 113 |
| Figure 9. Annexin V binding..... | 114 |
| Figure 10. DNA fragmentation assay demonstrated no differences in 6 h and 24h-treated trophozoites | 115 |
| Figure 11. Candimine arrest the cell cycle of the <i>T. vaginalis</i> | 116 |
| CAPÍTULO 4 | |
| Figure 1. <i>T. vaginalis</i> NTPDase and ecto-5'-ectonucleotidase activities <i>versus</i> alkaloid concentration | 121 |
| Figure 2. Effect of lycorine and candimine on ATP, ADP and AMP hydrolysis in <i>T. vaginalis</i> grown in a clean medium..... | 122 |
| Figure 3. Gene expression patterns for NTPDase A and B after lycorine and candimine treatments in <i>T. vaginalis</i> | 123 |
| CAPÍTULO 5 | |
| Figure 1. Chemical structures of the main polyamines of <i>Trichomonas vaginalis</i> metabolism, putrescine, spermine and spermidine, and of compounds 1-5 | 128 |
| Scheme 1. Synthesis of compounds 1-6 | 129 |
| Figure 2. Cytotoxicity of metronidazole and <i>N</i> -dodecyl-1,4-bis(2-aminoethyl)amine (1) against <i>T. vaginalis</i> | 130 |
| CAPÍTULO 6 | |
| Scheme 1. Synthesis of compounds 1-10 | 144 |
| Figure 1. Anti- <i>G. lamblia</i> and anti- <i>T. vaginalis</i> activity of diamine derivatives | 146 |
| CAPÍTULO 7 | |
| Figura 1. Esquema proposto para semi-síntese dos derivados da licorina..... | 150 |
| Figura 2. Esquema representativo das reações de mesilação, tosilacão, formação da azida, iodacão e hidrogenacão da licorina..... | 153 |
| Figura 3. Ésteres derivados obtidos por semi-síntese da licorina | 156 |
| III. DISCUSSÃO GERAL | |
| Figura 6. Cromatograma representando os metabólitos da licorina e candimina após incubacão com <i>T. vaginalis</i> | 177 |

ÍNDICE DE TABELAS

I. INTRODUÇÃO

| | |
|--|---|
| Tabela 1. Atividade citotóxica da licorina..... | 9 |
|--|---|

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Table 1. ¹ H NMR, ¹³ C NMR, COSY and NOESY data for 2 α ,7-dimethoxyhomolycorine (1) | 46 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Table 2. ¹ H NMR, ¹³ C NMR, COSY and NOESY data for candimine (2) | 47 |
|---|----|

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| Table 1. Comparison between the mechanism of action of lycorine against mitochondriated and amitochondriated cells..... | 72 |
|--|----|

CAPÍTULO 4

| | |
|--|-----|
| Table 1. PCR primer design..... | 121 |
|--|-----|

CAPÍTULO 5

| | |
|---|-----|
| Table 1. Cytotoxicity of compounds 1-5 against <i>T. vaginalis</i> | 130 |
|---|-----|

CAPÍTULO 6

| | |
|---|-----|
| Table 1. MIC values of 1,4-butanediamine and 1,6-hexanediamine derivatives against <i>G. lamblia</i> and <i>T. vaginalis</i> | 143 |
|---|-----|

CAPÍTULO 7

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Dados de ¹ H RMN da licorina e os derivados semi-sintéticos | 165 |
|---|-----|

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| I.1. Família Amaryllidaceae: fonte de alcaloides bioativos | 5 |
| I.1.1. O gênero <i>Hippeastrum</i> | 6 |
| I.1.2. Biossíntese e classificação dos alcalóides..... | 6 |
| I.1.3. Licorina | 8 |
| I.1.3.1. Derivados | 10 |
| I.1.4. Candimina | 12 |
| I.2. Tricomonádídeos | 12 |
| I.2.1. <i>Trichomonas</i> : modelo celular..... | 15 |
| I.2.2. <i>T. vaginalis</i> : parasito patogênico..... | 18 |
| I.2.3. Interação parasito-hospedeiro | 22 |
| I.2.3.1. Sistema purinérgico - NTPDase e Ecto-5'-nucleotidase..... | 24 |
| I.2.4. Poliaminas | 27 |
| | |
| I.3. OBJETIVOS..... | 29 |
| | |
| II. ARTIGOS CIENTÍFICOS | |
| | |
| II.1. CAPÍTULO 1 - <u>Raquel B. Giordani</u>, Jean P. de Andrade, Hugo Verli, Julie H. Dutilh, Strahil Berkov, Jaume Bastida, José Angelo S. Zuanazzi. Alkaloids from <i>Hippeastrum morelianum</i> Lem. (Amaryllidaceae) | 33 |
| | |
| II.2. CAPÍTULO 2 - <u>Raquel B. Giordani</u>, Patrícia B. Vieira, Marina Weizenmann, Denis B. Rosemberg, Ana P. Souza, Cristina Bonorino, Geraldo A. De Carli, Maurício R. Bogo, José A. Zuanazzi, Tiana Tasca. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, <i>Trichomonas vaginalis</i>, via an alternative non-apoptotic death pathway Phytochemistry (submetido)..... | 51 |
| | |
| II.3. CAPÍTULO 3 - <u>Raquel B. Giordani</u>, Patrícia de Brum Vieira, Marina Weizenmann, Denis B. Rosemberg, Ana Paula Souza, Cristina Bonorino, Geraldo Attilio De Carli, Mauricio Reis Bogo, José Angelo Zuanazzi, Tiana Tasca. Cell death candimine-induced in the amitochondriate parasite <i>Trichomonas vaginalis</i>. Journal of Natural Products (submetido) | 87 |

| | |
|--|-----|
| II.4. CAPÍTULO 4 - <u>Raquel B. Giordani</u> , Marina Weizenmann, Denis B. Rosemberg, Geraldo Attilio De Carli, Mauricio Reis Bogo, José Angelo Zuanazzi, Tiana Tasca. <i>Trichomonas vaginalis</i> nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. Parasitology International 2010; 59:22 | 117 |
| II.5. CAPÍTULO 5 - <u>Raquel B. Giordani</u> , Mauro V. de Almeida, Ederson Fernandes, Cristiane França da Costa, Geraldo A. De Carli, Tiana Tasca, José Angelo S. Zuanazzi. Anti- <i>T. vaginalis</i> activity of synthetic lipophilic diamine and aminoalcohol derivatives. Biomedicine and Pharmacotherapy 2009; 63:613-617 | 125 |
| II.6. CAPÍTULO 6 - <u>Raquel B. Giordani</u> , Cristiane França da Costa, Mariana Duarte, José Angelo Zuanazzi, Tiana Tasca, Mauro Vieira de Almeida, Anti-protozoal activity of diamine derivatives. Biomedicine and Pharmacotherapy (submetido) | 133 |
| II.7. CAPÍTULO 7 - Síntese e avaliação da atividade anti- <i>T. vaginalis</i> de derivados da licorina | 147 |
| III. DISCUSSÃO GERAL | 169 |
| IV. CONCLUSÕES GERAIS | 189 |
| V. PERSPECTIVAS | 193 |
| VI. REFERÊNCIAS | 197 |
| VII. ANEXOS | 215 |

As primeiras descrições do uso de plantas com fins terapêuticos são escritas em cuneiforme, originárias da Mesopotâmia, e datam de 2600 a.C.: óleo de *Cedrus* sp. e *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, *Commiphora* sp. and *Papaver somniferum*, muitos dos quais ainda utilizados atualmente no tratamento de doenças como gripes, resfriados, infecções bacterianas e doenças parasitárias (GURIB-FAKIM, 2006). Uma estimativa realizada em 1997 revelou que cerca de 20% da população mundial vive em situação de extrema pobreza e recorre a plantas medicinais locais para sua atenção primária em saúde (WHO, 1995; 1997). Sabe-se que para obter substâncias ativas a partir de plantas, um dos principais aspectos a ser considerado são as informações advindas da medicina popular, além das informações químico-taxonomias e botânico-taxonomias (CORDELL, 1985).

Até 1994 cerca de 80% dos novos fármacos de medicamentos aprovados pelo FDA¹ estavam relacionados a produtos naturais, após essa data a porcentagem foi reduzida a 50% (NEWMAN e CRAGG, 2007; BUTLER, 2008). Tecnologias como o *high-throughput screening* (HTS) e a era pós-genômica contribuíram para a redução da porcentagem de produtos naturais, ou derivados, que se tornaram fármacos. Entretanto, apenas o sorafenib², comercializado como Nexavar[®], chegou ao mercado originário de HTS de bibliotecas de análise combinatória (NEWMAN e CRAGG, 2007). De acordo com BUTLER (2008), 30 fármacos relacionados a produtos naturais foram aprovados pelas autoridades sanitárias mundiais entre 2005 e 2007, sendo que 5 destes representam novas classes de medicamentos. Destaca-se que aproximadamente 15 medicamentos antiparasitários foram introduzidos no mercado entre 01/1981 e 06/2006, dos quais 64,3% são produtos naturais ou derivados destes (NEWMANN e CRAGG, 2007). Com o entendimento de que a diversidade química dos produtos naturais é uma melhor estratégia para alcançar medicamentos de sucesso em relação à diversidade das coleções de compostos sintéticos, o interesse em aproveitar a diversidade química natural para a descoberta de novos fármacos parece estar aumentando novamente (FEHER e SCHMIDT, 2003; GALM e SHEN, 2007). Outro aspecto relevante é a aplicação dos recursos da síntese química para apurar as

¹ FDA: Food and Drug Administration.

² Fármaco inibidor de enzimas tirosina quinases, indicado para o uso em casos de carcinoma renal e hepático.

atividades apresentadas pelos produtos naturais através da semi-síntese com produção de análogos com melhores propriedades farmacológicas e farmacêuticas (KENNEDY, 2008).

Importantes compostos aprovados recentemente para comercialização se destacam por serem produtos naturais isolados a partir de plantas: eliptinium, huperzina e galantamina (HARVEY, 2008). A galantamina, por exemplo, é um inibidor seletivo, reversível e competitivo da acetilcolinesterase, alcaloide, isolado a partir de espécies da família Amaryllidaceae (HEINRICH e TEOH, 2004). Atualmente é comercializado como Razadyne[®], o inibidor da acetilcolinesterase mais recentemente aprovado na Europa e EUA para o tratamento do Mal de Alzheimer. Amaryllidaceae está classificada entre as 20 mais importantes famílias botânicas produtoras de alcaloides e, conseqüentemente, cerca de 500 alcaloides já foram descritos, com estruturas diversas e importantes atividades farmacológicas (ZHONG, 2007).

Dentre a ampla gama de atividades farmacológicas já investigadas destaca-se a importante citotoxicidade desses alcaloides tanto para células tumorais quanto para microrganismos. Considerando esse potencial antimicrobiano alguns autores concentraram esforços na investigação da atividade antiparasitária, especialmente contra a malária, leishmaniose e tripanossomíase (TORIIZUKA *et al.*, 2008; CEDRON *et al.*, 2010). Essas enfermidades afetam principalmente a população de países tropicais subdesenvolvidos e não constituem a prioridade de investigação na busca por novas moléculas ativas, de acordo com um modelo econômico da indústria farmacêutica que se concentra no lucro. Nesse contexto e entendendo que os parasitos são um problema de saúde pública grave com conseqüências sócio-econômicas importantes, além de ferramentas para investigações em biologia celular, optou-se neste trabalho por aprofundar o estudo com *Trichomonas vaginalis*.

O *T. vaginalis* é o agente etiológico da tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) de origem não viral mais comum no mundo, com importante implicação médica, social e econômica (WHO, 2001). Além da abordagem desse parasito como agente etiológico, ele pode ser considerado um modelo bioquímico para

estudos em biologia celular de amitocondriados e mecanismos de ação de compostos citotóxicos, pois apresenta relações evolutivas com grupos de eucariotos superiores e é desprovido de mitocôndrias (CHOSE *et al.*, 2003). Com o avanço das investigações sobre a farmacologia dos alcaloides bioativos de Amaryllidaceae, verifica-se que os mecanismos de ação da citotoxicidade estão, principalmente, relacionados com vias metabólicas mediadas por mitocôndrias (LIU *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007; MCNULTY *et al.*, 2009).

Dessa forma, a avaliação da atividade dos alcaloides de Amaryllidaceae contra o multifacetado parasito *T. vaginalis* pode contribuir em diversas áreas do conhecimento, tais como (i) novas abordagens sobre o mecanismo de ação dos compostos, com potenciais aplicações e (ii) envolvimento de diferentes vias metabólicas potencialmente envolvidas no processo de morte celular de amitocondriados.

I.1. Família Amaryllidaceae: fonte de alcaloides bioativos

Até o momento cerca de 500 alcaloides estruturalmente distintos já foram isolados, sendo que das 1100 espécies existentes ainda restam muitas por serem investigadas (JIN, 2009). Plantas pertencentes a essa família são amplamente utilizadas na medicina tradicional em diferentes países, e seus efeitos farmacológicos são frequentemente atribuídos aos diversos alcaloides de estrutura peculiar que elas sintetizam. Muitas comunidades na África, Ásia e Polinésia ainda utilizam, principalmente, a medicina tradicional para sua atenção primária em saúde. Na África, decocções de bulbos de Amaryllidaceae são utilizados para tratamento de doenças venéreas (LOUW *et al.*, 2002).

As expressivas atividades biológicas apresentadas por esses compostos estimulam a progressiva e contínua investigação, com novas abordagens farmacológicas e uso em modelos experimentais inexplorados até o momento. Uma minuciosa revisão com as principais atividades farmacológicas de cada grupo de alcaloides, recentemente publicada, distingue a família Amaryllidaceae como fonte de alcaloides bioativos (BASTIDA *et al.*, 2006). As atividades antiviral (GABRIELSEN

et al., 1992; SZLAVICK *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005), antitumoral e citotóxica (MCLACHLAN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007), psicofarmacológica (ELGORASHI *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006) e anticolinesterásica (HOUGHTON *et al.*, 2004; SHOEI-SHENG *et al.*, 2007) são as mais abordadas. Embora as Amaryllidaceae sejam alvo de estudo desde o século XIX, ainda hoje as investigações se justificam pelo considerável potencial em fornecer resultados cientificamente relevantes.

I.1.1. O gênero *Hippeastrum*

Entre os 85 gêneros da família, 11 já foram encontrados no Brasil: *Hippeastrum*, *Crinum*, *Alstroemeria*, *Clivia*, *Zephyranthes*, *Haemanthus*, *Eucharis*, *Habranthus*, *Worsleya*, *Griffinia* (MEEROW *et al.*, 1999) e *Rodophiala* (CASTILHOS, 2004), com ocorrência, preferencialmente, em campos, caatingas e regiões úmidas montanhosas (SCHULTZ, 1990).

O gênero *Hippeastrum*, devido à exclusiva ocorrência na América do Sul, vem sendo estudado continuamente (HOFFMANN *et al.*, 2003; CASTILHOS *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2006, 2008; GIORDANI *et al.*, 2007), embora ainda menos explorado que as espécies européias e africanas. Esse fato é mais um atrativo para o desenvolvimento de novas investigações químicas e, ainda o mais importante, é a potencial aplicação da riqueza da bioatividade desses alcaloides na terapêutica de doenças consideradas negligenciadas.

I.1.2. Biossíntese e classificação dos alcaloides

Esses compostos são formados biogeneticamente pelo acoplamento oxidativo intramolecular da norbeladina, um precursor derivado dos aminoácidos fenilalanina e tirosina (BASTIDA *et al.*, 2006). Variações do tipo de acoplamento oxidativo dão origem a três núcleos fundamentais: licorina, galantamina e crinina, sendo que a diversidade química dos alcaloides se distribui entre essas três classes (**Figura 1**).

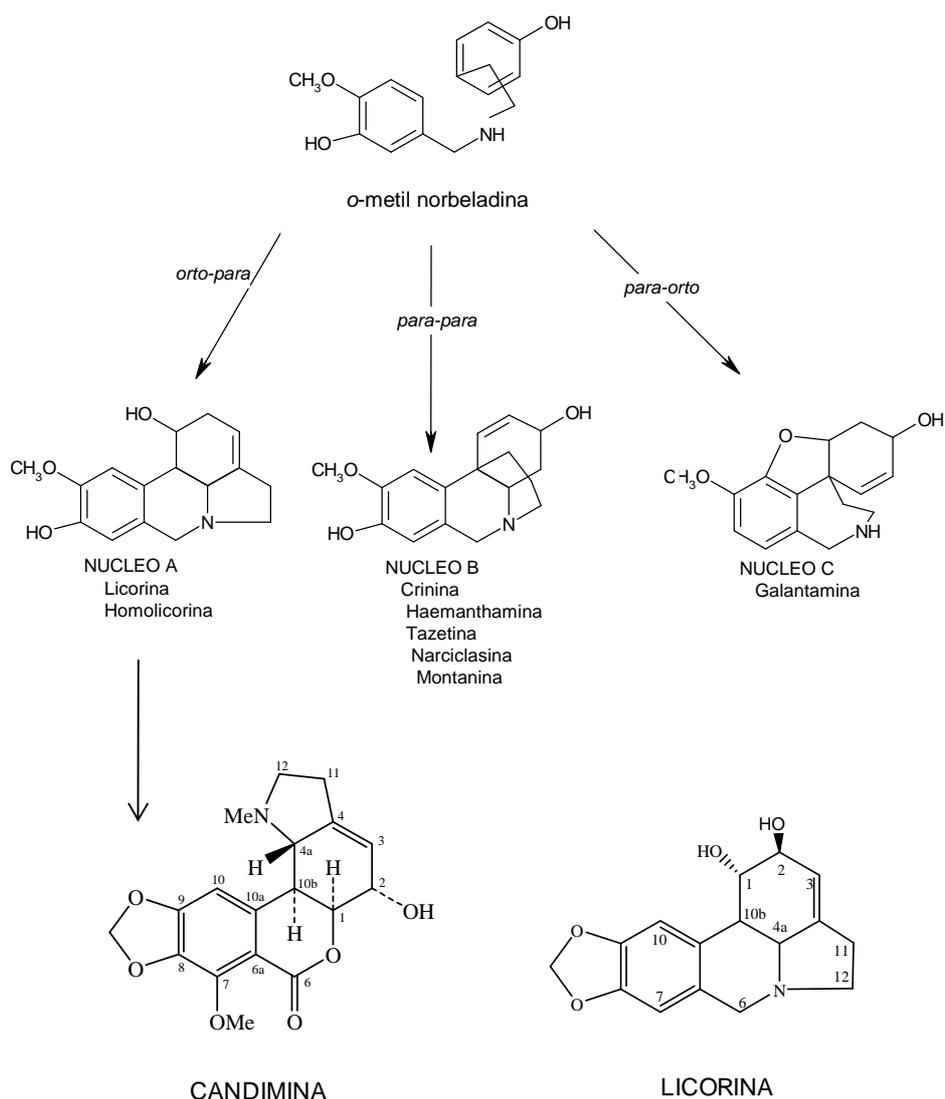


Figura 1: Diferentes acoplamentos oxidativos do fenol em precursor dos alcaloides de Amaryllidaceae. Candimina: alcaloide pertencente ao Núcleo A, subgrupo homolicorina. Licorina: alcaloide pertencente ao Núcleo A, subgrupo licorina. (Adaptado de Bastida *et al.*, 2006).

Estudos prévios do conteúdo alcaloídico em *Hippeastrum* revelam a ocorrência principal dos seguintes núcleos: licorina (1H-pirrol[3,2,1-d,e] fenantridina) e tazetina (2-benzopirano[3,4-c] indol), seguido por montanina (5,11-metanomorfanridina) e crinina (5,10b-etanofenantridina).

I.1.3. Licorina

A licorina é um dos alcaloides mais abundantes e amplamente distribuídos entre as Amaryllidaceae e, conseqüentemente, aquele que apresenta o maior número de estudos descritos na literatura. O primeiro relato de isolamento e atividade farmacológica da licorina data de 1899 (McNULTY, 2009) e a partir de então as investigações aumentaram progressivamente. Esse alcaloide demonstra ampla diversidade de atividades farmacológicas: (i) é ativo contra poliovírus (WANG *et al.*, 2008) e coronariovírus causador da SARS (Síndrome Respiratória Aguda Severa), em concentrações na ordem de nanomolar (LI *et al.*, 2005); (ii) é antifúngico contra *Saccharomices cerevisiae* (DEL GIUDICE *et al.*, 2005); (iii) demonstrou melhor atividade anti-inflamatória quando comparado à indometacina (CITOGLU *et al.*, 1998); (iv) é inseticida (EVIDENTE *et al.*, 1986); (v) inibe a biossíntese do ácido ascórbico (ARRIGONI *et al.*, 1975) e esse efeito na alongação das raízes das plantas e divisão celular sugere que a licorina poderia inibir as sínteses de RNA e/ou proteína (JIMENEZ *et al.*, 1976); (vi) inibe a acetilcolinesterase (LOPEZ *et al.*, 2002); (vii) apresenta atividade anti-*Trypanosoma brucei*, anti-*Plasmodium falciparum* e anti-*Leishmania amazonensis* (MACKEY *et al.*, 2006; TORIIZUKA *et al.*, 2008; CEDRON *et al.*, 2010); (viii) é um promissor composto anti-proliferativo contra diversas linhagens celulares (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; LAMORAL-THEYS *et al.*, 2010). Portanto, corroborando ARRIGONI e colaboradores (1994) afirma-se que a licorina pode ser considerada uma ferramenta eficaz para estudo de processos biológicos importantes.

A atividade citotóxica da licorina, especialmente o potencial antitumoral, desperta a atenção dos grupos de pesquisa cada vez mais envolvidos na investigação para o entendimento do mecanismo de ação desse composto. Os estudos mostram que a licorina, juntamente com a pancratistatina e narciclasina apresentam uma atividade antiproliferativa mais severa em células tumorais do que em células saudáveis e ainda, que esses alcaloides poderiam atuar induzindo uma via apoptótica intrínseca nas células dos tumores (McLACHLAN *et al.*, 2005; DUMONT *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009). Muitos avanços podem ser identificados e entende-se que o mecanismo de ação

desse alcaloide está relacionado à linhagem celular em avaliação. A **Tabela 1** sintetiza as principais conclusões sobre o perfil de atividade da licorina em distintas linhagens celulares.

Tabela 1. Atividade citotóxica da licorina.

| <i>Linhagem celular</i> | <i>Mecanismo de ação</i> | <i>Referência</i> |
|--|---|------------------------------------|
| HL60 | Atraso do ciclo celular em G2/M Indução de apoptose | LIU <i>et al.</i> , 2004 |
| APL | Prolonga a sobrevivência <i>in vivo</i> em modelo SCID de leucemia | LIU <i>et al.</i> , 2007 |
| KM3 | Atraso do ciclo celular em G0/G1 Indução de apoptose | LI <i>et al.</i> , 2007 |
| | Redução da expressão do gene Mcl1 Indução de apoptose | LIU <i>et al.</i> , 2009 |
| Jurkat | Indução de apoptose | McNULTY <i>et al.</i> , 2009 |
| | Indução de apoptose | EVIDENTE <i>et al.</i> , 2009 |
| A549; OE21; Hs683; U373; SKMEL; B16F10 | Efeito citostático Citotóxico contra células sensíveis e resistentes a estímulo pró-apoptótico | LAMORAL-THEYS <i>et al.</i> , 2009 |

HL60 (leucemia pró-mielocítica humana); APL (leucemia aguda pró-mielocítica); SCID (camundongos com imunodeficiência severa combinada); KM3 (mieloma múltiplo); Jurkat (linfoma de células T); A549 (adenocarcinoma alveolar humano); OE21 (câncer esofageal humano); Hs683 (oligodendroglioma anaplástico humano); U373 (glioblastoma humano); SKMEL (melanoma humano) e B16F10 (melanoma de camundongos).

Podemos observar que a licorina apresenta uma diversidade de mecanismos de ação biológica que tem sido utilizada para explicar sua importante atividade antitumoral. A grande maioria dos estudos aponta para um efeito pró-apoptótico da

licorina (LIU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2004), enquanto outro mostra que o alcaloide tem atividade anti-apoptótica em presença de calprotectina (YUI *et al.*, 1998). Ainda, esses estudos mostram que a síntese de proteínas pró-apoptóticas como as caspases 3, 7, e 9 pode ser estimulada pela licorina, enquanto proteínas anti-apoptóticas como Mcl-1 (proteína responsável pela diferenciação celular em leucemia mielóide induzida) e Bcl-x1 (proteína de membrana que protege as células neoplásicas do dano ao DNA induzido pelo processo de apoptose) podem ter sua produção diminuída (LIU *et al.*, 2009). O atraso no ciclo celular é um fenômeno recorrente observado em distintas linhagens celulares (LIU *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2007) e a licorina também se mostrou eficiente em interagir com o DNA (KARADENIZ *et al.*, 2003). As investigações dos mecanismos de ação biológicos da licorina envolvidos com a citotoxicidade concentram-se em células tumorais, que são eucariotas e mitocondriadas. Entretanto, em todos os estudos desenvolvidos até então se verifica que a mitocôndria é uma organela chave no desencadeamento da morte celular induzida por licorina. Nesse momento cabe um questionamento que pode contribuir com valiosas informações biológicas para o delineamento do perfil farmacológico da licorina: qual o efeito desse alcaloide pró-apoptótico em células desprovidas de mitocôndria, como o parasito *T. vaginalis*? Dessa forma, um dos objetivos deste trabalho é lançar contribuições para o entendimento desse tema.

I.1.3.1. Derivados

A licorina é um alcaloide tetracíclico estruturalmente relacionado às fenantridinas e demonstra o mais interessante potencial anti-tumoral (citotóxico) dentre todas as classes dos alcaloides de Amaryllidaceae (LAMORAL-THEYS *et al.*, 2010). Assim, muitos derivados da licorina, a maioria deles de origem natural, foram testados e avaliados frente a diversas linhagens celulares objetivando o delineamento de uma relação estrutura-atividade (REA). Aproximadamente 300 moléculas foram caracterizadas (naturais, sintéticas e semi-sintéticas) e contêm os tetraciclos da licorina, destas apenas 26 foram testadas para atividade antitumoral frente a distintas linhagens celulares, sendo 20 derivados citotóxicos e somente 6 inócuos às culturas celulares (LAMORAL-THEYS *et al.*, 2010). O mesmo estudo conclui que a presença

das funções álcool e fenol, a insaturação do anel D e a presença de uma amina são importantes parâmetros no desenvolvimento de novos protótipos derivados da licorina com atividade antitumoral. Esse estudo de 2010 é o único que trata estatisticamente os dados de modificação estrutural em função da atividade citotóxica e indica que mais derivados precisam ser testados para assegurar uma REA da licorina. Porém, outros trabalhos importantes sobre o tema foram publicados (EVIDENTE *et al.*, 2009; EVIDENTE e KORNIENKO *et al.*, 2009) e certamente isso contribui para a motivação dos avanços na investigação dos derivados da licorina para descoberta e desenvolvimento de novos protótipos.

Estudos de REA também foram desenvolvidos considerando outras atividades farmacológicas da licorina. A investigação de ésteres contra *Trypanosoma brucei* e *Plasmodium falciparum* indicou que (i) os derivados di-acetil têm a pior atividade anti-tripanosossoma, mas, o di-butil apresenta boa atividade anti-plasmódio (a melhor entre os di-ésteres testados); (ii) o éster com acetil na posição C-2, conservando o OH em C-1, apresentou a melhor atividade anti-tripanosossoma e anti-plasmódio; (iii) os ésteres propil e butil são tão ativos quanto o acetil em C-1 contra malária (TORIIZUKA *et al.*, 2008). Outro estudo de derivados da licorina contra *P. falciparum* corrobora esses dados e indica requisitos estruturais importantes para aperfeiçoamento da atividade anti-malárica: (i) ao menos um grupamento OH livre em C-1 e/ou C-2; (ii) derivados esterificados em C-1 com acetil; (iii) dupla ligação entre C-2 e C-3; (iv) assim como uma metila substituindo o nitrogênio nos derivados do tipo secolicorina (CEDRON *et al.*, 2010).

Assim, percebe-se uma concordância entre os requisitos de estrutura-atividade da licorina quando comparamos a citotoxicidade contra células tumorais e contra parasitos. Novamente, é importante destacar que em ambos os casos as células são eucariotas e mitocondriadas sendo os requisitos estruturais de atividade contra células amitocondriadas um tema ainda não abordado na literatura. A triagem de substituintes com atividade farmacológica *per se* que poderiam ser acoplados à licorina formando derivados com atividade sinérgica àquela do alcaloide é uma abordagem interessante e também está contemplada nos objetivos deste estudo.

I.1.4. Candimina

Até hoje, existem somente dois relatos sobre a descrição de isolamento do alcaloide candimina, ambos a partir de espécies de *Hippeastrum*: *H. candidum* (DOPKE, 1962) e *H. morelianum* (GIORDANI, 2007). A candimina é um alcaloide lactônico, pertence ao grupo biossintético de alcaloides com Núcleo A, assim como a licorina, e ao subgrupo homolicorina (**Figura 1**).

Para outros alcaloides classificados nesse mesmo subgrupo já foram descritas importantes atividades farmacológicas, o que sugere que a candimina também possa ser um composto bioativo. Alcaloides como a homolicorina, hipeastrina, licorenina e dubiusina são citotóxicos contra fibroblastos não-tumorais (WENIGER *et al.*, 1995), além de serem moderadamente ativos inibindo o crescimento (*in vivo* e *in vitro*) de diversas linhagens celulares tumorais, tais como linfoma (Molt4), hepatoma humano (HepG2) e câncer de próstata humano (LNCaP) (FENNEL e VAN STADEN, 2001; AUNTON *et al.*, 1993). Dubiusina, licorenina, 8-*O*-demetil homolicorina e 9-*O*-demetil-2-hidroxi homolicorina demonstraram potencial de ligação ao DNA comparável à vimblastina (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2000). Acredita-se que a ocorrência pouco frequente desse alcaloide na natureza seja o fator responsável pela ausência de estudos farmacológicos.

Considerando as atividades farmacológicas já demonstradas por alcaloides com núcleo homolicorina, torna-se relevante avaliar as propriedades da candimina, valorizando o gênero *Hippeastrum* por ser, até o momento, a única fonte deste alcaloide.

I.2. Tricomonadídeos

A classificação taxonômica indica que o gênero *Trichomonas* pertence ao Filo Zoomastigina, à Classe Parabasalia, Ordem Trichomonadida e Família Trichomonadidae (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Tricomonadídeos são protistas anaeróbios facultativos e parasitos, com algumas espécies de impacto na saúde humana, como o *T. vaginalis*, e animal, como o *Tritrichomonas foetus*, causador da

tricomonose bovina (KLEINA *et al.*, 2004). Estudos moleculares apontam que esses protistas apresentam uma posição basal na filogenia dos eucariotos sendo, portanto, importantes para o entendimento do processo evolutivo eucariótico (GOLSTEIN *et al.*, 2003).

As três espécies de tricomonadídeos encontradas no homem são *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis* e *Trichomonas vaginalis*, onde cada espécie exerce tropismo específico para seu sítio de infecção. O *T. hominis*, considerado não patogênico, habita o trato intestinal humano (DE CARLI e TASCA, 2007). O *T. tenax* pode ser encontrado nas cavidades oral e traqueo-bronquial, é também considerado não patogênico, embora seja raramente encontrado em humanos (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Por outro lado, *T. vaginalis* é um protozoário parasita de humanos e agente da tricomonose, uma causa comum de vaginite. Essa doença é considerada uma DST facilmente diagnosticável e tratável, mas tem recebido pouca atenção das políticas públicas, embora cause importantes implicações na saúde da população.

O *T. vaginalis* é anaeróbio facultativo e pode ser cultivado *in vitro* na ausência de oxigênio, na faixa de pH compreendido entre 5,0 e 7,5 e em temperaturas entre 20 e 40°C (DE CARLI e TASCA, 2007). O *T. vaginalis* é capaz de manter o glicogênio em reserva, mas depende do fornecimento de aminoácidos ou proteínas digeridas revelando a ausência das principais vias biossintéticas (MÜLLER, 1990). Além disso, não apresenta a capacidade de realizar síntese *de novo* de purinas e pirimidinas, sendo dependente das vias de salvação para a obtenção desses compostos (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984).

O protozoário tem a capacidade de formar pseudópodes, apresenta um corpo celular muito plástico (9,0 x 7,0 µm), adotando forma elipsóide, piriforme ou oval. Entretanto, condições físico-químicas como pH, temperatura, tensão de oxigênio e força iônica afetam o aspecto dos organismos, que não possuem a forma cística, somente a trofozoítica (DE CARLI, 2007). O *T. vaginalis* possui (i) quatro flagelos anteriores, desiguais em tamanho; (ii) um flagelo recorrente que está aderido ao corpo do parasito pela costa, formando a membrana ondulante; (iii) uma estrutura de

microtúbulos formando o axóstilo, que percorre longitudinalmente a célula e ao longo do qual se distribuem os hidrogenossomos (**Figura 2**). Quando em interação com células epiteliais o *T. vaginalis* altera sua forma, de piriforme passa para uma forma amebóide, apresentando interdigitações com as células do hospedeiro, num íntimo contato e, possivelmente, em continuidade (FURTADO e BENCHIMOL, 1998).

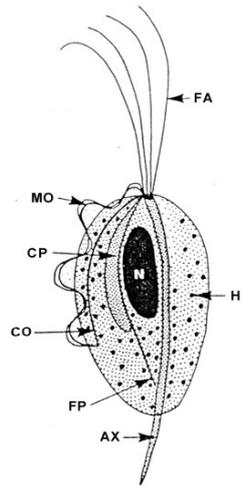


Figura 2: Características morfológicas de *Trichomonas vaginalis*. FA: flagelos anteriores; MO: membrana ondulante; CP: corpo parabasal; CO: costa; N: núcleo; FP: filamento parabasal; HI: hidrogenossomos; AX: axóstilo. [Adaptado de De Carli, G.A. e Tasca, T. (2007)].

O núcleo celular é proeminente e o parasito tem organelas incomuns produtoras de energia, os hidrogenossomos, que estão presentes como grânulos cromáticos e osmiofílicos, visualizados por microscopia óptica e eletrônica, localizados próximo à costa e/ou axóstilo (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). *T. vaginalis* é um protozoário parabasilídeo que se ramificou do gênero protozoa antes dos cinetoplastídeos, os protozoários mais primitivos que apresentam mitocôndria (VISCOGLIOSI *et al.*, 1999). Ao contrário da maioria dos eucariotos, *T. vaginalis* não tem mitocôndria e utiliza os hidrogenossomos para realizar o metabolismo fermentativo dos carboidratos com o hidrogênio como acceptor de elétrons (MÜLLER, 1993). Os hidrogenossomos parecem ter um ancestral comum com as mitocôndrias, considerando as similaridades nos processos de importação de proteínas, entretanto, muitas diferenças constitutivas

existem como a ausência de citocromos, cadeia respiratória e DNA (DYALL e JOHNSON, 2000).

Considerando as informações acima descritas pode-se considerar o parasito *T. vaginalis* uma importante ferramenta para estudos de atividade farmacológica de compostos bioativos. Assim, além de ser o agente etiológico de uma importante DST e naturalmente, um alvo para investigação de novos compostos citotóxicos como alternativas terapêuticas, o parasito pode também ser considerado um modelo de estudos em biologia celular devido à ausência de mitocôndrias e à ocorrência de rotas bioquímicas particulares. A seguir, essas duas abordagens serão melhor exploradas.

I.2.1. *Trichomonas*: modelo celular

Os parasitos do gênero *Trichomonas* não apresentam mitocôndrias nem peroxissomos, mas têm uma organela importante e incomum: o hidrogenossomo. A ausência de mitocôndrias é a principal característica que os torna modelo celular de estudos bioquímicos e fisiológicos. Os hidrogenossomos são organelas ausentes em animais multicelulares, plantas e em outros protistas anaeróbios, como amebas e giardias, sendo facilmente encontrados em protozoários da ordem Trichomonadida, como *T. vaginalis* (BENCHIMOL, 2009). Essas organelas contêm enzimas que participam do metabolismo do piruvato formado durante a glicólise, sendo o local de formação de H₂, processo que é acompanhado pela síntese de ATP (MÜLLER, 1993; KULDA, 1999). Apenas 10% do ATP necessário para a sobrevivência do parasito é oriundo dos hidrogenossomos, sendo o restante obtido a partir do metabolismo oxidativo do parasito (CHOSE *et al.*, 2003).

Essa característica fisiológica presente também em *T. vaginalis* se torna importante quando consideramos que em organismos multicelulares e em todos os protozoários unicelulares com mitocôndria, essa organela tem um papel central durante o desenvolvimento da morte celular programada (PCD – *programmed cell death*) (CHOSE *et al.*, 2003). A mitocôndria constitui o sítio primário de ação de membros da família de proteínas Bcl-2, a qual controla a permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de algumas proteínas ao citosol. Essas moléculas

atuam na amplificação do sinal apoptótico e na efetivação da morte celular (RAVAGNAN *et al.*, 2002; VAN LOO *et al.*, 2002).

Em organismos amitocondriados como os tricomonas, tal maquinaria envolvida na morte celular parece estar ausente e os mecanismos que levam à morte celular permanecem por ser elucidados. Embora extensivos estudos busquem o entendimento da morte celular e suas implicações, alguns autores reforçam a validade da realização desses estudos de PCD também em protozoários unicelulares sem mitocôndria, a partir dos quais informações inéditas poderiam ser obtidas (CHOSE *et al.*, 2003; GOLSTEIN *et al.*, 2003).

A morte celular em eucariotos mitocondriados é tradicionalmente classificada em dois grupos: (i) necrose, uma rota passiva e descontrolada, e (ii) morte celular programada (PCD), um processo rigorosamente controlado com vias celulares definidas (DEBNATH *et al.*, 2005). PCD se refere à ocorrência programada de morte celular em organismos durante o desenvolvimento, assim como ao programado curso de eventos que ocorrem numa célula em processo de morte, sendo tão complexo quanto multi-facetado (GOLSTEIN, 2003). A PCD tem sido classificada em três tipos definidos principalmente com base nas características morfológicas: apoptótica (tipo I), autofágica (tipo II) e não-lisossomal (tipo III), a qual se assemelha à necrose (**Figura 3**) (DEBNATH *et al.*, 2005).

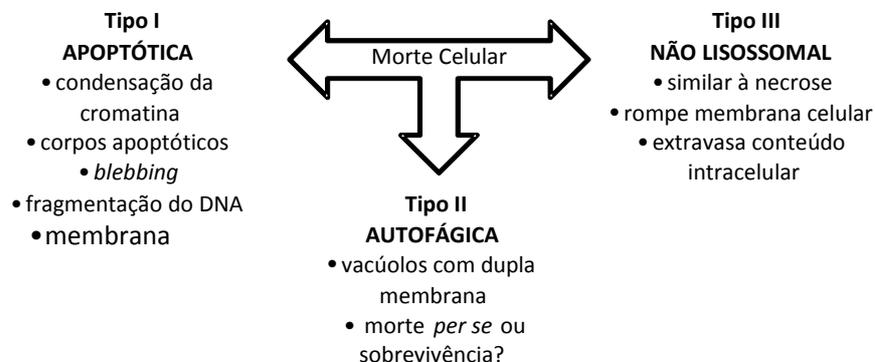


Figura 3: Classificação dos tipos de morte celular (DEBNATH *et al.*, 2005).

A necrose é um evento de morte celular não controlada e se caracteriza pelo rompimento da membrana celular com extravasamento do conteúdo citoplasmático. Por outro lado, a autofagia se caracteriza pela presença de vacúolos intracelulares, geralmente com dupla membrana, contendo material em degradação. Acredita-se que esse processo autofágico (i) pode ser responsável por uma aceleração da morte celular a qual ocorreria mesmo na ausência de autofagia; ou ainda (ii) esse evento poderia ocorrer em uma fração das células mortas em resposta a certos estímulos ainda pouco conhecidos (KROEMER e LEVINE, 2008). Estudos sugerem que a autofagia *per se* não é um evento deletério (QU *et al.*, 2007) e isso poderia ser um mecanismo de sobrevivência e não de morte celular, uma vez que a autofagia tem um papel na proteção contra danos a organelas em células de mamíferos, estresse por depleção de nutrientes e microrganismos (LEVIGNE e KROEMER, 2008).

A apoptose é caracterizada por: (i) prematura condensação da cromatina, (ii) fragmentação do núcleo formando os corpos apoptóticos; (iii) alterações em organelas citoplasmáticas; (iv) formação de projeções na membrana plasmática, conhecidas como *blebbing*; (v) fragmentação do DNA (ocorrem casos em que o DNA permanece intacto); e (vi) pela membrana celular intacta, mantida através de um processo mediado por caspases³ (KROEMER *et al.*, 2009). Em organismos multicelulares e em todos os protozoários com mitocôndria, essa organela desempenha um papel central tanto nas vias caspase-dependente quanto caspase-independente, produzindo ou capturando diversas moléculas que são essenciais à execução da PCD (KROEMER e REED, 2000).

Até o momento nenhuma proteína implicada nas vias de caspase-dependente ou independente foi descrita em *T. vaginalis*, sugerindo que esse parasito amitocondriado poderia sofrer PCD por uma via metabólica alternativa (CHOSE *et al.*, 2003). Estudos prévios indicam que parasitos unicelulares sem mitocôndria, como *T. vaginalis*, sofrem uma forma de morte celular semelhante à apoptose, a mais frequente forma de PCD, sugerindo a presença de uma via *caspase-like* (CHOSE *et al.*, 2002; OFER *et al.*,

³ Caspases: Cisteína proteinases que clivam proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico e são essenciais no desenvolvimento da apoptose.

2008). Poucos estudos investigando a morte celular em tricomonas foram realizados e ambos apresentam o mesmo resultado: compostos pró-apoptóticos como metil jasmonato, doxorubicina, staurosporina e etoposídeo desencadearam um tipo de morte celular em *T. vaginalis* com alguns aspectos morfológicos similares tanto à apoptose quanto à paraptose: vacuolização citoplasmática, condensação da cromatina e presença de corpos apoptóticos (CHOSE *et al.*, 2002; OFER *et al.*, 2008). A paraptose é definida como uma forma de PCD não-apoptótica porque não cumpre os requisitos da apoptose e é morfológicamente caracterizada por grandes vacúolos citoplasmáticos e cromatina intacta, quase normal (OLIE *et al.*, 1998). Nesse contexto, observa-se que os mecanismos que levam a morte celular de amitocondriados permanecem desconhecidos e constituem um importante e inexplorado nicho de investigação.

Assim, muitas são as contribuições necessárias para o completo entendimento das vias metabólicas envolvidas na morte celular de amitocondriados. Uma estratégia promissora é a avaliação de compostos pró-apoptóticos em células eucariotas com mitocôndria também contra *T. vaginalis*, promovendo uma comparação entre as respostas elicitadas. Desta forma, os produtos naturais, especialmente os alcaloides, são compostos candidatos a participarem dessa avaliação.

I.2.2. *T. vaginalis*: parasito patogênico

Paralelamente à inserção dos tricomonas como modelos celulares em prol da saúde e ciência, deve-se destacar que o *T. vaginalis* é o agente causador da tricomonose, a doença sexualmente transmissível de origem não viral mais comum no mundo (WHO, 2001). O parasito se divide por fissão binária, tem um ciclo de vida simples porque é transmitido no ato sexual, não tem forma cística, e habita o lúmen e a superfície mucosa do trato urogenital humano. A primeira descrição da ocorrência de *T. vaginalis* em secreção vaginal foi no início de 1830, sendo em 1940 reconhecido como causa de corrimento vaginal e com transmissão através de relações sexuais (HUPPERT, 2009). Estima-se a ocorrência de 174 milhões de novos casos de tricomonose por ano, valores comparáveis à prevalência de *Chlamydia trachomatis* (92 milhões) e *Neisseria gonorrhoeae* (62 milhões) (WHO, 2001; JOHNSTON e

MABEY, 2008). Ainda, estima-se que a incidência de tricomonose em adolescentes norte-americanas seja entre 5 e 7,4 milhões de novos casos por ano (WEINSTOCK *et al.*, 2004). Durante alguns anos a tricomonose atraiu pouca atenção por ser uma DST de ocorrência comum, entretanto, novos métodos de diagnóstico estão demonstrando a real magnitude da prevalência deste parasito associado a importantes consequências à saúde, decorrentes da infecção (HUPPERT, 2009).

O parasito pode causar baixo peso em recém-nascidos, bem como nascimento prematuro (COTCH *et al.*, 1991; 1997), além de predispor mulheres à doença inflamatória pélvica atípica, câncer cervical e infertilidade (GRODSTEIN *et al.*, 1993; ZHANG e BEGG, 1994; VIKKI *et al.*, 2000). O *T. vaginalis* está associado a graves implicações de saúde, uma vez que há evidências de que ele aumenta a suscetibilidade ao vírus HIV (*human immunodeficiency virus*) e, conseqüentemente, à ocorrência da AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*), sendo considerado um expansor da porta de saída para o vírus em pacientes aidséticos e um agente facilitador da infecção em pacientes ainda não infectados pelo vírus (LAGA *et al.*, 1993; SORVILLO e KERNDT, 1998; SORVILLO *et al.*, 2001).

Considera-se que a mais significativa complicação gerada pelo *T. vaginalis* é a facilitação da contaminação por HIV, em até 2 vezes (LAGA *et al.*, 1993; MCCLELLAND *et al.*, 2007). Essa consideração está fundamentada nos seguintes aspectos: (i) a infecção com *T. vaginalis* resulta em resposta inflamatória que leva ao recrutamento de linfócitos CD4 e macrófagos à mucosa vaginal e cervical (LEVINE *et al.*, 1998); (ii) o parasito causa pontos hemorrágicos na cérvix e endo cérvix, comprometendo a barreira mecânica à aquisição do HIV (GILBERT *et al.*, 2000); (iii) elevada carga viral é encontrada nos compartimentos seminal e cervico-vaginal de pacientes com tricomonose; finalmente (iv) o parasito aumenta a suscetibilidade à vaginite e promove a colonização com microrganismos estranhos à microbiota bacteriana normal, o que poderia também facilitar a contaminação pelo HIV (MOODLEY *et al.*, 2002). Ainda, a presença de *T. vaginalis* duplica o risco de infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) (SHEW *et al.*, 2006) e também pelo herpes vírus (GOTTLIEB *et al.*, 2004).

Homens com tricomonose são, na maioria das vezes, assintomáticos, o que facilita a transmissão da doença, e podem ter somente uma infecção auto-limitada (KRIEGER *et al.*, 1993; LEHKER e ALDERETE, 2000). Por outro lado, nas mulheres o sintoma clássico da doença, embora ocorra em somente 10-20% das pacientes infectadas, é corrimento amarelo, abundante, espumoso e mucopurulento, além de odor vaginal anormal e prurido vulvar (LEHKER e ALDERETE, 2000). A vagina e a cérvix podem apresentar sintomas inflamatórios específicos para a tricomonose, com erosão e pontos hemorrágicos na parede cervical, sinal conhecido como *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango, ainda que este quadro clínico ocorra em apenas 2 a 5% dos casos (MILER *et al.*, 2005).

A prevalência da tricomonose varia de acordo com a localização geográfica, o local do estudo (comunidades ou em clínicas de saúde), a presença ou ausência de sintomas, a população estudada, de acordo com o grupo étnico, idade e sexo, e o método de diagnóstico empregado (JOHNSTON e MABEY, 2008). Ao contrário de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* a prevalência de *T. vaginalis* é maior em homens e mulheres com mais idade (BOWDEN *et al.*, 1999; MILER *et al.*, 2005), o que talvez seja justificado pelas infecções assintomáticas e a persistência de infecções não-tratadas. Em locais industrializados a prevalência de *T. vaginalis* demonstra variação de acordo com o grupo étnico, sendo mais prevalente em mulheres e homens negros e americanos quando comparado às mulheres e homens brancos ou asiáticos (MILER *et al.*, 2005). Profissionais do sexo, detentos do regime prisional e usuários de drogas intravenosas podem ser considerados grupos de risco (JOHNSTON e MABEY, 2008).

Alguns estudos demonstram uma elevada ocorrência de re-infecção, principalmente em grupos de risco, as quais são assintomáticas em muitos casos (FORTENBERRY *et al.*, 1999; MILER *et al.*, 2005; PETERMAN *et al.*, 2006). Outro dado relevante é que apenas 2% dos homens e 2,3% das mulheres descreveram sintomas da tricomonose durante o estudo (MILER *et al.*, 2005). Sabe-se que 71,7% dos homens norte-americanos parceiros de mulheres com tricomonose apresentam o parasito, sendo a maioria deles assintomático (SENA *et al.*, 2007, SUTTON *et al.*, 2007).

O tratamento contra tricomonose permanece o mesmo há anos: uso de metronidazol via oral, com dose única de 2 g ou com duas ingestões diárias de 500 mg durante 7 dias, sendo que a posologia em dose única demonstra melhores resultados (HUPPERT, 2009). Em 2004 a agência regulatória norte-americana FDA aprovou também o uso do tinidazol, outro nitroimidazólico, para tratamento da infecção por *T. vaginalis* com dose única de 2 g, via oral. O uso tópico de metronidazol reduz os sintomas locais em mulheres com tricomonose, mas se apresenta falho na resposta terapêutica em mais de 50% dos casos (HUPPERT, 2009). Durante a gestação o tratamento contra a tricomonose não é aconselhado, uma vez que oferece risco à saúde do feto e não produz resultados que justifiquem o uso (KLEBANOFF *et al.*, 2001; KIGOZI *et al.*, 2003).

O metronidazol, assim como os demais fármacos da mesma classe, entra na célula por difusão e tem o grupamento nitro reduzido através da enzima piruvato ferredoxina óxido redutase (PFOR), em *T. vaginalis* localizada nos hidrogenossomos. Essa redução produz intermediários instáveis que ao quelar o DNA provocam a morte seletiva das células anaeróbias suscetíveis.

A ocorrência de isolados de *T. vaginalis* resistentes ao metronidazol é preocupante, uma vez que apenas outros fármacos da mesma classe terapêutica (nitroimidazol) estão disponíveis. O mecanismo de resistência anaeróbica ao metronidazol também é controlado pelos hidrogenossomos, onde o fármaco compete com o H⁺ como um aceptor de elétrons. Nos parasitos resistentes o nível das enzimas hidrogenossomais está reduzido drasticamente, o que elimina a habilidade do parasito ativar o metronidazol (LAND *et al.*, 2004). O tinidazol tem meia-vida plasmática duas vezes maior que o metronidazol, apresentando menos efeitos adversos com a mesma dose terapêutica de 2 g (SAWYER *et al.*, 1976). Um estudo onde 20 pacientes refratários ao tratamento com metronidazol foram tratados com tinidazol mostrou uma taxa de cura de 92%, caracterizando o tinidazol como uma alternativa em casos de resistência ao tratamento usual (SOBEL *et al.*, 2001). Ainda assim, a dependência de uma única classe terapêutica para o tratamento da tricomonose inspira cuidados e a

investigação de novos agentes tricomonicidas que atuem por um mecanismo de ação distinto deve ser incentivada.

A diversidade química dos produtos naturais bem como suas reconhecidas propriedades farmacológicas juntamente com dados etnofarmacológicos os torna candidatos em potencial para contribuir com essa busca. Esse conjunto de características sugere o parasito *T. vaginalis* como um importante alvo de estudos de novas moléculas, não só pela riqueza de informações bioquímico-celulares a ser proporcionada, mas também pelo fato deste patógeno estar associado a uma ampla gama de implicações na saúde humana.

I.2.3. Interação parasito-hospedeiro

A interação *T. vaginalis*-hospedeiro é um processo complexo, no qual estão envolvidos componentes associados à superfície celular do parasito, às células epiteliais do hospedeiro e também componentes solúveis encontrados nas secreções vaginal e uretral (LEHKER e ALDERETE, 2000). Esse patógeno atinge o parasitismo com sucesso através de vários mecanismos, porém a capacidade de citoaderência é uma das principais vias. O *T. vaginalis* precisa aderir às células epiteliais do hospedeiro para estabelecer e manter a infecção e isso é possível devido à presença de adesinas no denso glicocálix do parasito (ALDERETE *et al.*, 1995; ENGBRING e ALDERETE, 1998; BASTIDA-CORCUERA *et al.*, 2005) que parecem interagir com as células do hospedeiro via interações do tipo receptor-ligante (KUCKNOOR *et al.*, 2005). Cerca de quatro moléculas antigênicas de superfície estão relacionadas também à adesão do parasito às células epiteliais vaginais e essas moléculas têm sua expressão regulada durante o ataque às células do hospedeiro (ARROYO *et al.*, 1993; GARCIA e ALDERETE, 2007). Ainda, os mesmos autores sugerem que o parasito assume um formato “achatado” que possibilita uma adesão laminar à superfície da célula epitelial. A partir do genoma de *T. vaginalis* foram identificadas 8 famílias totalizando aproximadamente 800 proteínas que parecem estar localizadas na superfície celular e envolvidas com sua patogenicidade (CARLTON *et al.*, 2007). Após a fase de citoaderência, o parasito se torna amebóide, com estreito contato célula-célula (neste caso *T. vaginalis* e célula epitelial vaginal) e formação de projeções citoplasmáticas

que interdigitam com as células alvo (BENCHIMOL, 2004). Neste processo ocorre a aquisição de nutrientes através de receptores específicos, assim como captação de lipoproteínas encontradas no soro ou em secreções vaginais (PETERSON e ALDERETE, 1984). Em resposta a fatores ambientais, tais como concentrações de ferro e cálcio, o parasito alterna a expressão coordenada de genes de virulência (CROUCH *et al.*, 2001). Ainda, a interação *T. vaginalis*-hospedeiro modula a expressão gênica de proteínas funcionais das células hospedeiras associadas à manutenção da estrutura celular, componentes da matriz extracelular, moléculas pró-inflamatórias e pró-apoptóticas (KUCKNOOR *et al.*, 2005).

Após a colonização do sítio de infecção pelo parasito, o escape da resposta imune do hospedeiro por distintos mecanismos torna-se fundamental para o estabelecimento do parasitismo. Ocorre um revestimento da superfície do tricomonas com proteínas e macromoléculas do hospedeiro, evitando assim, o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (PETERSON e ALDERETE, 1982). Outra estratégia é a degradação de imunoglobulinas e fatores do sistema complemento do hospedeiro, através da secreção de cisteína-proteinases, (PROVENZANO e ALDERETE, 1995), e remoção dos lactobacilos imediatamente após a infecção por *T. vaginalis* (através de fagocitose), anulando o efeito protetor da microbiota normal produtora de peróxido de hidrogênio, que é capaz de neutralizar as cisteína-proteases (RENDÓN-MALDONADO *et al.*, 1998). Além disso, o parasito lança mão do mecanismo de variação fenotípica, pela alternância da expressão de antígenos de superfície, como a proteína imunogênica P270 (ALDERETE *et al.*, 2007).

Outro enfoque importante quando consideramos a interface parasito-hospedeiro é a modulação dos níveis de ATP extracelular *versus* adenosina pelo parasito no ambiente da infecção. O ATP é liberado por células em situação de estresse ou injúria tecidual, atuando como um imunomediador pró-inflamatório que recruta células imunes efetoras como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos (BOURS *et al.*, 2006). A capacidade do *T. vaginalis* em degradar o ATP, reduzindo os níveis extracelulares e fornecendo adenosina, um composto com propriedades anti-

inflamatórias e essencial para a sobrevivência do patógeno, pode contribuir para a manutenção do parasitismo e o escape da resposta imune do hospedeiro.

I.2.3.1. Sistema purinérgico - NTPDase e ecto-5'-nucleotidase

Os nucleotídeos extracelulares podem ser inativados por hidrólise via ectonucleotidases e, desde a identificação do ATP em 1929, um grande número de enzimas foi caracterizado em plantas, bactérias, parasitos e em células de mamíferos, apresentando envolvimento na sinalização celular (PLESNER, 1995). As ectonucleotidases são enzimas localizadas na superfície celular envolvidas na via de hidrólise extracelular de nucleotídeos. Essas enzimas incluem a família E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase), a família E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), ecto-5'-nucleotidase e fosfatases alcalinas (**Figura 4**) (ZIMMERMANN, 2001).

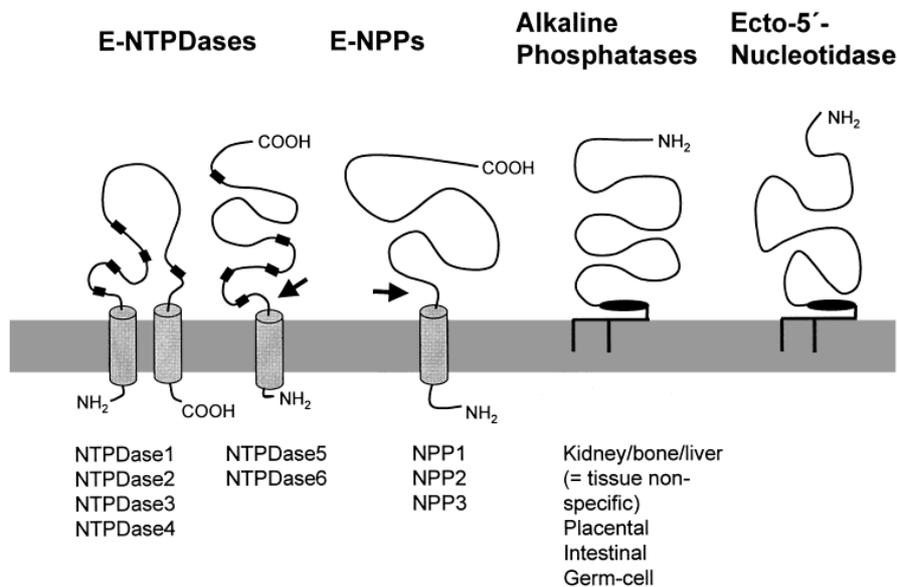


Figura 4: Topografia de membrana das E-NTPDases e da ecto-5'-nucleotidase. (Adaptado de ZIMMERMAN, 2001).

A família E-NTPDase é composta por enzimas denominadas nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (NTPDase) e classificadas como NTPDase 1 a 3 e 8, localizadas na superfície da célula e NTPDase 4 a 7, situadas intracelularmente. Os

sítios catalíticos dessas enzimas estão voltados para o meio extracelular ou para o lúmen de organelas intracelulares, tais como o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático ou lisossomos (ZIMMERMAN, 2001). Essas enzimas apresentam ampla especificidade a substratos, hidrolisando nucleosídeos 5'-di e 5'-trifosfatados, mas não apresentam hidrólise de nucleosídeos monofosfatados e compostos de éster de fosfato (**Figura 4**) (SARKIS *et al.*, 1995; ZIMMERMANN, 2001). Uma variedade de nucleosídeos 5'-monofosfatados tais como AMP, CMP, UMP, IMP e GMP são hidrolisados pela enzima glicoproteica ecto-5'-nucleotidase (ZIMMERMANN, 1996). Essa enzima pode ser encontrada na forma solúvel citoplasmática e também na forma ligada à membrana, ancorada a glicofosfatidil inositol (GPI), sendo esta forma localizada na superfície das células fundamental para a cascata que hidrolisa completamente ATP extracelular à adenosina (WANG e GUIDOTTI, 1996; SMITH e KIRLEY, 1998; BIEDERBICK *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2001; BIGONNESE *et al.*, 2004).

Em sítios de infecção, estresse tecidual ou injúria o ATP intracelular é liberado para o meio extracelular elevando a concentração dos nucleotídeos extracelulares, os quais atuam como “sinalizadores de dano” para o sistema imune, contribuindo para a inflamação e eliciação da resposta imune (SAMSON *et al.*, 2008). O ATP extracelular (e-ATP) pode ser citotóxico a várias linhagens celulares, exceto aquelas que são aptas a degradá-lo através de expressiva atividade enzimática extracelular (FILLIPINI *et al.*, 1990). Após a liberação celular, ATP e outros nucleotídeos são imediatamente degradados por ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 2006).

Muitos efeitos pró-inflamatórios do ATP em específicas populações celulares envolvidas com o sistema imune podem ser revertidos pela adenosina (HANLEY *et al.*, 2004; BOURS *et al.*, 2006; JUNGER, 2008). A adenosina extracelular apresenta importantes implicações fisiológicas, como (i) redução da geração de espécies reativas de oxigênio; (ii) inibição da degranulação dos neutrófilos; (iii) geração de diversos mediadores inflamatórios e (iv) inibição da adesão de neutrófilos às células endoteliais vasculares (HANLEY *et al.*, 2004). Os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares podem agir como compostos sinalizadores por se ligarem a receptores específicos,

conhecidos como purinoceptores. Os receptores de adenosina, ou receptores P1, são divididos em 4 subtipos, A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, todos ligados a proteínas G. Os receptores P2 reconhecem ATP, ADP, UTP e UDP e são classificados em P2X, que são canais iônicos, e P2Y, receptores associados a proteínas G (BURNSTOCK, 2007).

As funções fisiológicas sugeridas para essas enzimas decorrem da regulação dos receptores purinérgicos que reconhecem ATP ou adenosina e da salvação de adenosina extracelular através da hidrólise sequencial de ATP a AMP pelas NTPDases, posteriormente AMP à adenosina pela ecto-5'-nucleotidase e subsequente transporte através de transportadores de nucleosídeos (HANDA e GUIDOTTI, 1996). Assim, o sistema purinérgico constitui uma rede de sinalização celular que emprega purinas (principalmente ATP e adenosina) e pirimidinas como moléculas sinalizadoras, as quais podem ser inativadas pelas ectonucleotidases ou recaptadas pelas células através de transportadores ou podem ligar-se aos purinoceptores (BURNSTOCK e VERKHRATSKY, 2009).

As atividades da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase foram identificadas em *T. vaginalis* e podem estar envolvidas em mecanismos relacionados a interações parasito-hospedeiro controlando os níveis de ATP e adenosina (MATOS *et al.*, 2001; MUNAGALA e WANG, 2003; TASCA *et al.*, 2003; TASCA *et al.*, 2005). Essa cadeia enzimática presente em *T. vaginalis* modula os níveis de nucleotídeos extracelulares e pode contribuir para os mecanismos de escape do parasito através da degradação do ATP e para a produção de adenosina necessária para a sobrevivência e crescimento do parasito. Dois genes ortólogos de NTPDase foram identificados em *T. vaginalis* e a expressão pode ser um parâmetro importante na investigação da hidrólise dos nucleotídeos após tratamento com moléculas citotóxicas (SANSOM *et al.*, 2008). Portanto, a NTPDase e a ecto-5'-nucleotidase podem ser consideradas como alvos potenciais para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas à tricomonose, ainda porque as enzimas humanas parecem ter baixa homologia àquelas dos tricomonas. No que tange este trabalho e de acordo com o exposto nos objetivos será avaliado o efeito dos alcaloides candimina e licorina na atividade enzimática da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis*.

I.2.4. Poliaminas

As poliaminas putrescina, espermina e espermidina (**Figura 5**) são biomoléculas catiônicas constitutivas e essenciais para diversas funções integrando síntese macromolecular, proliferação celular e diferenciação em todos os organismos vivos (BACCHI e YARLETT, 2002; HEBY *et al.*, 2003; WALLACE *et al.*, 2003).

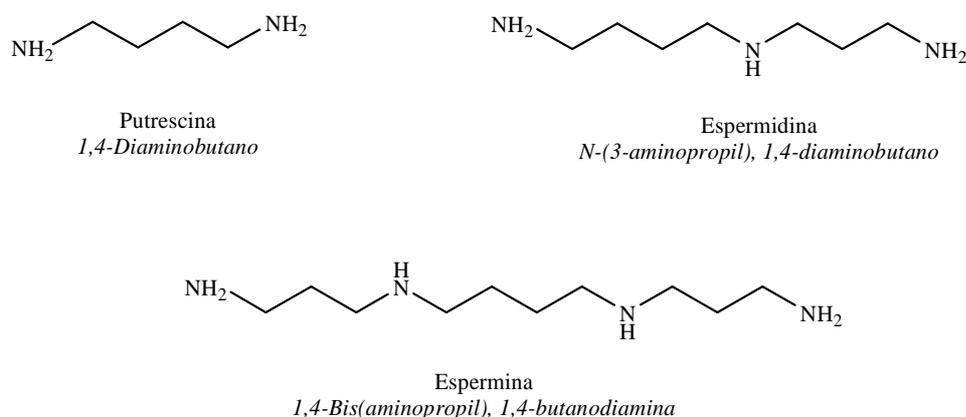


Figura 5: Representação das estruturas das poliaminas putrescina, espermina e espermidina.

Sob condições fisiológicas o papel das poliaminas é atribuído, tanto em parasitos quanto em hospedeiros, à facilidade de protonação dos seus grupos amino ou imino que se tornam catiônicos no pH intracelular. Dessa maneira, as poliaminas interagem espontaneamente com macromoléculas aniônicas, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, participando de muitos processos celulares (REGUERA *et al.*, 2005). Todos os protozoários parasitos contêm poliaminas que, juntamente com suas enzimas associadas, estão atraindo a atenção como alvo de novas terapias antiparasitárias, uma vez que há insucesso na interferência com o metabolismo de poliaminas em células de mamíferos (MULLER *et al.*, 2001). Considerando que os parasitos têm vias ou necessidades de poliaminas distintas daquelas das células mamíferas, então modulando essa via central espera-se consequências mais graves para o parasito em relação ao hospedeiro.

Todos os vertebrados e eucariotos primitivos, como a maioria dos parasitos e os fungos, sintetizam *de novo* as poliaminas a partir de dois aminoácidos precursores: *L*-ornitina e *L*-metionina: (i) a putrescina é sintetizada pela ornitina descarboxilase (ODC); (ii) espermidina é obtida pela condensação da putrescina com o amino-propil da descarboxi-*S*-adenosilmetionina e (iii) a espermina, em mamíferos, provém da espermidina com um segundo grupo amino-propil, através da espermina sintase (REGUERA *et al.*, 2005). A importância da putrescina na sobrevivência de *Tritrichomonas foetus* foi investigada através do uso de análogo dessa poliamina: 1,4-diamino-2-butanona (DAB) (REIS *et al.*, 1999). Esse estudo revelou que em presença de DAB (i) houve um atraso no ciclo celular do parasito, refletido pela inibição do crescimento *in vitro* do *T. foetus*; (ii) os níveis de putrescina, espermina e espermidina foram reduzidos, em comparação aos trofozoítos não tratados e (iii) os hidrogenossomos foram progressivamente degradados indicando que a presença de poliaminas estaria relacionada à proteção e estabilização da membrana hidrogenossomal. De acordo com alguns autores, a putrescina pode atuar como um tampão na manutenção do pH intracelular, participar do processo de estresse oxidativo além de auxiliar na supressão da resposta inflamatória do hospedeiro, o que pode determinar o sucesso da infecção (YARLETT e BACCHI, 1988; 1994).

Ao contrário da maioria dos eucariotos, *T. vaginalis* não sintetiza espermina pela via *de novo*; a recaptação dessa poliamina ocorre via um co-transportador de espermina-putrescina que resulta no efluxo de duas moléculas de putrescina e influxo de uma molécula de espermina (YARLETT e BACCHI, 1994). Dessa forma, o uso de análogos da putrescina poderia inativar esse sistema, impedindo a captação de espermina exógena. Da mesma maneira, análogos das poliaminas espermina e espermidina ocasionariam danos ao parasito uma vez que não podem ser sintetizadas, apenas captadas do meio extracelular, apontando para o uso de análogos de poliaminas como alternativa terapêutica contra a tricomonose. O metabolismo das poliaminas em *T. vaginalis* consome cerca de 10% da energia do parasito durante o crescimento *in vitro*. O papel das poliaminas em relação à virulência do parasito e em relação à patogenicidade durante a infecção permanece por ser investigados (YARLETT e

BACCHI, 1994). GARCIA e colaboradores (2005) sugerem que o metabolismo das poliaminas e a secreção de putrescina estão relacionados à aderência às células do hospedeiro e citotoxicidade. Alguns análogos de poliaminas demonstraram potencial de inibição da biossíntese de poliaminas em *T. vaginalis* (BREMNER *et al.*, 1987; REIS *et al.*, 1999; GARCIA *et al.*, 2005), mas o reflexo dessa inibição na virulência do parasito permanece indefinido.

Os análogos estruturais são promissoras alternativas para interferir no metabolismo das poliaminas uma vez que eles podem apresentar múltiplos efeitos, como na biossíntese e captação, além de agirem nos sítios de ligação das poliaminas originais (MULLER *et al.*, 2001). A importância das poliaminas na busca de alternativas terapêuticas pode ser representada pela ocorrência de congressos específicos sobre o tema, como por exemplo, “*Polyamine Metabolism of Parasitic Protozoa as a Drug Target*”, ocorrido no Texas em 2002.

I.3. OBJETIVOS

Considerando os produtos naturais como fonte de importantes compostos bioativos e o potencial farmacológico dos alcaloides de Amaryllidaceae os objetivos gerais deste trabalho são: (i) avaliação da atividade anti-*Trichomonas vaginalis*, com a proposição do mecanismo de ação de alcaloides de Amaryllidaceae pertencentes aos dois protótipos do núcleo A: licorina (alcaloide licorina) e homolicorina (alcaloide candimina); e (ii) semi-síntese de derivados do alcaloide licorina e avaliação da influência da hibridização com diaminas na atividade tricomonocida.

Assim, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. caracterizar a estrutura da candimina isolada de *Hippeastrum morelianum* Lem.;
2. testar o efeito da licorina em *T. vaginalis* e inferir seu mecanismo de ação;
3. testar o efeito da candimina em *T. vaginalis* e inferir seu mecanismo de ação;

4. investigar o efeito da licorina e candimina na hidrólise extracelular dos nucleotídeos em *T. vaginalis*;
5. verificar o potencial anti-*T. vaginalis* de análogos de poliaminas;
6. investigar a relação estrutura-atividade de diaminas;
7. realizar a semi-síntese da licorina e diaminas, e a avaliação da influência na atividade anti-*T. vaginalis*.

II.I. CAPÍTULO 1 - Raquel B. Giordani, Jean P. de Andrade, Hugo Verli, Julie H. Dutilh, Amélia T. Henriques, Strahil Berkov, Jaume Bastida, José Angelo S. Zuanazzi. Unequivocal assignments of alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae).

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Resonance Magnetic in Chemistry*.

Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae)

Raquel B. Giordani,¹ Jean P. de Andrade,³ Hugo Verli,^{1,2} Julie H. Dutilh,⁴ Amélia T. Henriques,¹ Strahil Berkov,³ Jaume Bastida,³ José Angelo S. Zuanazzi^{1}*

1. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avda. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avda. Bento Gonçalves, 91500-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Department de Productes Naturals, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal, 643, E-08028 Barcelona, Spain.

4. Departamento de Botânica, Universidade de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

* **Corresponding author.** Phone: +55 51 3308-5450. Fax: +55 51 3308-5243. E-mail: zuanazzi@farmacia.ufrgs.br.

Abstract

Amaryllidaceae family has proven to be plentiful sources for therapeutic agents. Hence, the isolation, biology and chemistry of the Amaryllidaceae alkaloids make an important subject. To date, nearly 500 structurally diverse alkaloids have been isolated from some Amaryllidaceae plants and this number increase every year. As part our ongoing project, we report the phytochemical study in Amaryllidaceae specie *Hippeastrum morelianum* Lem.: the isolation of the 2 α ,7-dimethoxyhomolycorine (**1**), a new homolycorine-type alkaloid, and candimine (**2**), an unusual homolycorine-type alkaloid from lactone serie, besides of another six known alkaloids: tazettine, pretazettine, 3-epimacronine, haemanthamine, hamayne and trisphaeridine. Additionally, in order to provide a set of data allowing the adjustment of old literature assignment, the most stable conformation of candimine was evaluated through molecular modeling studies and NMR coupling constants. Therefore, for reference purpose it is useful to report unequivocally the NMR of these compounds based on modern 2D NMR measurements including ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H NOESY, HMBC and HMQC.

Key words

NMR; 2 α ,7-dimethoxyhomolycorine; candimine; homolycorine-type alkaloids; molecular modeling; *Hippeastrum morelianum*; Amaryllidaceae

II.II. CAPÍTULO 2 Raquel B. Giordani, Patrícia B. Vieira, Marina Weizenmann, Denis B. Rosemberg, Ana P. Souza, Cristina Bonorino, Geraldo A. De Carli, Maurício R. Bogo, José A. Zuanazzi, Tiana Tasca. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. **Phytochemistry** (submetido).

Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway

Raquel B. Giordani^a, Marina Weizenmann^a, Patricia de Brum Vieira^a, Denis Broock Rosemberg^b, Ana Paula Souza^c, Cristina Bonorino^c, Geraldo Attilio De Carli^d, Mauricio Reis Bogo^e, José Angelo Zuanazzi^a, Tiana Tasca^{a*}.

a. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

b. Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

c. Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

d. Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

e. Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12C –Sala 172, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

*** Corresponding Author**

Tel.: +55-51-3308-5325; fax: +55-51-3308-5437.

E-mail address: tiana.tasca@ufrgs.br (T. Tasca).

Abstract

Investigations regarding the cytotoxic mechanisms of the Amaryllidaceae alkaloid, lycorine, indicate a promising selective cell-type-dependent cytotoxicity on tumor cells. Its mechanism of action in eukaryotic cells has, thus far, been reported to involve the interruption of the cell cycle and mitochondrial pathways. *Trichomonas vaginalis* is a parasite that causes trichomonosis, the number one non-viral sexually-transmitted disease in the world. However, whilst *T. vaginalis* is a prime pathogenic target, its lack of mitochondria makes it a suitable biochemical model for the study of cell death-related mechanisms. In this study, we investigated the mechanism of action of the pro-apoptotic alkaloid, lycorine, on an amitochondriate cell. The cytotoxicity of lycorine to *T. vaginalis* was verified with a dose-response curve and kinetic growth assay, from 2.5 to 1000 μM . Several important ultrastructural alterations were assessed by electronic microscopy and no characteristics suggestive of apoptosis, such as apoptotic bodies, were observed. Additionally, DNA fragmentation and membrane phosphatidylserine exposure were not detected. Analysis by flow cytometry showed that lycorine arrests the *T. vaginalis* cell cycle. We postulate that the pro-apoptotic alkaloid, lycorine, causes cell death in the amitochondriate *T. vaginalis* by a mechanism of action that fails to completely fulfill the criteria for apoptosis. However, some similarities were observed to paraptotic cell death.

Keywords: *Hippeastrum morelianum*; Amaryllidaceae; alkaloids; lycorine; cell death pathway; parasite; amitochondriate; *Trichomonas vaginalis*.

II.III. CAPÍTULO 3 - Raquel B. Giordani, Patrícia de Brum Vieira, Marina Weizenmann, Denis B. Rosemberg, Ana Paula Souza, Cristina Bonorino, Geraldo Attilio De Carli, Mauricio Reis Bogo, José Angelo Zuanazzi, Tiana Tasca. Cell death candimine-induced in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Natural Products** (submetido).

Cell death candimine-induced in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*

Raquel Brandt Giordani,[†] Patrícia de Brum Vieira,[†] Marina Weizenmann,[†] Denis Broock
Rosemberg,[‡] Ana Paula Souza,[§] Cristina Bonorino,[§] Geraldo Attilio De Carli,[¶] Mauricio
Reis Bogo,[°] José Angelo Zuanazzi,[†] Tiana Tasca^{†*}

[†] Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752,
90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

[‡] Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua
Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

[§] Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,
Av. Ipiranga 6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

[¶] Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,
Av. Ipiranga 6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

[°] Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12C –Sala 172, 90619-900, Porto Alegre, RS,
Brazil.

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +55-51-3308-5325. Fax: +55-51-3308-
5437. E-mail address: tiana.tasca@ufrgs.br (T. Tasca).

TITLE RUNNING HEAD (Cell death candimine-induced in the *T. vaginalis*).

Trichomonas vaginalis is a unicellular eukaryote that parasitizes the human genito-urinary tract and causes trichomonosis. The clinical presentation is mainly problematic in women, where it may be asymptomatic or causes severe vaginitis and cervicitis. *T. vaginalis* does not present mitochondria and it is recognized as a non-classical model organism to investigate undetected molecular pathways and better-define morphological types of cell death. The antiproliferative and cytotoxic effects of the Amaryllidaceae alkaloids are well known. Candimine is an unusual homolycorine-type alkaloid and no detailed investigation of the cytotoxic activity of compounds from this chemical nucleus was reported so far; thus, we chose this alkaloid to perform our study. We showed that candimine is cytotoxic against *T. vaginalis* and induces cell death by an unprecedented group of features that fails to fulfill the criteria for apoptosis and apoptosis-like already reported to trichomonads. Expressive and important kinetic, cellular, and ultrastructural alterations on candimine treated-trophozoites were observed as well as some similarities to paraptosis cell death, described for multicellular organisms. The present findings suggest an unprecedented mechanism of action of the Amaryllidaceae alkaloids and contribute both to pharmacologic approaches and to *Trichomonas*'s cell biology.

II.IV. CAPÍTULO 4 - Raquel B. Giordani, Marina Weizenmann, Denis B. Rosemberg, Geraldo Attilio De Carli, Mauricio Reis Bogo, José Angelo Zuanazzi, Tiana Tasca. *Trichomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5`-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. **Parasitology International** 2010; 59:226-231.

***Trichomonas vaginalis* ecto-nucleotidases pathway is altered by lycorine and candimine**

Raquel B. Giordani^a, Marina Weizenmann^a, Denis Broock Rosemberg^b, Geraldo Attilio De Carli^c, Mauricio Reis Bogo^d, José Angelo Zuanazzi^a, Tiana Tasca^a.

a. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

b. Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

c. Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

d. Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12C –Sala 172, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author

Tel.: +55-51-3308-5325; fax: +55-51-3308-5437. *E-mail address:*
tiana.tasca@ufrgs.br (T. Tasca).

Abstract

Drug discovery from plants has played an important role in the pharmaceutical therapy field and the alkaloids lycorine and candimine are candidates for this purpose. *T. vaginalis* is a parasite that infects the human urogenital tract and causes trichomonosis, the most prevalent non-viral sexually transmitted disease. Ecto-nucleotidases including nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), which hydrolyses extracellular ATP and ADP, and ecto-5'-nucleotidase, which hydrolyses AMP, have been characterized in *T. vaginalis*. Considering that purine nucleotides are released from cells under physiological and stress conditions, the aim of this study was to evaluate the effect of lycorine and candimine on the *T. vaginalis* ecto-nucleotidases pathway. The alkaloids were tested against both long-term-grown and clinical isolates, in a concentration range from 50 to 250 μ M. When the alkaloids were added directly to the reaction mixture no effect on ATP, ADP or AMP hydrolysis could be observed. In contrast, *T. vaginalis* NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities were greatly inhibited by candimine and lycorine after 24h treatment. This effect was annulled when the trophozoites 24h treated were inoculated in a clean culture medium, without alkaloid. The transcript levels for NTPDase 441 or 434 were not altered by the alkaloids, after 24h incubation. Our data show that candimine and lycorine can affect the *T. vaginalis* ecto-nucleotidases pathway, suggesting that the extracellular nucleotide levels could be modulated by these alkaloids. Considering the cytotoxic and proinflammatory role of ATP besides the anti-inflammatory effects of adenosine, this regulation could be relevant in increasing susceptibility of *T. vaginalis* to host immune response in presence of lycorine and candimine.

Keywords

Candimine; Lycorine; Ecto-nucleotidases; NTPDase; Ecto-5'-nucleotidase; *Trichomonas vaginalis*.

II.V. CAPÍTULO 5 - Raquel B. Giordani, Mauro V. de Almeida, Ederson Fernandes, Cristiane França da Costa, Geraldo A. De Carli, Tiana Tasca, José Angelo S. Zuanazzi. Anti-*T. vaginalis* activity of synthetic lipophilic diamine and aminoalcohol derivatives.
Biomedicine and Pharmacotherapy 2009; 63:613-617

Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of synthetic lipophilic diamine and amino alcohol derivatives

Raquel B. Giordani ^a, Mauro Vieira de Almeida ^b, Ederson Fernandes ^b, Cristiane França da Costa ^b, Geraldo A. de Carli ^c, Tiana Tasca ^a, José A. S. Zuanazzi ^{a,*}

a. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

b. Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Martelo, 36033-380, Juiz de Fora, MG, Brazil.

c. Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author.

Tel./Fax: +55 51 33085437. E-mail adress: zuanazzi@farmacia.ufrgs.br.

Abstract

Taking in account the increased prevalence of metronidazole-resistant infections, alternative drugs are necessary for the treatment of trichomonosis. We report in this work the preparation and the *in vitro* anti-trichomonads activity of two diamines **1** and **2**, and three different lipophilic amino alcohol derivatives **3**, **4** and **5**. These compounds were tested for *in vitro* activity against two isolates of *Trichomonas vaginalis* and displayed inhibition of the parasite growth. Five concentrations of each compound were tested. The butanediamine derivative **1**, at a final concentration of 5.85 μM , presented a cytotoxic effect against 47% of *T. vaginalis* trophozoites. Furthermore, the cytotoxicity of **1** did not present statistically significant difference when compared to metronidazole in the same range of concentration (0.1 – 1.5 $\mu\text{g/ml}$).

II.VI. CAPÍTULO 6 - Raquel B. Giordani, Cristiane França da Costa, Mariana Duarte, Tiana Tasca, José Angelo Zuanazzi, Mauro Vieira de Almeida, Anti-protozoal activity of diamine derivatives. **Biomedicine and Pharmacotherapy** (submetido)

Anti-protozoal activity of diamine derivatives

Raquel B. Giordani,^a Débora Pereira Araújo,^b Mariana Duarte,^a Tiana Tasca,^a José Ângelo Zuanazzi,^a Mauro V. de Almeida.^{b,*}

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil.

* Corresponding author.

De Almeida M. V. (mauro.almeida@ufjf.com.br). Fone/Fax. +55 32 32293310.

Abstract

Ten *N*-monoalkylated diamines were synthesized and evaluated for *in vitro* activities against *Trichomonas vaginalis* and *Giardia lamblia*. Several compounds displayed a good inhibition of parasite growth, with MIC \leq 20 $\mu\text{g/mL}$. *N*-hexadecyl-1,4-butanediamine was found to be the most active compound *in vitro* against *T. vaginalis* with MIC of 2.5 $\mu\text{g/mL}$, twice more active in comparison to the reference drug metronidazole (MTZ). Seven of the studied compounds showed a better anti-*G. lamblia* activity than MTZ.

II.VII. CAPÍTULO 7 – Síntese e avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* de derivados da licorina.

As atividades relacionadas à síntese orgânica deste trabalho foram desenvolvidas no laboratório do Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida, Instituto de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

1. Introdução

O efeito anti-*T. vaginalis* da licorina e da candimina pode ser considerado moderado uma vez que a dose citotóxica é elevada e na ordem de micromolar. Com o objetivo de melhorar a atividade observada, a licorina, por ser o alcaloide mais comumente encontrado nas Amaryllidaceae e, portanto, de fácil obtenção quando comparado à candimina, foi escolhida como material de partida visando a obtenção de análogos mais ativos. Diante das características bioquímicas do parasito o metabolismo das poliaminas pode ser identificado como um alvo importante para atuação de moléculas citotóxicas e os análogos das poliaminas constitutivas, interessantes moléculas para serem hibridizadas com a licorina.

Diaminas e aminoálcoois similares às poliaminas putrescina, espermina e espermidina despertam interesse na investigação do aperfeiçoamento da atividade anti-*T. vaginalis* apresentada pela licorina uma vez que diversos trabalhos já demonstraram a ação dessas moléculas (CALAS *et al.*, 2000; DEL OLMO *et al.*, 2002; LABADIE *et al.*, 2004; DA COSTA *et al.*, 2009; GIORDANI *et al.*, 2009). A lipofilia é um parâmetro importante no *design* de novos compostos antiparasitários, pois longas cadeias hidrofóbicas podem interagir com os lipídios da membrana, facilitando a penetração dos compostos no citoplasma dos patógenos (HERRMANN *et al.*, 1982; BASSELIN e ROBERT-GERO, 1998; DE OLMO *et al.*, 2002). Assim, o objetivo deste Capítulo VII foi sintetizar derivados da licorina a partir da hibridização com poliaminas e/ou utilização de suas características hidrofóbicas para otimizar a atividade e verificar o efeito na citotoxicidade contra *T. vaginalis* (**Figura 1**).

2. Experimental

2.1. Fonte dos alcaloides

Licorina foi obtida a partir dos bulbos de *Hippeastrum santacatarina* Traub. (Dutilh), conforme procedimento já descrito (GIORDANI, 2007; GIORDANI *et al.*, 2008). Quantidade adicional deste alcaloide foi gentilmente cedida pelo laboratório do professor Dr. Jaume Bastida, Universitat de Barcelona.

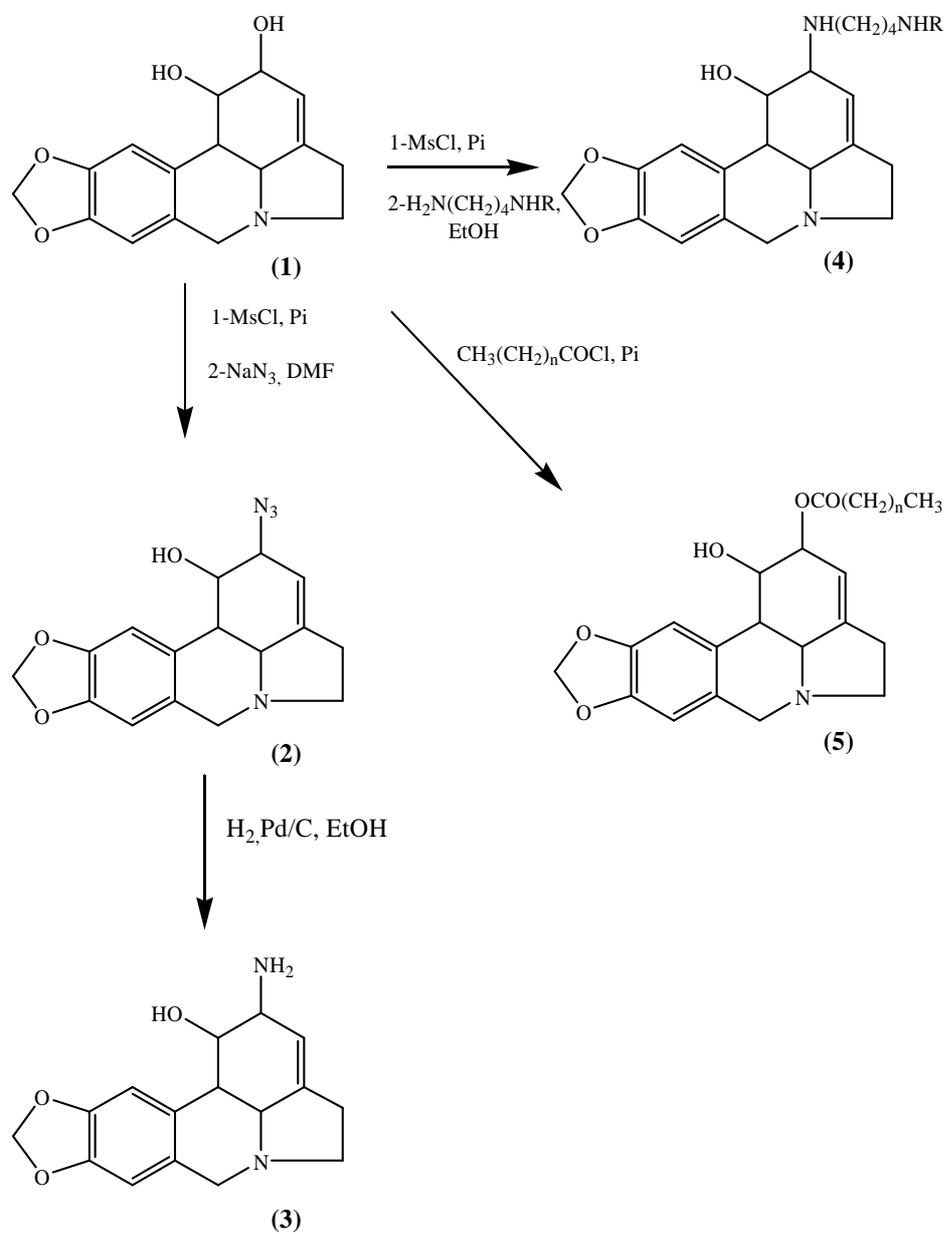


Figura 1: Esquema proposto para semi-síntese dos derivados da licorina.

2.2. Síntese dos derivados da licorina

2.2.1. Mesilação

Licorina (0,105 mmol; 30 mg) e dimetilamino piridina – DMAP (em quantidade catalítica) foram solubilizados em piridina anidra (2 ml), sob agitação à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado, a 0 °C, cloreto de mesila (1 mmol) (**Figura 2**). Após 24h de reação à temperatura ambiente, sob agitação magnética, foi verificado que todo o material de partida havia sido consumido através de cromatografia em camada delgada (CCD) (eluente: diclorometano/metanol, 90/10). A piridina foi removida e o conteúdo retomado em clorofórmio (50 ml). Em seguida foi realizada uma extração líquido-líquido com água gelada saturada com bicarbonato de sódio (3x 15 ml) e o solvente da fase orgânica foi removido. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna, diclorometano/metanol em gradiente de eluição, sem a obtenção do composto desejado.

2.2.2. Tosilação

Licorina (0,105 mmol; 30 mg) e DMAP (em quantidade catalítica) foram solubilizados em piridina anidra (2 ml), sob agitação à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado cloreto de tosila (0,2 mmol), a 0 °C (**Figura 2**). A reação foi monitorada durante 5 dias e não houve o consumo do material de partida nem a formação de produtos, mesmo após aquecimento a 60 °C.

2.2.3. Formação da azida

Aos produtos de reação de mesilação, obtidos sem prévia purificação, foram adicionados dimetilformamida- DMF (3 ml) e azida de sódio em excesso (150 mg) sob agitação a 100 °C (**Figura 2**). Após 7 dias de reação foi verificada alteração do perfil cromatográfico do material de partida através de CCD (eluente: diclorometano/metanol, 90/10). Então, o DMF foi removido e o conteúdo retomado em clorofórmio (50 ml). Em seguida foi realizada uma extração líquido-líquido com água gelada saturada com bicarbonato de sódio (3x 15 ml) e o solvente da fase orgânica foi removido. Essa fração resultante foi purificada por cromatografia em

coluna, diclorometano/metanol em gradiente de eluição. Não foi obtido o produto desejado a partir dessa reação.

2.2.3. Iodação

Licorina (0,105 mmol; 30 mg), iodo metálico (0,157 mmol; 40 mg), imidazol (0,157 mmol; 10,6 mg) e trifenilfosfina (0,157 mmol; 41 mg) foram solubilizados em DMF (5 ml), sob agitação a 90 °C, sob refluxo (**Figura 2**). Após 52h de reação foi verificado que todo o material de partida havia sido consumido através de CCD (eluente: diclorometano/metanol, 80/20). O DMF foi removido e o conteúdo retomado em clorofórmio (50 ml). Em seguida foi realizada uma extração líquido-líquido com água gelada saturada com bissulfito de sódio (3x 15 ml) e o solvente da fase orgânica foi removido. O derivado iodado não foi obtido.

2.2.4. Hidrogenação

Licorina (300 mg; 1 mmol) foi solubilizada em etanol (15 ml), mantida em aparelho de Parr sob a pressão de 4 bar de H₂, durante 24h, e adicionado paládio em quantidade catalítica (**Figura 2**). A reação ocorreu após 24h quando foi verificado o consumo do material de partida através de CCD (eluente: clorofórmio/metanol, 80/20). A mistura reacional foi filtrada e o resíduo rinsado com etanol, clorofórmio a quente e água a quente. Distintos produtos foram recuperados após a reação.

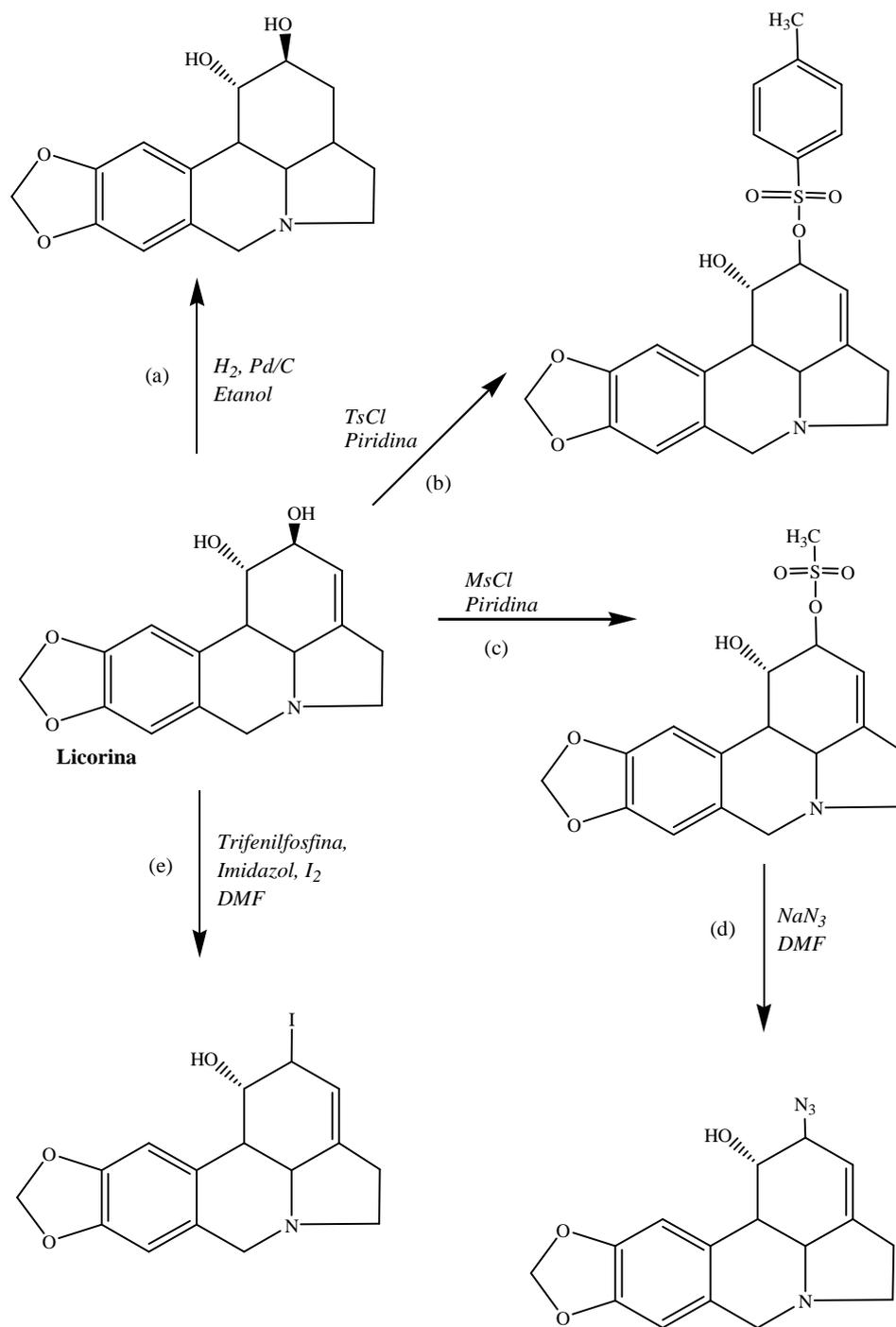


Figura 2: Esquema das reações testadas com licorina. (a) Hidrogenação; (b) Tosilação; (c) Mesilação; (d) Reação com azida sódica; (e) Iodação.

2.2.5. Esterificação

2.2.5.1. Acetilação

De acordo com metodologia previamente descrita, licorina (0,105 mmol; 30 mg) e DMAP (em quantidade catalítica) foram solubilizados em piridina anidra (3 ml), sob agitação à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado anidrido acético (0,53 mmol), a 0 °C (**Figura 3**). Após 24h de reação à temperatura ambiente, sob agitação magnética, foi verificado que todo o material de partida havia sido consumido através de CCD (eluente: diclorometano/metanol, 95/5). A piridina foi removida e o conteúdo retomado em clorofórmio (50 ml). Em seguida foi realizada uma extração líquido-líquido com água gelada (3x 15 ml) e o solvente da fase orgânica foi removido. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna, diclorometano/metanol em gradiente de eluição, fornecendo 25 mg (0,05 mmol) do composto (**7a**) em 62,5% de rendimento.

2.2.5.2. Esterificação com cloreto de ácido de cadeia longa

Inicialmente, foi preparado o cloreto do ácido dodecanóico numa solução do ácido dodecanóico (0,40 mmol; 80 mg) em diclorometano anidro (4 ml) e DMF (em quantidade catalítica), foi adicionado cloreto de oxalila (em excesso), sob agitação à temperatura ambiente (**Figura 3**). Após 24h de reação foi verificado o consumo do ácido de partida através de análise do espectro de infravermelho. Então, o diclorometano e o excesso de cloreto de oxalila foram evaporados sob pressão reduzida e o conteúdo da reação retomado em 2 ml de diclorometano. Previamente, licorina (0,105 mmol; 30 mg) e DMAP (em quantidade catalítica) foram solubilizados em piridina anidra (2 ml), sob agitação à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado, gota a gota, o cloreto de ácido dodecanóico (em excesso), sob agitação magnética a 0 °C. Após 3 dias de reação, ainda havia material de partida e foi adicionado mais cloreto de ácido, totalizando cerca de 8 mol equivalentes, quando finalmente após 5 dias foi verificado que todo o material de partida havia sido consumido através de CCD (eluente: diclorometano/metanol, 95/5). A piridina foi removida e o conteúdo da reação retomado em clorofórmio (50 ml). Em seguida, foi

realizada uma extração líquido-líquido com água gelada (3x 15 ml) e o solvente da fase orgânica foi removido. O resíduo formado foi purificado por cromatografia em coluna, diclorometano/metanol em gradiente de eluição fornecendo 18 mg (0,04 mmol) do composto (**7b**) em 40% de rendimento.

2.2.5.3. Benzoilação

Licorina (0,105 mmol; 30 mg) e DMAP (em quantidade catalítica) foram solubilizados em piridina anidra (2 ml), sob agitação à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado cloreto de benzoíla (0,21 mmol; 34 mg) dissolvido em diclorometano anidro (1 ml), sob agitação magnética a 0 °C (**Figura 3**). Após 2 dias foi verificado que todo o material de partida havia sido consumido através de CCD (eluente: diclorometano/metanol, 95/5). A piridina foi removida e o conteúdo da reação retomado em clorofórmio (50 ml). Em seguida, foi realizada uma extração líquido-líquido com água gelada (3x 15 ml) contendo bicarbonato de sódio, e o solvente da fase orgânica foi removido. O resíduo formado por cromatografia em coluna, diclorometano/metanol em gradiente de eluição. Os compostos isolados por coluna foram solubilizados em clorofórmio (25 ml) e particionados com água e bicarbonato de sódio para purificação e remoção de traços de ácido benzóico contaminante, fornecendo 23 mg (0,046 mmol) do composto (**7c**) em 47% de rendimento e 9 mg (0,023 mmol) do composto (**7d**) em 23% de rendimento.

2.2.5.4. Nitro-benzoilação

Licorina (0,105 mmol; 30 mg) e DMAP (em quantidade catalítica) foram solubilizados em piridina anidra (2 ml), sob agitação à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado cloreto de *p*-nitro-benzoíla (0,30 mmol; 52 mg) dissolvido em diclorometano anidro (1 ml), sob agitação magnética a 0 °C (**Figura 3**). Após 4 dias foi verificado que todo o material de partida havia sido consumido através de CCD (eluente: diclorometano/metanol, 95/5). A piridina foi removida e o conteúdo da reação retomado em clorofórmio (50 ml). Em seguida, foi realizada uma extração líquido-líquido com água gelada (3x 15 ml) contendo bicarbonato de sódio, e o solvente da fase orgânica foi removido. Essa fração resultante foi purificada por

cromatografia em coluna, diclorometano/metanol em gradiente de eluição. Os compostos isolados por coluna foram solubilizados em clorofórmio (25 ml) e particionados com água e bicarbonato de sódio para purificação e remoção de traços de ácido nitro-benzóico contaminante fornecendo 21 mg (0,033 mmol) do composto (7e) em 34% de rendimento; 12 mg (0,023 mmol) do composto (7f) em 27% de rendimento e 8 mg (0,017 mmol) do composto (7g) em 18% de rendimento.

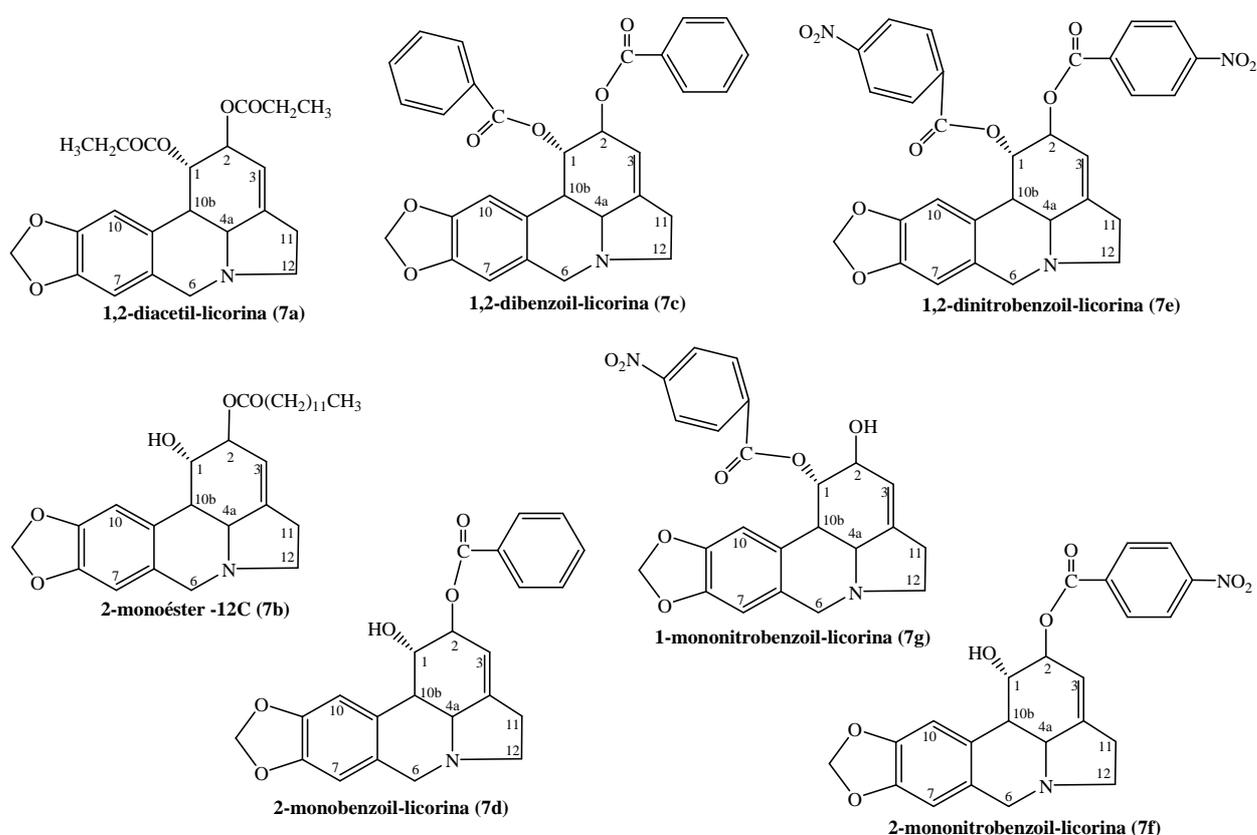


Figura 3: Ésteres derivados obtidos por semi-síntese da licorina.

3. Discussão dos Resultados

A partir dos resultados de um estudo anterior (Capítulo V) onde foram avaliadas quais as características estruturais das diaminas eram importantes para a citotoxicidade contra *T. vaginalis*, a *N*-dodecil-1,4-butanodiamina apresentou atividade equivalente ao metronidazol (GIORDANI *et al.*, 2008). Assim, tornou-se relevante a síntese de

uma série de compostos análogos a esse, tanto para o entendimento da relação estrutura-atividade, quanto para definir qual o composto mais ativo para ser hibridizado à licorina. Foram sintetizados 10 compostos que apresentaram variações no tamanho da cadeia lipofílica e também no tamanho dos espaçadores entre os átomos de nitrogênio (Capítulo VI). Tais compostos foram testados como cloridratos para viabilização dos experimentos de citotoxicidade. A atividade tricomonocida foi verificada através do método da resazurina previamente padronizado por nosso grupo, o que permitiu a avaliação de oito concentrações distintas para cada composto testado. Assim, podemos verificar que a *N*-dodecil-1,4-butanodiamina é a diamina com melhor atividade enquanto base livre e, portanto um bom candidato à hibridização. O planejamento inicial de síntese previa a formação de um mesilato da licorina que seria o intermediário-chave para duas reações: (i) a hibridização com a diamina mais ativa anti-*T. vaginalis* e (ii) a reação com azida de sódio que no passo posterior seria reduzida por hidrogenação catalítica a NH₂, assim agregando outro grupamento amina na própria molécula de licorina (**Figura 1**).

A aparente simplicidade da reação de mesilação não se repetiu na prática onde muitos foram os fatores críticos considerando a pequena escala de trabalho. A total ausência de água do meio reacional foi determinante para a ocorrência da reação: a piridina (solvente) foi destilada, tratada com hidróxido de potássio e armazenada em recipiente vedado. A umidade residual que não dificultaria uma reação convencional em maior escala passa a ser crítica quando trabalhamos com 0,10 mmol. O cloreto de mesila foi adicionado em excesso para reagir com a licorina e era esperado que o produto final fosse um derivado di-substituído. Acompanhando a reação por CCD, verificou-se consumo total do material de partida e a formação de muitos produtos (7 bandas na placa cromatográfica) sendo que destes, apenas 3 apresentavam-se azul fluorescente quando observados em lâmpada de UV. Desses compostos, um era majoritário e mais apolar em relação aos outros dois que eluíram em Rf¹ muito próximos, assim foram considerados como um di- e 2 mono-substituídos. Essa coloração azul é característica da molécula de licorina (material de partida) devido ao

¹ Rf: Razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo eluente na cromatografia.

grupamento cromóforo metilenodioxifenila foi importante para identificar os produtos das reações testadas. Assim, após o término da reação o solvente foi evaporado e os produtos extraídos com clorofórmio. Por CCD, observou-se a presença dos produtos mesmo após a extração líquido-líquido. Uma coluna cromatográfica foi realizada para isolamento desses compostos, mas ocorreu uma modificação do perfil cromatográfico e apenas quantidades insignificantes do composto considerado di-substituído foram obtidas. Análises de RMN não evidenciaram sinais característicos nem da licorina nem do grupamento mesil.

A reação de mesilação foi repetida inúmeras vezes, com procedência distinta de solventes, com velocidade de adição e quantidade de cloreto de mesila diferentes, mas o resultado final permanecia inalterado. Então, realizou-se a reação com azida sódica *in situ*², onde após o consumo da licorina, visualizado por CCD, a piridina foi evaporada e imediatamente o conteúdo reacional retomado em DMF sem nenhuma purificação. O resultado esperado seria que todas as moléculas de licorina mesiladas reagissem com a azida e assim se tornariam compostos mais estáveis e prontos para o próximo passo que seria a redução a amina. Por CCD a identificação de qualquer produto foi dificultada pela proximidade dos R_f e também porque a fluorescência azul, parâmetro para identificação dos produtos, não foi claramente evidenciada. Após 7 dias e alteração significativa do perfil cromatográfico em relação àquele do início da reação, o DMF foi removido e os compostos particionados em clorofórmio/água. A água utilizada na extração foi saturada de bicarbonato de sódio para que tanto o pH alcalino quanto a elevada concentração iônica favorecessem que os produtos se concentrassem na fração orgânica. Após a extração verificou-se a presença de um composto mais apolar de R_f semelhante ao que foi considerado um mesilado di-substituído, então se realizou cromatografia em coluna da fração orgânica. O composto foi isolado, mas por RMN não foram identificados sinais semelhantes ao esqueleto da licorina. Finalmente, todas as frações da coluna foram reunidas e uma análise do espectro por infravermelho (IV) dessa mistura indicou a presença de uma banda em

² Os produtos de síntese de um passo anterior não são purificados e apenas adiciona-se os reagentes do próximo passo da rota sintética.

2105 cm^{-1} com baixa intensidade, que poderia ser correspondente ao estiramento da azida.

A partir desses resultados podemos sugerir que a mesilação da licorina ocorre, o que foi sugerido pela presença do grupamento azida por IV, o qual só poderia ser formado a partir de uma hidroxila mesilada nessas condições. Entretanto, o produto final parece ser muito instável uma vez que o grupamento mesil é um bom abandonador e uma das hidroxilas da licorina, a mais reativa, é alfa-insaturada.

Outra abordagem utilizada foi a reação com cloreto de tosila, melhor grupo abandonador em relação ao cloreto de mesila, porém de tamanho espacial maior (Figura Y). Mesmo com excesso do cloreto de tosila não houve indício de reação e o material de partida se manteve inalterado, quando analisado por CCD. Sugere-se que o impedimento estérico possa ter contribuído para a dificuldade de reação uma vez que as moléculas de licorina têm fortes interações intermoleculares por pontes de hidrogênio formando uma espécie de túnel na região das hidroxilas (ROQUES e PIQUION, 1974). Isso dificultaria a aproximação de grupamentos muito volumosos e, conseqüentemente a reação.

Como última tentativa de remover as hidroxilas da licorina e preparar a molécula para os passos seguintes foi realizada a reação de iodação. Acompanhando a reação por CCD verificou-se um perfil cromatográfico com muitos compostos (8 bandas) e o consumo do material de partida. O DMF da mistura reacional foi evaporado para realização da extração líquido-líquido. Água gelada saturada com bissulfito de sódio foi utilizada para a redução do iodo metálico em excesso. A fração orgânica, em clorofórmio, foi analisada por CCD e apenas 2 compostos mais o material de partida foram visualizados. A partir desses resultados sugere-se que de fato não houve a reação da licorina com o iodo, uma vez que nas condições de extração uma hidrólise do produto seria um evento pouco provável.

Diante desses resultados pode-se hipotetizar que as hidroxilas da licorina não se comportam simplesmente como álcoois secundários convencionais. Muitas características peculiares à estrutura são determinantes para o sucesso, ou não, das

reações de semi-síntese onde há o envolvimento da eliminação do grupo OH. Entre essas pode-se destacar: (i) impedimento estérico e difícil aproximação dos reagentes pela característica da licorina ser um policiclo, (ii) as hidroxilas da molécula estão em *trans* e uma delas é alfa-insaturada, alterando a estabilidade dos intermediários e (iii) a intensidade das interações inter e intramoleculares por ponte de hidrogênio, já demonstrada pela estrutura cristalina deste alcaloide (ROQUES e PIQUION, 1974).

Assim, quando o C-2 da licorina está como carbocátion ou apenas como δ^+ , tanto a ligação dupla adjacente quanto os elétrons livres da hidroxila substituinte do C-1 poderiam favorecer a formação de um epóxido. Um nucleófilo vicinal tem certa vantagem sobre um nucleófilo externo por diversas razões: ele já faz parte da molécula então sua concentração efetiva é maior e está em estreito contato com o átomo a ser atacado; (ii) não há moléculas de solvente fortemente agarradas a eles e (iii) a reorganização eletrônica nesse caso é facilitada. Então, no caso da licorina, essa hipótese poderia estar de fato ocorrendo e a formação do epóxido seria apenas um primeiro passo para uma sequência de reações espontâneas de degradação como, por exemplo, oxidações, aromatização e isomerizações. Talvez isso explique um fato recorrente nas reações testadas que é a perda de massa do produto de interesse quando ele é isolado ou até mesmo a alteração do perfil cromatográfico com perda da característica da cor azul sob luz UV, o que prejudica a identificação dos produtos de reação por CCD.

Considerando essa possibilidade da participação da ligação dupla na instabilidade dos produtos de reação, realizou-se uma reação de hidrogenação em presença de paládio com o objetivo de saturar a ligação entre C-3 e C-4. Assim, com a molécula de licorina saturada seria possível repetir a reação de mesilação, aquela que apresentou melhores resultados entre as testadas, e conseguir o alcaloide mesilado mais estável. Cerca de 300 mg de licorina foram solubilizados em etanol e após 24h de reação foi verificado consumo significativo do material de partida. A mistura reacional foi filtrada sobre papel filtro e o etanol foi totalmente evaporado sob temperatura reduzida a 45 °C. Essa amostra teve massa de 50 mg, menos de 17% da massa de produto inicial colocada para reagir. O mesmo papel filtro foi lavado com clorofórmio

a quente, fornecendo 74 mg, e com água a quente, fornecendo 112 mg. O perfil cromatográfico analisado por CCD foi distinto entre essas três amostras sendo que todos os produtos apresentavam coloração azul quando observados sob luz UV. As frações foram reunidas e purificadas por cromatografia em coluna, totalizando 6 diferentes compostos. Nenhum deles apresentou-se puro porque a cada nova CCD o perfil se alterava e distintos compostos surgiam na placa. Foi realizada a análise do espectro de UV dos 6 compostos na tentativa de comparação com produtos de degradação da licorina já descritos na literatura. Verificou-se um perfil semelhante de alguns desses compostos com produtos de degradação resultantes da oxidação da licorina (COOK et al., 1954). A utilização do etanol como solvente seguiu o protocolo vigente no laboratório embora em estudos prévios da hidrogenação da licorina verifica-se que sempre o solvente utilizado é tetrahidrofurano ou acetato de etila, ambos apróticos (EVIDENTE *et al.*, 2009; CÉDRON *et al.*, 2010), com rendimento variável de 32% a 65%.

Esse fato inesperado de sucessiva degradação da licorina após a utilização da hidrogenação, que seria um recurso para diminuir a instabilidade reacional do alcaloide, instigou uma busca na literatura sobre possíveis explicações. Já foi demonstrado que a hidrogenação não é um processo trivial, muitos detalhes estão envolvidos e são determinantes do sucesso da reação, especialmente se tratando de álcoois alfa-insaturados como a licorina. A isomerização da dupla ligação pode fornecer uma cetona, no caso de álcoois alfa-beta insaturados e a extensão desses produtos vai depender do catalisador e das condições de reação (MUSOLINO et al., 2004). Ainda, pode-se sugerir que a formação da cetona seja apenas o início de uma cascata de reações espontâneas revelando uma labilidade da licorina não descrita em artigos que abordam a semi-síntese desse composto. Analisando cuidadosamente os derivados semi-sintéticos da licorina não se verifica muita criatividade nas alterações estruturais, sendo principalmente ésteres do alcaloide, e nos estudos de estruturatividade mais completos os compostos análogos à licorina com estrutura mais peculiar são produtos naturais. Em vista desses resultados, as reações de esterificação concentraram os esforços do trabalho.

Assim como previsto inicialmente, realizou-se a esterificação com uma cadeia longa de 12 carbonos, mesmo tamanho da cadeia lipofílica da diamina escolhida para a hibridização, de acordo com o Capítulo V. Essa reação necessita da síntese prévia do cloreto de ácido de cadeia longa, que é bastante instável à umidade e hidrolisa facilmente. A síntese do cloreto de dodecano foi confirmada pelo espectro no infravermelho onde se verificou também uma banda remanescente de OH, além de uma banda de carbonila. Em seguida, esse cloreto de ácido foi gotejado sobre a licorina já em solução e a reação acompanhada por CCD sugerindo a síntese de um derivado di-substituído e um mono-substituído. Com o consumo de boa parte do material de partida (após adição de 4 equivalentes de cloreto de ácido), o solvente da reação foi removido e após extração, submetido a cromatografia em coluna. O resultado final foi 18 mg de um composto apolar que foi inicialmente considerado o di-substituído, mas após análise com RMN verificou-se que não se tratava do composto esperado mostrando apenas sinais alifáticos e nenhum sinal na região de prótons aromáticos nem carbono de carbonila. Ainda, a partir da mesma coluna foi isolado outro composto (18 mg) cuja identidade foi confirmada como o éster de cadeia longa mono-substituído da licorina no carbono 2 (**7b**). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão em anexo e os dados de ^1H RMN comparando os derivados estão descritos na **Tabela 1**. Acredita-se que mesmo após adição de largo excesso de cloreto de ácido, principalmente o impedimento estérico tenha impossibilitado a formação do derivado di-substituído, sendo o composto mais apolar isolado talvez o próprio cloreto de ácido com algumas moléculas de licorina adsorvidas na cadeia, mas não ligadas.

A partir desse resultado onde um rendimento razoável foi obtido (18 mg) e o produto formado apresentou estabilidade, outros ésteres derivados da licorina foram sintetizados. De acordo com método previamente descrito, a licorina reagiu com anidrido acético fornecendo um composto caracterizado por RMN (**7a**) como o diacetil (25 mg). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão em anexo e os dados de ^1H RMN comparando os derivados estão descritos na **Tabela 1**. Essa reação ocorreu de forma rápida, após 20h todo o material de partida havia sido consumido e a CCD da mistura reacional mostrou poucas bandas sendo os produtos da reação, com coloração

azul em UV, os majoritários. Os principais estudos da atividade de derivados da licorina utilizam o éster acetilado, tornando-se então, esse composto um importante parâmetro de comparação com os dados da literatura.

Finalmente, dois ésteres aromáticos foram sintetizados utilizando os cloretos de benzoíla e *p*-nitro-benzoíla, cujas reações foram muito semelhantes entre si, mas com diferenças importantes em relação aos outros ésteres. Em ambos os casos a reação ocorreu de forma muito mais lenta e muitos produtos foram visualizados na CCD das reações além daqueles de interesse, em relação ao cloreto de acila e também ao anidrido acético. Ainda, a dificuldade na purificação do produto final foi muito maior porque os ácidos benzóico e nitro-benzóico têm um R_f muito similar aos ésteres da licorina di-substituídos. Antes de purificação em coluna cromatográfica a mistura reacional foi particionada com água contendo bicarbonato de sódio e clorofórmio, sendo a fração orgânica utilizada na coluna. Na reação com o cloreto de benzoíla verificou-se a síntese de um produto mais apolar (provável dissustituído) além de outros dois mais polares de R_f muito próximos. Desses, 2 produtos foram isolados e identificados por RMN como: 1,2-dibenzoil-licorina (**7c**) (23 mg) e 2-benzoil-licorina (**7d**) (9 mg). Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C estão em anexo e os dados de ¹H RMN comparando os derivados estão descritos na **Tabela 1**. Novamente, os deslocamentos químicos dos hidrogênios dos carbonos 1 e 2 foram definitivos na atribuição da estrutura. O composto dissustituído foi submetido novamente à extração com bicarbonato de sódio para eliminar os resíduos de ácido benzóico (mesmo R_f), mas ainda assim alguns sinais de ácido podem ser reconhecidos no espectro de RMN.

A partir da reação com o cloreto de *p*-nitro-benzoíla verificou-se a síntese de um produto mais apolar (provável dissustituído) além de outros dois mais polares de R_f muito próximos, assim como na reação com o cloreto de benzoíla. Desses, 2 produtos foram isolados e identificados por RMN como: 1,2-dinitrobenzoil-licorina (**7e**) (21 mg) e 2-nitrobenzoil-licorina (**7f**) (12 mg). O composto dissustituído foi submetido a uma purificação adicional por coluna cromatográfica para eliminação de impurezas visualizadas no espectro de RMN na região de cadeias alifáticas. Após eluição da coluna com hexano/acetato de etila, em gradiente, o composto foi analisado

novamente por RMN. Esse espectro demonstrou que se tratava de um composto monossustituído (**7g**), provavelmente no carbono 1 ao contrário do outro composto monossustituído já isolado. Isso sugere que espontaneamente o derivado nitrobenzoil é esterificado no carbono 1 da licorina, mais reativo por ser alílico, e a partir da hidrólise do derivado dinitrobenzoil se obtém o nitrobenzoil esterificado no carbono 2. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão em anexo e os dados de ^1H RMN comparando os derivados estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Dados de ^1H RMN da licorina e os derivados semi-sintéticos (* sinal sobreposto).

| <i>Próton</i> | <i>Licorina</i> | <i>1,2-diacetil-licorina (7a)</i> | <i>2-mono éster (7b)</i> | <i>1,2-dibenzoil-licorina (7c)</i> | <i>2-benzoil-licorina (7d)</i> | <i>1,2-dinitrobenzoil-licorina (7e)</i> | <i>2-nitrobenzoil-licorina (7f)</i> | <i>1-nitrobenzoil-licorina (7g)</i> |
|---------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 4,37 (<i>s</i>) | 5,72 (<i>s</i>) | 4,50 (<i>s</i>) | 5,68 (*) | 4,71 (<i>s</i>) | 5,72 (<i>s</i>) | 4,65 (<i>s</i>) | 5,90 (<i>s</i>) |
| 2 | 4,15 (<i>s</i>) | 5,52 (<i>s</i>) | 5,48 (<i>s</i>) | 6,14 (<i>s</i>) | 5,65 (<i>s</i>) | 6,15 (<i>s</i>) | 5,59 (*) | 4,35 (<i>s</i>) |
| 3 | 5,40 (<i>s</i>) | 5,24 (<i>s</i>) | 5,31 (<i>s</i>) | 5,68 (*) | 5,62 (<i>s</i>) | 5,68 (<i>s</i>) | 5,59 (*) | 5,62 (<i>s</i>) |
| 4a | 2,79 (<i>d</i>) | 2,87 (<i>d</i>) | 2,70 (*) | 3,17 (<i>d</i>) | 3,22 (<i>d</i>) | 3,18 (<i>d</i>) | 2,83 (<i>d</i>) | 3,08 (*) |
| 6` | 4,10 (<i>d</i>) | 4,15 (<i>d</i>) | 4,12 (<i>d</i>) | 4,21 (<i>d</i>) | 4,22 (<i>d</i>) | 4,24 (<i>d</i>) | 4,16 (<i>d</i>) | 4,18 (<i>d</i>) |
| 6`` | 3,30 (<i>d</i>) | 3,53 (<i>d</i>) | 3,68 (<i>d</i>) | 3,60 (<i>d</i>) | 3,78 (<i>d</i>) | 3,62 (<i>d</i>) | 3,55 (<i>d</i>) | 3,60 (<i>d</i>) |
| 7 | 6,80 | 6,63 | 6,80 | 6,86 | 6,84 | 6,80 | 6,77 | 6,72 |
| 10 | 6,57 | 6,56 | 6,61 | 6,57 | 6,64 | 6,59 | 6,58 | 6,58 |
| 10b | 2,65 (<i>d</i>) | 2,79 (<i>d</i>) | 2,70 (*) | 3,04 (<i>d</i>) | 2,97 (<i>d</i>) | 3,04 (<i>d</i>) | 2,66 (*) | 2,93 (*) |
| 11 | 2,55 (<i>m</i>) | 2,64 (<i>m</i>) | 2,70 (*) | 2,63 (<i>m</i>) | 2,76 (*) | 2,76 (<i>m</i>) | 2,66 (*) | 2,93 (*) |
| 12` | 3,25 (<i>m</i>) | 3,36 (<i>m</i>) | 3,37 (<i>m</i>) | 3,44 (<i>m</i>) | 3,48 (<i>m</i>) | 3,48 (<i>m</i>) | 3,37 (<i>m</i>) | 3,43 (<i>m</i>) |
| 12`` | 2,35 (<i>m</i>) | 2,41 (<i>m</i>) | 2,32 (<i>m</i>) | 2,53 (<i>m</i>) | 2,76 (*) | 2,51 (<i>m</i>) | 2,40 (<i>m</i>) | 2,52 (<i>m</i>) |
| O-CH₂-O | 5,90 | 5,90 | 5,92 | 5,85 (<i>d</i>) | 5,88 (<i>d</i>) | 5,87 (<i>d</i>) | 5,89 (<i>d</i>) | 5,87 (<i>d</i>) |
| Acetil | | 2,07-1,94 (<i>s</i>) | | | | | | |
| Cadeia alifática -12C | | | 1,24 | | | | | |
| Benzoil- H <i>meta</i> | | | | 7,30 (<i>m</i>) | 7,43 (<i>m</i>) | | | |
| Benzoil- H <i>para</i> | | | | 7,62 (<i>m</i>) | 7,46 (<i>m</i>) | | | |
| Benzoil- H <i>orto</i> | | | | 8,00 (<i>dd</i>) | 8,06 (<i>m</i>) | | | |
| <i>p</i> -Nitrobenzoil | | | | | | 8,25 (<i>m</i>) | 8,22 (<i>m</i>) | |
| <i>p</i> -Nitrobenzoil- H <i>meta</i> | | | | | | | | 8,00 (<i>d</i>) |
| <i>p</i> -Nitrobenzoil- H <i>orto</i> | | | | | | | | 8,20 (<i>d</i>) |

Assim, os seguintes derivados foram obtidos: (i) 1,2-diacetil-licorina (**7a**); (ii) éster de cadeia longa (**7b**); (iii) 1,2-dibenzoil-licorina (**7c**); (iv) 2-benzoil-licorina (**7d**); (v) 1,2-dinitrobenzoil-licorina (**7e**); (vi) 2-nitrobenzoil-licorina (**7f**); (vii) 1-nitrobenzoil-licorina (**7g**). A avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* dos derivados não foi concluída devido à limitada solubilidade dos compostos em uma concentração de DMSO não tóxica aos parasitos. Além disso, a comprovada instabilidade das moléculas é um fator complicador na utilização de recursos para auxiliar a solubilização. Dessa maneira, alternativas de co-solventes estão sendo pesquisadas para não agredir os parasitos nem comprometer a integridade estrutural dos compostos.

Referências

BASSELIN, M.; ROBERT-GERO, M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitology Research*, v. 84, p. 78-83, 1998.

CALAS, M.; ANCELIN, M. L.; CORDINA, G.; PORTEFAIX, P.; PIQUET, G.; VIDAL-SAILHAN, V.; VIAL, H. J. Antimalarial activity of compounds interfering with *Plasmodium falciparum* phospholipid metabolism: comparison between mono- and bisquaternary ammonium salts. *Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 505-516, 2000.

CEDRON, J. C.; GUTIERREZ, D.; FLORES, N.; RAVELO, A. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A. Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 4694-4701, 2010.

COOK, J. W.; LOUDON, J. D.; McCLOSKEY, P. Dehydration of lycorine. *Journal of the Chemical Society*, p. 4176-4181, 1954.

DA COSTA, C.F.; COIMBRA, E. S.; BRAGA, F. G.; DOS REIS, R. C. N.; DA SILVA, A. D.; DE ALMEIDA, M. V. Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-alkyl diamines. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 63, p. 40-42, 2009.

DEL OLMO, E.; ALVES, M.; LÓPEZ, J. L.; INCHAUSTTI, A.; YALUFF, G.; DE ARIAS, A. R.; SAN FELICIANO, A. Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-alcohols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, p. 659-662, 2002.

EVIDENTE, A.; KORNIENKO, A. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews*, v. 8, p. 449-459, 2009.

GIORDANI, R. B. *Estudo fitoquímico de Hippeastrum morelianum e Hippeastrum santacatarina: duas espécies de Amaryllidaceae*, 2007. 185 f. Dissertação (Mestrado

em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, Porto Alegre.

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; DUTILH, J. H.; ZUANAZZI, J. A. S. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Quimica Nova*, v. 31, p. 2042-2046, 2008.

GIORDANI, R. B.; DE ALMEIDA, M.; FERNANDES, E.; FRANCA DA COSTA, C.; DE CARLI, G.; TASCIA, T.; ZUANAZZI, J. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of synthetic lipophilic diamine and amino alcohol derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 63, p. 613-617, 2009.

HERRMANN, H. O.; GERCKEN, G. Metabolism of 1-O-[1'-14C]octadecyl-*sn*-glycerol in *Leishmania donovani* promastigotes. Ether lipid synthesis and degradation of the ether bond. *Molecular Biochemistry on Parasitology*, v. 5, p. 65-76, 1982.

LABADIE, G. R.; CHOI, S. R.; AVERY, M. A. Diamine derivatives with antiparasitic activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, p. 615-619, 2004.

MUSOLINO, M. G.; De Maio, P.; Donato, A.; Pietropaolo, R. Hydrogenation versus isomerization in α,β -unsaturated alcohols reactions over Pd/TiO₂ catalysts. *Journal of Molecular catalysis A: Chemical*, v. 208, p. 219-224, 2004.

ROQUES, R.; PIQUION, J. The crystal and molecular structure of the alkaloid lycorine. *Acta Crystallographica*, v. B30, p. 296-299, 1974.

Estima-se que cerca de 40% dos medicamentos comercializados são produtos naturais (PNs) ou seus derivados semi-sintéticos, constituindo 80% dos antimicrobianos e 60% dos antitumorais (NEWMANN e CRAGG, 2007). Diversos exemplos destacam os PNs não somente como moléculas terapêuticas, mas também como ferramentas para o descobrimento de novos aspectos da fisiologia, por exemplo: (i) *digitalis* demonstrou o papel da sódio-potássio ATPase; (ii) a partir da morfina verificou-se que receptores eram modulados por opióides endógenos; e (iii) muscarina, nicotina e tubocurarina auxiliaram na exploração de diferentes tipos de receptores de acetilcolina (RISHTON, 2008; HARVEY, 2008). Acredita-se que os PNs apresentam características químicas diferenciadas que são difíceis de acessar em comparação com os compostos sintéticos: além das bases de dados de PN apresentarem maior número de *scaffolds*,³ uma importante proporção dos sistemas de anéis das moléculas não são encontrados em outras bases de dados o que representa promissor ponto de partida no descobrimento de novas drogas. Assim, após a identificação de um produto natural *lead*⁴ a aplicação de novas estratégias de química orgânica sintética, biotransformação, biossíntese combinatória e simulações *in silico*⁵ pode gerar diversos análogos estruturais com atividades otimizadas em relação ao composto de partida ou até mesmo com novas atividades farmacológicas (LAM, 2007).

A pesquisa em PN foi responsável pela geração de aproximadamente 48% das moléculas inéditas entre 1981-2002, além de diversos derivados semi-sintéticos, cujas características estruturais como centros quirais, anéis aromáticos, policiclos complexos, grau de saturação e presença/localização de heteroátomos, tem-se mostrado altamente relevante para o descobrimento de novas drogas (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Em termos de estrutura, predominam os policetídeos, peptídeos ou terpenos, estando os alcaloides ausentes possivelmente porque essa classe foi uma das primeiras a serem investigadas e moléculas ativas já haviam sido exploradas antes de 1980 (GANESAN, 2008). Embora não seja uma nova entidade química, o alcaloide

³ Moléculas consideradas como ponto de partida para síntese de derivados objetivando o aperfeiçoamento da atividade biológica.

⁴ Molécula ativa em sistemas biológicos *in vitro*.

⁵ Simulações teóricas utilizando programas computacionais objetivando explorar as características químicas da molécula e potenciais implicações na atividade biológica.

galantamina foi aprovado em 2001 como alternativa terapêutica no tratamento do Mal de Alzheimer e abriu uma nova perspectiva para a investigação da família Amaryllidaceae. Diversos estudos enfatizando o conteúdo alcaloídico dessa família já foram descritos o que consolida a classificação das Amaryllidaceae entre as 20 principais famílias botânicas produtoras de alcaloides (ZHONG, 2007).

Neste trabalho investigou-se a aplicação do potencial citotóxico dos alcaloides de Amaryllidaceae licorina e candimina como compostos anti-*Trichomonas vaginalis*. A licorina é um dos alcaloides mais facilmente encontrados na família Amaryllidaceae e seu isolamento a partir de *H. santacatarina* (Traub) Dutilh foi descrito previamente (GIORDANI *et al.*, 2008). A candimina é um alcaloide de ocorrência não usual, sendo isolado apenas duas vezes até o momento (DÖPKE, 1962; GIORDANI, 2007), e a falta de dados espectroscópicos que assegurassem a sua identidade estrutural constituiu o primeiro desafio antes da avaliação farmacológica. Assim, conforme descrito no Capítulo I, realizou-se a completa caracterização da candimina com dados de ressonância magnética nuclear 1D e 2D, assim como avaliações da estrutura *in silico* e predição do confôrmero mais estável. Então, confirmou-se a estrutura de um alcaloide lactônico tipo homolicorina, com metoxila substituindo o C-7. Ainda, a partir da mesma planta – *Hippeastrum morelianum* Lem. – isolou-se e identificou-se um alcaloide inédito da mesma classe que a candimina: 2 α ,7-dimetoxi-homolicorina. Considerando que o gênero *Hippeastrum* é exclusivo da América do Sul, o resultado obtido é importante e caracteriza a primeira ocorrência de um alcaloide inédito isolado por nosso grupo de pesquisa.

Tendo-se como importante o estudo de novas perspectivas terapêuticas no campo da parasitologia, investigou-se as propriedades anti-*T. vaginalis* dos alcaloides licorina e candimina. Considerando que ambos os alcaloides são biossinteticamente relacionados, a mesma sequência de experimentos foi seguida com o objetivo de traçar comparações entre os efeitos observados.

Trichomonas vaginalis é o parasito causador da tricomonose, reside no trato urogenital do homem e da mulher causando vaginite, uretrites e prostatites. Diversas

consequências na saúde de pacientes com tricomonose estão relatadas, incluindo complicações na gestação, infecções associadas à doença inflamatória pélvica, predisposição ao câncer cervical, aumento dos riscos de infertilidade e infecções pelo HIV (JOHNSTON e MABEY, 2008). O metronidazol e o tinidazol, ambos 5-nitroimidazóis, são os únicos fármacos recomendados para uso no tratamento da tricomonose pelo Food and Drug Administration (FDA). A ocorrência de casos clínicos com parasitos resistentes tem sido relatada e bem documentada, sendo que atualmente não existe um tratamento alternativo aos nitroimidazóis no caso de resistência clínica ao metronidazol. Dessa maneira, uma estratégia corrente consiste na busca por novos compostos anti-*Trichomonas* estruturalmente distintos em relação aos 5-nitroimidazóis e, conseqüentemente, citotóxicos por mecanismos de ação alternativos. Paralelamente, conforme discutido anteriormente, o parasito *T. vaginalis* é amitocondriado e pode ser considerado um microrganismo modelo para estudos de morte celular.

Nesse contexto, os alcaloides de Amaryllidaceae atraem interesse uma vez que (i) são produtos naturais potencialmente bioativos; (ii) muitos são indutores de apoptose e bloqueadores do ciclo celular de células eucarióticas normais e tumorais, ambas com mitocôndria; (iii) novas alternativas terapêuticas anti-protozoários são necessárias e (iv) o estudo da citotoxicidade desses alcaloides em células amitocondriadas poderia contribuir com o acervo de informações acerca da farmacologia destes compostos, além de promover novas abordagens sobre o processo de morte celular nestes organismos.

Conforme descrito nos Capítulos II e III, a primeira avaliação da atividade de licorina e candimina contra o parasito amitocondriado *T. vaginalis* foi realizada através de uma curva dose-resposta dos alcaloides. O isolado TV-VP60 foi escolhido para desenvolver essa análise inicial porque, sendo um isolado clínico, apresenta certas características de virulência diferenciadas em relação aos isolados padrões. O efeito citotóxico da candimina não apresentou perfil dose-dependente uma vez que não houve aumento do efeito proporcional ao aumento da concentração. Por outro lado, aumentando a concentração de licorina, a viabilidade dos parasitos foi reduzida 2x

quando o efeito das concentrações menores (2,5 e 5,0 μM) foi comparado ao efeito das maiores concentrações (250, 500 e 1.000 μM). Licorina e candimina não apresentaram diferença estatística quando testados contra distintos isolados de *T. vaginalis* (5×10^5 trofozoítos/ml), o que indica que os alcaloides são citotóxicos contra o isolado clínico (TV-VP60) e o padrão (30236). A partir desses resultados, foi determinado se a variação no número inicial de parasitos poderia refletir em alterações na citotoxicidade observada. Quando um inóculo de 1×10^6 trofozoítos/ml foi utilizado houve atenuação dos efeitos citotóxicos de licorina e candimina contra ambos os isolados. Ainda, verificou-se um aumento da citotoxicidade de ambos os alcaloides contra 5×10^4 trofozoítos/ml de TV-VP60.

Com o objetivo de esclarecer as diferenças entre os perfis de atividade de licorina e candimina (250 μM), uma curva de crescimento foi desenvolvida, com o isolado clínico TV-VP60, onde a cinética de crescimento dos parasitos foi avaliada na presença e ausência de alcaloides. Considerando os resultados da licorina verifica-se que o número máximo de parasitos tratados é similar ao controle com um atraso de 12h, considerando ambos os inóculos iniciais. Quando os trofozoítos tratados foram centrifugados após 12h e inoculados em meio novo, sem licorina, desenvolveram uma curva de crescimento idêntica ao controle (parasitos não expostos ao alcaloide). Os experimentos de cinética de crescimento sugerem que a licorina poderia atrasar o ciclo celular de *T. vaginalis* assim como já descrito para células eucarióticas e mitocondriadas. Efetivamente, após experimentos em citômetro de fluxo verificou-se que a licorina causa um atraso no ciclo celular do *T. vaginalis* na fase G0/G1, mais pronunciado após 24h de incubação. De maneira análoga, esse alcaloide também atrasa o ciclo celular em G2/M e induz apoptose em células HL-60 (LIU *et al.*, 2004). O tratamento de células humanas KM3 com licorina também demonstrou um bloqueio no ciclo celular na fase G0/G1 (LI *et al.*, 2007). Recentemente, LIU *et al.* (2008) demonstrou que a licorina induz apoptose e causa *down-regulation* em McI1 de células leucêmicas humanas. Esses estudos sugerem que o mecanismo de ação citotóxica da licorina está relacionado a efeitos no ciclo celular e nas vias mitocondriais das células eucarióticas. Então, procedeu-se à avaliação dos efeitos da licorina na indução da

morte celular dos tricomonas, embora um fator limitante nas conclusões definitivas sejam as inúmeras lacunas no entendimento do processo de morte celular de amitocondriados. Investigou-se a exposição de resíduos de fosfatidilserina, através do ensaio da Anexina -V e a degradação do DNA genômico: duas características marcantes da apoptose. Sabe-se que a uniforme degradação do DNA genômico em oligômeros de aproximadamente 180-200 bp, ou múltiplos, caracterizam uma clivagem inter-nucleossomal do DNA e é uma característica bioquímica de apoptose. Em ambos os ensaios o perfil dos parasitos tratados não diferiu dos controles (não tratados), não caracterizando até o momento a morte celular por apoptose induzida por licorina em tricomonas.

Considerando os dados de citotoxicidade, a candimina apresentou melhor atividade anti-*Trichomonas* em comparação à licorina. Com um inóculo inicial menor a citotoxicidade foi mais pronunciada e a viabilidade dos parasitos foi mantida a 10% durante todo o tempo da curva de crescimento. Esse perfil de atividade foi parcialmente alterado quando o inóculo foi aumentado e somente após 60h de incubação a curva de parasitos tratados atingiu os mesmos valores do controle sem tratamento. Uma possibilidade para entendimento desses resultados é que uma parcela dos trofozoítos não afetados pela candimina seriam os responsáveis pelo aumento do número total de trofozoítos observado na curva de crescimento. Quando os trofozoítos tratados foram centrifugados após 12h e inoculados em meio novo, sem candimina, desenvolveram uma curva de crescimento idêntica ao controle (parasitos não expostos ao alcaloide), assim como observado para a licorina no mesmo experimento. A reversão do efeito citotóxico sugere que a presença dos alcaloides seja fundamental para a citotoxicidade, assim como a proporcionalidade entre número de parasitos e quantidade de alcaloide no meio de cultura. Considerando a não usual ocorrência de candimina na natureza e o mecanismo de ação ainda não definido de alcaloides análogos, com mesmo núcleo homolicorina, os resultados descritos constituem a primeira descrição de atividade farmacológica desse composto. De acordo com o objetivo inicial de comparação do perfil de atividade entre licorina e candimina, embora nenhum indício de efeito no ciclo celular dos tricomonas tenha sido verificado

após tratamento com candimina, procedeu-se a análise por citometria de fluxo. Um pronunciado atraso na fase G2 do ciclo celular foi observado após 6 e 24h de tratamento. O ensaio de fragmentação do DNA genômico foi realizado também para candimina com a mesma proposta de investigar outros marcadores de apoptose. Após extração do DNA total dos parasitos (tratados durante 6 e 24h) e visualização em gel de agarose 2%, não se verificou a fragmentação do DNA total. Ainda, assim como observado para licorina, não foi detectado qualquer efeito na exposição de resíduos de fosfatidilserina.

A integridade estrutural dos alcaloides foi avaliada após incubação com *T. vaginalis* durante 24h. A licorina mostrou-se intacta após recuperação a partir do meio de cultura e avaliação do perfil cromatográfico em RP-HPLC-PDA⁶ em comparação a padrão de referência. Por outro lado, de acordo com a mesma análise cromatográfica a candimina recuperada do meio de cultura apresentou variações no tempo de retenção e espectro de ultravioleta em relação a padrão de referência. Acredita-se que a alteração estrutural sofrida seja discreta uma vez que não reflete em mudança do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada e desloca o espectro de UV de 290 para 285 nm. A partir desses dados e considerando a possível instabilidade do anel lactona sugere-se que durante o metabolismo do parasito possa ocorrer uma hidrólise e consequente abertura do anel. Esses resultados preliminares indicam que alguma modificação estrutural poderia ocorrer na molécula da candimina durante a incubação com *T. vaginalis* enquanto a licorina permanece intacta (**Figura 6**).

⁶ RP-HPLC-PDA: *Reversed phase - high performance liquid chromatography – photo diodo array.*

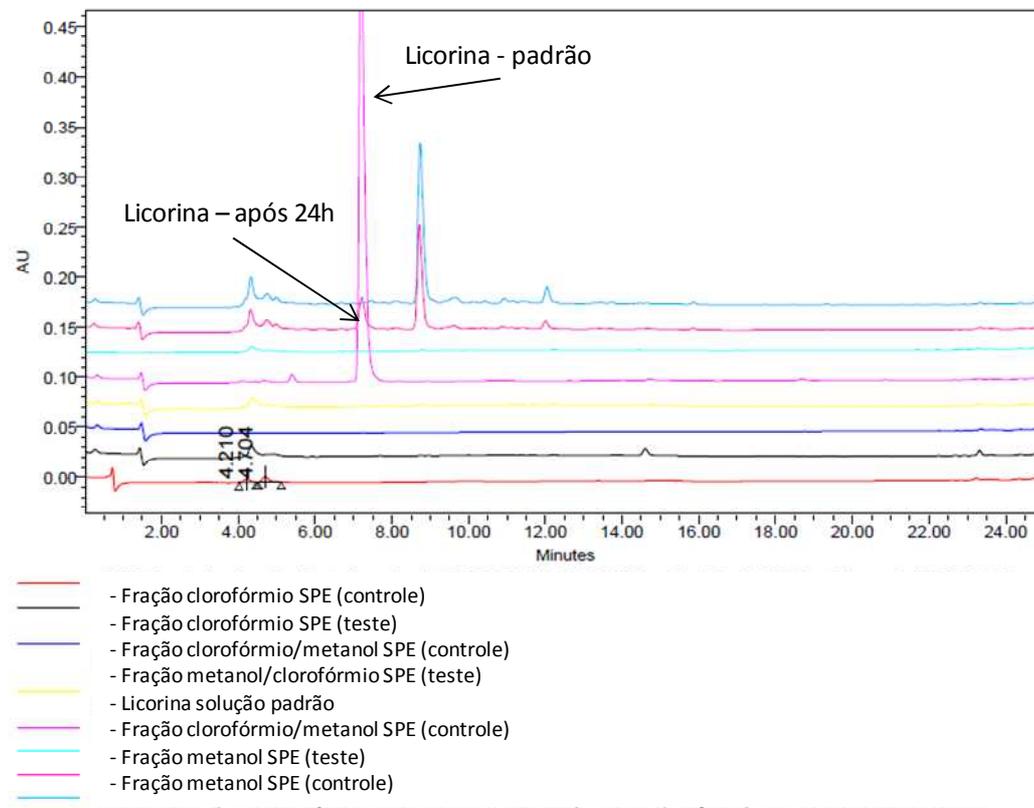
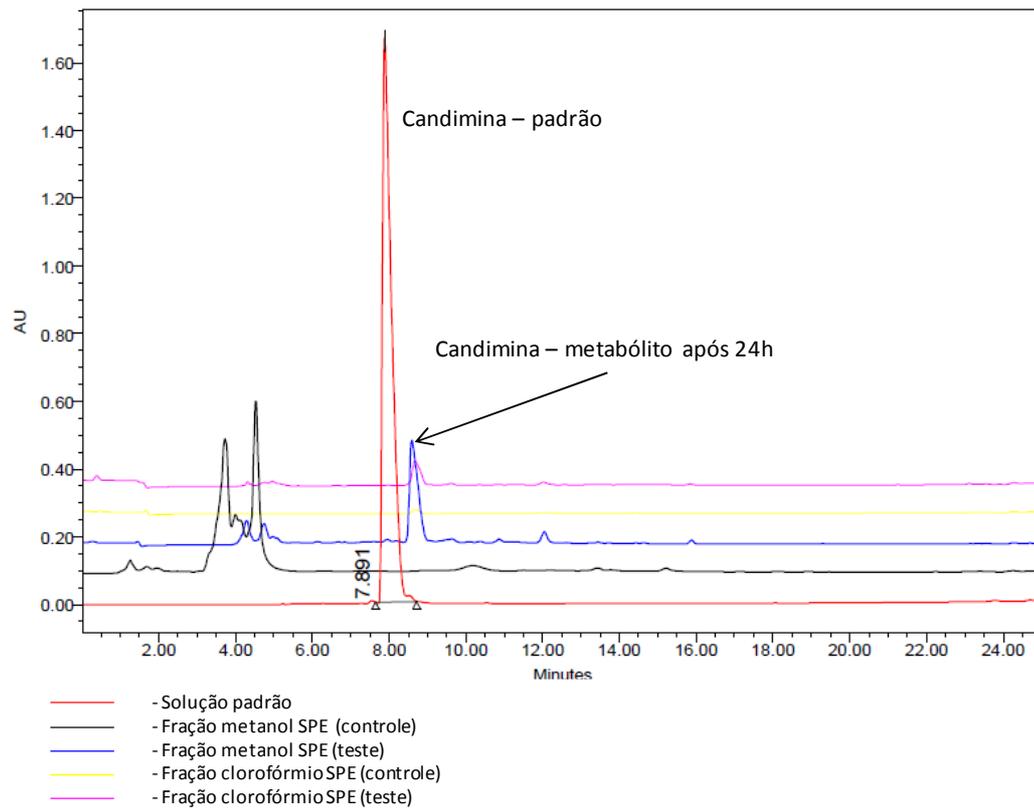


Figura 6: Cromatograma demonstrando o perfil dos alcaloides após incubação com *T. vaginalis*.

Esses resultados divergem em relação ao comportamento da licorina após o tratamento de *Pseudomonas aeruginosa* porque produtos de degradação do alcaloide foram detectados e indicados como os responsáveis pela atividade antimicrobiana observada (EVIDENTE e RANDAZO, 1985).

Neste cenário de restritas informações metabólicas sobre o parasito e de limitadas opções de ensaios bioquímicos para auxiliar na caracterização da morte celular observada, as ferramentas de microscopia eletrônica foram importantes no entendimento dos efeitos induzidos por licorina e candimina em *T. vaginalis*. Para verificação do efeito dos alcaloides na ultraestrutura de *T. vaginalis*, através de técnicas de microscopia eletrônica, 5×10^5 trofozoítos/ml foram tratados com 250 μ M de licorina e candimina durante 6h e 24h. Para realização destes ensaios o isolado padrão ATCC 30236 foi utilizado e os tempos de incubação escolhidos de acordo com a curva de crescimento dos parasitos, onde 6h acredita-se ser o tempo necessário para completar um ciclo de vida em tricomonas.

Após o tratamento com licorina (250 μ M) em análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) verificou-se a perda da forma celular normal com diversos sulcos na superfície, além de aspecto enrugado áspero e alterações no tamanho celular. Pseudocistos e internalização de flagelos não foram observados. Ao contrário, pseudocistos foram encontrados já em fase final de internalização do flagelo em imagens obtidas por MEV após tratamento com candimina, o mesmo fenômeno que ocorre no tratamento com colchicina (MARIANTE *et al.*, 2006).

Através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi possível observar que o complexo de Golgi não foi danificado após 6h de tratamento com licorina e candimina; em contraste, após 24h, essa organela não foi localizada em meio ao citoplasma degenerado em ambos os tratamentos. Para candimina, no tratamento de 6h a golicinese (divisão do complexo de Golgi através de um estrangulamento das cisternas, seguido por segmentação) e a cariocinese (divisão do núcleo por invaginação do envelope nuclear) foram observadas, ainda que em meio a uma matriz citoplasmática degenerada em relação ao controle. Isso poderia ser considerado um

evento celular normal em *Trichomonas* uma vez que se acredita que a cada 6h ocorra divisão celular no parasito. A golgicinese é um evento que antecede a divisão nuclear, e conseqüentemente, celular dos trofozoítos, bem compreendido em *Trichomonas* (BENCHIMOL, 2004). Considerando que licorina e candimina atrasam o ciclo celular do parasito e os trofozoítos tratados com candimina realizam golgicinese sugere-se que o ponto de regulação do atraso, verificado por citometria de fluxo, seja distinto para cada alcaloide.

Protuberâncias chamadas *apoptotic blebs* não foram detectadas na membrana plasmática em nenhum tratamento. Os alcaloides não induziram a formação de células multinucleadas, ou corpos apoptóticos, como o taxol e nocodazol induzem (MADEIRO DA COSTA e BENCHIMOL, 2004) - sinais característicos de apoptose - entretanto, o núcleo demonstrou uma forma anormal: alongado ou ramificado em diversas células após ambos os tratamentos. O retículo endoplasmático não foi danificado após os tratamentos e está localizado (i) ao redor do núcleo, formando uma membrana externa ao envelope nuclear, e (ii) englobando alguns hidrogenossomos, o que indica um processo de autofagia dessas organelas de acordo com BENCHIMOL (2004). Numerosos lisossomos, vacúolos e fagossomos foram encontrados distribuídos por toda a célula, mas vacúolos grandes contendo estruturas microtubulares não foram encontrados, ao contrário do efeito do taxol e colchicina nos trofozoítos (MADEIRO DA COSTA e BENCHIMOL, 2004). Os vacúolos encontrados após tratamento com licorina variam em morfologia e tamanho, além de apresentarem estruturas membranosas internas como detectado em parasitos tratados com mebendazol (CARVALHO e GADELHA, 2007). Alguns desses vacúolos apresentaram estruturas similares a figuras de mielina, sinal característico de dano celular (MARIANTE *et al.*, 2003). Intensa vacuolização periférica formando vacúolos entre a membrana citoplasmática e a matriz, já em estado avançado de degeneração, foram verificados após ambos os tratamentos, além de vacúolos em forma de estrias: uns contendo figuras de mielina e outros contendo estruturas membranosas que poderiam indicar um fenômeno de degeneração autofágica (CLARKE, 1990).

Após o tratamento tanto com licorina quanto com candimina, 6h e 24h, os hidrogenossomos não se encontravam alinhados ao complexo axóstilo-costa, mas randomicamente distribuídos na matriz citoplasmática com modificações no tamanho e forma. Foram localizados hidrogenossomos em dois processos distintos de divisão: alguns estavam alongados, indicando processo de segmentação, enquanto outros apresentavam forma de coração. Ainda, alguns hidrogenossomos anormais foram observados em estreito contato com o retículo endoplasmático, indicando sinais de autofagia.

Além da necrose, que corresponde a uma rota passiva de morte celular, o processo ativo conhecido como morte celular programada (PCD – *programmed cell death*) tem papel fundamental no ciclo de vida celular (CHOSE *et al.*, 2003). Ainda, o mesmo autor destaca que as vias atualmente conhecidas de PCD em eucariotos e seus fenótipos resultantes estão relacionados a uma organela chave: a mitocôndria. Esse papel central, tanto em mecanismos caspase-dependentes quanto em caspase-independentes é amplamente reconhecido uma vez que a mitocôndria capta/produz diversas moléculas essenciais para a execução da PCD, atuando como um integrador de morte celular (KROEMER e REED, 2000). Espécies de *Trichomonas*, como *T. vaginalis*, além de outros protozoários de vida livre e de ciliados do rúmen não possuem mitocôndria, mas contam com o hidrogenossomo, uma organela assim chamada devido à sua capacidade de produzir H₂ molecular (MULLER, 1993). Essa organela não possui DNA, a sua produção de energia supre apenas 30% da necessidade do organismo e pouco é conhecido sobre a sua implicação e envolvimento nos processos de morte celular.

Nenhuma proteína diretamente envolvida nas vias apoptóticas caspase-dependente ou independente foi descrita em *T. vaginalis*, sugerindo que esse parasito poderia sofrer PCD por uma via molecular alternativa (CHOSE *et al.*, 2003). Sabe-se que a complexidade da rede metabólica envolvida na sinalização de morte celular em tricomonas não permite o estabelecimento dos fenômenos observados neste trabalho como uma nova via alternativa de morte celular. Em estudos do padrão de morte celular de *T. vaginalis* após tratamento com (i) compostos pró-apoptóticos, como

etoposídeo, doxorrubicina e staurosporina; (ii) metronidazol e (iii) após estresse por depleção de nutrientes, foi verificada uma forma de morte celular não-necrótica, com algumas características de apoptose (CHOSE *et al.*, 2002). Nesse estudo foi demonstrada condensação de cromatina, fragmentação nuclear, presença de corpos apoptóticos, vacuolização citoplasmática e um padrão de fragmentação de DNA que se mostrou intermediário entre apoptose via caspase-dependente (típica fragmentação) ou independente (fragmentos de maior peso molecular). Atualmente, a versão mais aceita da morte celular em *T. vaginalis* é que exista um mecanismo de PCD *apoptose-like*, com presença de proteases *caspase-like*, independente de mitocôndrias. Um trabalho recente demonstra a atividade anti-*T. vaginalis* do metil jasmonato, onde há indução de fenômenos como condensação e fragmentação de DNA, similares a corpos apoptóticos, embora nem a clivagem do DNA genômico nem a ativação de caspases tenha sido demonstrado (OFER *et al.*, 2008). Ainda os autores sugerem que os ensaios para detecção de atividade de caspase podem não ser funcionais para *T. vaginalis* devido à presença de *caspase-like* no parasito, as quais não seriam reconhecidas por substratos específicos geralmente utilizados nesses ensaios.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que licorina e candimina induzem a morte celular em *T. vaginalis* provocando alterações (i) na cinética de crescimento do parasito; (ii) intensa vacuolização citoplasmática; (iii) alterações morfológicas nos hidrogenossomos, mas (iv) sem a ocorrência de fragmentação nuclear, condensação de cromatina, formação de corpos apoptóticos ou exposição de resíduos de fosfatidilserina. Dessa maneira, essas características não coincidem com o perfil de morte celular *apoptose-like* em *T. vaginalis*, como descrito por CHOSE e colaboradores (2002). Então, os alcaloides de Amaryllidaceae licorina e candimina apresentam um conjunto de características morfológicas e bioquímicas que delineiam uma nova abordagem para a morte celular de *T. vaginalis*. Ainda, em relação à licorina, podemos sugerir que seu mecanismo de ação citotóxico em células eucarióticas difere entre as que possuem mitocôndrias e as amitocondriadas.

Algumas características observadas após o tratamento com ambos os alcaloides são comuns a uma forma alternativa de morte celular programada chamada de

paraptose (SPERANDIO *et al.*, 2000). Esse estudo indica a presença de uma via de morte celular independente da ativação sequencial da caspase que não está associada às alterações nucleares clássicas de apoptose. A morfologia de morte em células caspase-deficientes aparentemente difere da morfologia clássica de apoptose e pode estar relacionada ao acúmulo generalizado de fluido que ocorre dentro do retículo endoplasmático e da matriz mitocondrial durante a necrose, onde provavelmente ocorra uma perda não-seletiva de fluido celular homeostático (WYLLIE e GOLSTEIN, 2001). O eucarioto primitivo *Dictyostelium discoides*, cujo genoma apresenta apenas homólogos remotos de caspase, assim como *T. vaginalis*, sofre PCD apresentando grandes vacúolos citoplasmáticos e cromatina morfológicamente normal (OLIE *et al.*, 1998), semelhante ao observado em *T. vaginalis* após o tratamento com licorina e candimina. Ainda, os autores destacam a presença de vacúolos importantes entre a matriz citoplasmática degenerada e a membrana celular, visualizada por MET, com morfologia similar aos trofozoítos de *T. vaginalis* tratados com os alcaloides. O pronunciado volume dos vacúolos periféricos ocorre em modelos onde as caspases estão silenciadas e é parte de um processo adaptativo em resposta a uma sobrecarga de volume celular que seria eficientemente contornado pelas caspases, se elas estivessem presentes e/ou ativas (WYLLIE e GOLSTEIN, 2001). Esse dado novamente aponta para a ausência de caspases em *T. vaginalis* assim como os dados advindos do genoma e o não reconhecimento dos substratos específicos de caspases presentes em *kits* comerciais.

Certamente ainda muitos estudos são necessários para entender toda a complexidade dos mecanismos envolvidos na morte celular de organismos amitocondriados. A investigação de novos compostos citotóxicos e seus mecanismos de ação podem ser considerados estratégias para conhecer as diferentes respostas desses organismos e assim contribuir para o entendimento da morte celular de amitocondriados. Considerando os alcaloides de Amaryllidaceae, informações da farmacologia frente a modelos celulares alternativos são, além de inovadoras, intrigantes, pois proporcionam questionamentos e abordagens farmacológicas que não seriam possíveis em modelos celulares convencionais.

Comparando os mecanismos de ação de ambos os alcaloides de acordo com os testes realizados percebemos muitas semelhanças nos efeitos citotóxicos observados sendo a principal diferença o efeito na cinética de crescimento ocasionada pela licorina. Ao analisar o conjunto de dados obtidos destaca-se que os efeitos citotóxicos observados, após tratamento com os alcaloides, ocorrem em células “morrendo” uma vez que no ensaio de citotoxicidade vemos apenas alguns trofozoítos mortos sendo que a grande maioria deles desaparece da cultura depois de mortos. Isso se confirma quando o experimento do meio novo é conduzido e observa-se a reversão dos efeitos citotóxicos sugerindo que os eventos irreversíveis que levam à morte celular não ocorrem nas primeiras 12h de incubação. Os eventos autofágicos verificados por microscopia eletrônica poderiam ser ainda um mecanismo de defesa visando à sobrevivência do parasito, pois alguns autores defendem que a autofagia *per se* não poderia ser considerada uma via de morte celular. As semelhanças à paraptose, as características ultraestruturais, os fenômenos cinéticos e a ausência de eventos indicativos de apoptose caracterizam a morte celular induzida por licorina e candimina em *T. vaginalis*. De acordo com BURSH (2001) o fenótipo de morte celular verificado é determinado pela velocidade relativa de distintas vias de morte que podem ser desencadeadas simultaneamente e apenas as características daquela mais rápida e efetiva se tornam evidentes.

Considerando os resultados do potencial citotóxico da licorina e candimina, conclui-se relevante investigar, através de avaliação enzimática e molecular, a participação da via das ectonucleotidases neste efeito. Conforme descrito no Capítulo IV, ambos os alcaloides inibiram a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase sendo os resultados mais expressivos: (i) a candimina inibiu, aproximadamente, 90% da hidrólise do ATP; (ii) licorina inibiu 64% da hidrólise do ADP e 62% da hidrólise do AMP; e (iii) os alcaloides não inibiram a transcrição dos genes NTPDase (GIORDANI *et al.*, 2010).

Esses resultados sugerem que a importante inibição da cascata enzimática de degradação de nucleotídeos em *T. vaginalis* demonstrada pela licorina e candimina modula os níveis extracelulares de ATP e adenosina. O acúmulo de nucleotídeos

extracelulares, principalmente o ATP com suas propriedades citotóxicas e pró-inflamatórias, proveniente da inibição enzimática promovida pelos alcaloides além do ATP originário das células do hospedeiro, associado a reduzidas concentrações da adenosina, importante imunomodulador, poderia contribuir para o aumento da susceptibilidade do *T. vaginalis* à resposta imune do hospedeiro na presença de licorina e candimina. A localização extracelular das ectonucleotidases, sua implicação na sobrevivência do parasito e a ampla distribuição dessas enzimas entre distintos patógenos eucarióticos humanos as tornam alvos interessantes para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos (SANSOM *et al.*, 2008). Os efeitos modulatórios de alcaloides de Amaryllidaceae em ectonucleotidases de parasitos é uma abordagem inovadora dentro da extensa gama de atividades farmacológicas apresentadas por esses alcaloides. Considerando a importância fisiológica dessas enzimas, tanto em humanos quanto em parasitos, e os significativos índices de inibição apresentados pela licorina e candimina, os resultados deste trabalho estimulam a investigação desse efeito em outros organismos para entendimento e posterior modulação desse potencial.

Verifica-se que o metronidazol é ativo em menores concentrações (MIC = 16 μ M para TV-VP60), quando comparado à licorina e candimina (MIC > 1 mM). Entretanto, sabe-se que novas vias de citotoxicidade e mecanismos de ação alternativos aos 5-nitroimidazóis são necessários com o advento de parasitos resistentes. Ainda, a pluralidade da citotoxicidade desses alcaloides, atuando em distintas frentes e tendo a morte celular do parasito como evento final, destaca licorina e candimina em relação ao metronidazol. Com as ferramentas de síntese orgânica e os novos conceitos de química medicinal, essa atividade anti-*Trichomonas* verificada para licorina e candimina pode ser um primeiro passo para desenvolver e aperfeiçoar esse potencial.

Tradicionalmente, devido às suas reconhecidas propriedades farmacológicas os alcaloides atraem grande interesse terapêutico. Muitos deles são utilizados diretamente como fármacos e outros servem de matéria-prima para a semi-síntese ou como modelo estrutural para a síntese de análogos, sempre com o objetivo de melhorar a atividade, seletividade e biodisponibilidade. Acreditando que a atividade anti-*T. vaginalis* dos alcaloides de Amaryllidaceae pode ser otimizada e modulada, a licorina foi escolhida

como ponto de partida para a semi-síntese de análogos visando à obtenção de moléculas derivadas com melhor atividade tricomonocida. Embora, de modo geral, a candimina tenha apresentado melhores resultados de citotoxicidade, a quantidade de produto isolado disponível (1,3 g) foi um dos fatores determinantes para a escolha da licorina como protótipo. Além disso, estudos recentes investigam a relação estrutura-atividade de derivados do alcaloide contra parasitos como *Trypanosoma brucei* e *Plasmodium falciparum* (TORIIZUKA *et al.*, 2008; EVIDENTE e KORNIENKO, 2009; LAMORAL-THEYS *et al.*, 2009; McNULTY *et al.*, 2009). Para aperfeiçoar a atividade tricomonocida da licorina o direcionamento da semi-síntese foi a hibridização da molécula do alcaloide com outra também citotóxica para a potencialização do efeito: nesse contexto as poliaminas são moléculas promissoras.

Poliaminas são aminas alifáticas simples, essenciais para proliferação e diferenciação celular que tanto em hospedeiros quanto em parasitos exercem suas funções como cátions no pH intracelular (REGUERA *et al.*, 2005). O metabolismo das poliaminas tem se mostrado um alvo atraente na busca por novos antiparasitários uma vez que os mecanismos de aquisição dessas moléculas são distintos entre células de mamíferos e parasitos refletindo em diferentes efeitos. Assim, a primeira etapa para consolidação da semi-síntese de derivados da licorina foi verificar o potencial anti-*T. vaginalis* de distintos derivados de poliaminas. Conforme Capítulo 5, cinco análogos de poliaminas foram investigados quanto à atividade anti-*T. vaginalis* sendo a *N*-dodecil-1,4-butanodiamina o composto mais ativo entre os testados e também em comparação com a droga padrão metronidazol (GIORDANI *et al.*, 2009). A partir desses resultados decidiu-se sintetizar uma série de derivados *N*-alquilados da 1,4-butanodiamina e, alterando o espaçador entre os átomos de nitrogênio, preparar também uma série de derivados da 1,6-hexanodiamina. De acordo com o apresentado no Capítulo VI verifica-se a expressiva ação anti-*T. vaginalis* dos derivados *N*-alquil diaminas com atividade na ordem de µg/ml. O composto mais ativo foi a hexadecil-1,4-butanodiamina (MIC = 2,5 µg/ml), duas vezes mais potente que o metronidazol, sendo que outros compostos da série também apresentaram atividade pronunciada. A alteração do espaçador entre os átomos de nitrogênio, de 4 para 6 carbonos, não

resultou em maior atividade contra *T. vaginalis*, mas o aumento da cadeia carbônica desde 8 até 16 carbonos refletiu num aumento de atividade nos compostos contendo a unidade 1,4-butanodiamina. Esse dado poderia estar relacionado ao aumento da lipofilicidade e conseqüente facilitação na penetração do composto no parasito. Entretanto, quando analisamos os derivados da 1,6-hexanodiamina o aumento da cadeia carbônica de 8 para 16 carbonos não ocasiona melhora na atividade sendo que os derivados com 10 e 12 carbonos apresentam MIC > 20 µg/ml. Assim, a distância entre os átomos ionizáveis da diamina parece ser um requisito estrutural mais crítico em comparação à variação do tamanho da cadeia carbônica para a atividade contra *T. vaginalis*.

A partir desses resultados foi delineada uma estratégia de semi-síntese da licorina enfatizando três pontos: (i) a síntese de um éster de cadeia longa de mesmo tamanho daquela contida na diamina mais ativa; e um intermediário mesilado da licorina que seria um ponto de partida para (ii) a troca da hidroxila por um grupamento amina, transformando a própria molécula de licorina numa diamina, e (iii) a troca da hidroxila pelas diaminas mais ativas (hexadecil-1,4-butanodiamina e tetradecil-1,4-butanodiamina).

Conforme descrito no Capítulo VII, a química não trivial dos produtos naturais, especificamente da licorina, não permitiu o cumprimento das perspectivas iniciais de modificação estrutural. Uma análise cuidadosa da literatura revela que a maioria dos derivados da licorina investigados na busca de relação estrutura-atividade são produtos naturais isolados e identificados e que a maioria dos derivados sintéticos são ésteres mono ou dissustituídos. Diversas tentativas de obtenção de um intermediário da licorina com um bom grupo de saída em C-2 foram desenvolvidas: iodação, mesilação e tosilação. O insucesso recorrente pode ser atribuído à instabilidade relativa desses intermediários uma vez que a facilidade de saída desses grupos poderia desencadear uma seqüência de rearranjos, aromatização e oxidações. Muitos produtos estáveis oriundos da degradação espontânea ou induzida da licorina estão descritos na literatura (MANSKE *et al.*, 1965; FALES e WILDMAN, 1958; COOK *et al.*, 1954). A hidrogenação foi considerada uma alternativa para amenizar os desafios da

instabilidade, mas o resultado esperado não foi alcançado e em contrapartida mais produtos, possivelmente de degradação, foram obtidos. Dessa forma, com a limitação da quantidade de material de partida, os esforços se concentraram nas reações de esterificação. A descrição na literatura da síntese de derivados acetila, propila e butila da licorina a partir da reação com os respectivos anidridos indicava a factibilidade das reações de esterificação.

Dois ésteres alifáticos foram sintetizados: o 1,2-di-acetil-licorina e o 2-dodecanoil-licorina. O éster de cadeia longa (12C) foi sintetizado baseado no resultado demonstrado no Capítulo V, onde a *N*-dodecil-1,4-butanodiamina foi a diamina mais ativa contra *T. vaginalis* enquanto base livre. Assim, os compostos 1,2-di-benzoil-licorina, 2-benzoil-licorina, 1,2-di-nitrobenzoil-licorina, 1-mononitrobenzoil-licorina e 2-mononitrobenzoil-licorina foram obtidos. O comportamento instável dos derivados da licorina se manteve durante todas as tentativas de síntese, o que se reflete diretamente nos rendimentos obtidos (Capítulo VII).

Como desfecho final deste estudo, a próxima etapa seria a avaliação do impacto das alterações estruturais na molécula de licorina na atividade anti-*T. vaginalis*. Considerando as adversidades e limitações encontradas durante as reações para a obtenção dos derivados da licorina verifica-se uma alteração da proposta inicial onde os resultados dos derivados sintéticos complementaríamos uma estratégia envolvendo as poliaminas. A alteração nas rotas de síntese esperada para aquelas factíveis na prática impediu a avaliação e o entendimento do impacto da hibridização com poliaminas na atividade da licorina. Ainda assim, acredita-se que os derivados sintéticos obtidos são relevantes sob o ponto de vista químico porque representam estruturas inéditas (exceto o derivado acetila) e possibilitam novas perspectivas.

Finalmente, considerando os aspectos multidisciplinares deste trabalho onde distintos métodos e áreas do conhecimento foram aplicadas em prol do estudo da atividade anti-*T. vaginalis* de alcaloides de Amaryllidaceae, está caracterizado um ponto de partida com diversas possibilidades de trabalhos futuros. A contínua investigação dos produtos naturais como potenciais agentes farmacológicos, aliada ao

reconhecimento da carência de estudos relacionados à Parasitologia envolve diretamente o profissional farmacêutico que, devido a sua formação multidisciplinar, pode percorrer diversas abordagens na busca por respostas científicas adequadas à complexidade do tema.

IV. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados neste estudo demonstram a citotoxicidade dos alcaloides de Amaryllidaceae licorina e candimina contra o parasito amitocondriado *Trichomonas vaginalis* e sugerem o mecanismo de ação envolvido. Ainda, a citotoxicidade de diaminas sintéticas contra o parasito aponta para um promissor desenvolvimento desse potencial. A semi-síntese da licorina mostrou-se factível, mas não trivial. Os dados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. *Hippeastrum morelianum* Lem. é uma importante fonte de alcaloides de Amaryllidaceae, fornecendo um alcaloide inédito e outro de ocorrência pouco comum.
2. A licorina e a candimina induzem morte celular em *T. vaginalis* por um mecanismo distinto daqueles com ocorrência já descrita para esse parasito amitocondriado. Os efeitos induzidos por ambos os alcaloides são semelhantes entre si: alterações importantes na ultraestrutura dos trofozoítos, inibição do ciclo celular e alteração na cinética e perfil de crescimento.
3. Características morfológicas sugerindo apoptose não foram encontradas nos parasitos tratados. A licorina, alcaloide pró-apoptótico, possivelmente apresenta um mecanismo de ação alternativo que se manifesta mais claramente quando avaliado em células sem mitocôndria.
4. Licorina e candimina inibem a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase do *T. vaginalis*, implicadas na manutenção do parasitismo. Além da citotoxicidade dos alcaloides, essa inibição enzimática poderia aumentar a suscetibilidade do parasito ao sistema imune do hospedeiro.
5. Poliaminas são citotóxicas contra *T. vaginalis*, sendo as 1,4-butanodiaminas aquelas de melhor atividade.
6. A semi-síntese de derivados da licorina apresenta limitações, mas sete ésteres derivados foram sintetizados, destes, 6 são moléculas inéditas.

A multidisciplinaridade deste trabalho, assim como os intrigantes aspectos envolvidos nas questões de morte celular de amitocondriados e semi-síntese de produtos naturais, abrem algumas perspectivas:

1. A continuidade da investigação da química da família Amaryllidaceae, especialmente seus alcaloides.
2. Investigação da participação dos hidrogenossomos na citotoxicidade induzida pela licorina e candimina, caracterizando sua implicação nos processos de morte celular em *T. vaginalis*.
3. Avaliação do potencial dos alcaloides de Amaryllidaceae como inibidores da via das ectonucleotidases em outros organismos.
4. Continuidade da investigação dos derivados das poliaminas como agentes anti-*Trichomonas*, com desenvolvimento de outros derivados e análise da citotoxicidade contra células epiteliais vaginais.
5. Reprodução das sínteses dos ésteres derivados da licorina e obtenção em maior quantidade, possibilitando a realização de análises espectroscópicas adicionais, assim como a otimização das condições de solubilização para utilização nos ensaios *in vitro* anti-*T. vaginalis*.

VI. REFERÊNCIAS

- ALDERETE, J. F.; PROVENZANO, D.; LEHKER, M. W. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microbial Pathogenesis*, v. 19, p. 93-103, 1995.
- ANTOUN, M. D.; MENDOZA, N. T.; RIOS, Y. R. Cytotoxicity of *Hymenocallis expansa* alkaloids. *Journal of Natural Products*, v. 56, p.1423-1427, 1993.
- ARRIGONI, O.; ARRIGONI, A.; LISO, R.; CALABRESE, G. Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. *Nature*, v. 256, p. 513-514, 1975.
- ARRIGONI, O. Ascorbate system in plant development. *Journal of Bioenergetic and Biomembranes*, v. 26, p. 407-409, 1994.
- ARROYO, R.; GONZALES-ROBLES, A.; MARTINEZ-PALOMO, A.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology*, v. 7, p. 299-309, 1993.
- BACCHI, C. J.; YARLETT, N. Polyamine metabolism as chemotherapeutic target in protozoan parasites. *Mini Review on Medicinal Chemistry*, v. 2, p. 553-563, 2002.
- BALUNA, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In: *The alkaloids: Chemistry and Biology*. 2006. v.63. p.99-179.
- BASTIDA-CORCUERA, F. D.; OKUMURA, C. Y.; COLOCOUSSI, A.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryotic Cell*, v. 4, p. 1951-1958, 2005.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under Microscopy. *Microscopy Microanalysis*, v. 10, p. 528-550, 2004.
- BENCHIMOL, M. Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue Cell*, v. 41, p. 151-168, 2009.
- BIEDERBICK, A.; KOSAN, C.; KUNZ, J.; ELSASSER, H. P. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 19018-19024, 2000.
- BIGONNESSE, F.; LEVESQUE, S. A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S. C.; FERNANDES, M. J.; SÉVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*, v. 43, p. 5511-5519, 2004.
- BOURS, M. J. L.; SWENNEN, E. L. R.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B. N.; DAGNELIE, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling

molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology Therapy*, v. 112, p. 358–404, 2006.

BOWDEN, F. J.; PATERSON, B. A.; MEIN, J.; SAVAGE, J.; FAIRLEY, C. K.; GARLAND, S. M.; TABRIZI, S. N. Estimating the prevalence of *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea* and human papilloma virus infection in indigenous women in northern Australia. *Sexual Transmitted Disease*, v. 75, p. 431-434, 1999.

BREMNER, A. F.; COOMBS, G. H.; NORTH, M. J. Antitrichomonal activity of alpha-difluoromethylornithine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 20, p. 405-411, 1987.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Review*, v. 87, p. 659–797, 2007.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, L. K. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Review*, v. 87, p. 659–797, 2009.

BURSCH, W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differential*, v. 8, p. 569–581, 2001.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, v. 25, p. 475-516, 2008.

CARLTON, J. M.; HIRT, R. P.; SILVA, J. C.; DELCHER, A. L.; SCHATZ, M.; ZHAO, Q.; WORTMAN, J. R.; BIDWELL, S. L.; ALSMARK, U. C.; BESTEIRO, S.; SICHERITZ-PONTEN, T.; NOEL, C. J.; DACKS, J. B.; FOSTER, P. G.; SIMILLION, C.; VAN DE PEER, Y.; MIRANDA-SAAVEDRA, D.; BARTON, G. J.; WESTROP, G. D.; MULLER, S.; DESSI, D.; FIORI, P. L.; REN, Q.; PAULSEN, I.; ZHANG, H.; BASTIDA-CURCUERA, F. D.; SIMOES-BARBOSA, A.; BROWN, M. T.; HAYES, R. D.; MUKHERJEE, M.; OKOMURA, C. Y.; SCHNEIDER, R.; SMITH, A. J.; VANACOVA, S.; VILLALVALZO, M.; HAAS, B. J.; PERTEA, T. V.; FELDBLYUM, T. V.; UTTERBACK, T. R.; SHU, C. L.; OSOEGAWA, K.; DE JONG, P. J.; HRDY, I.; HORVATHOVA, L.; ZUBACOVA, Z.; DOLEZAL, P.; MALIK, S. B.; LOGSDON, J. M.; HENZE, JR. K.; GUPTA, A.; WANG, C. C.; DUNNE, R. L.; UPCROFT, J. A.; UPCROFT, P.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L.; TANG, P.; CHIU, C. H.; LEE, Y. S.; EMBLEY, T. M.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C.; TACHEZY, J.; FRASER-LIGGETT, C. M.; JOHNSON, P. J. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, v. 315, p. 207-212, 2007.

CARVALHO, K. P.; GADELHA, A. P. Effects of three benzimidazoles on growth, general morphology and ultrastructure of *Tritrichomonas foetus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 275, p. 292–300, 2007.

CASTILHOS, T. S. *Investigação química em Habranthus erectus Ravenna e Rhodophiala bifida (Herb.) Traub (Amaryllidaceae) e avaliação biológica in vitro do*

alcalóide montanina, 2004. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, Porto Alegre.

CASTILHOS, T. S.; GIORDANI, R. B.; HENRIQUES, A. T.; MENEZES, F. S.; ZUANAZZI, J. A. S. Avaliação *in vitro* das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 209-214, 2007.

CEDRON, J. C.; GUTIERREZ, D.; FLORES, N.; RAVELO, A. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A. Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 4694-4701, 2010.

CHOSE, O.; NOEL, C.; GERBOD, D.; BRENNER, C.; VISCOGLIOSI, E.; ROSETO, A. A form of cell death with some features resembling apoptosis in the amitochondrial unicellular organism *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Cell Research*, v. 276, p. 32-39, 2002.

CHOSE, O.; SARDE, C.O.; GERBOD, D.; VISCOGLIOSI, E.; ROSETO, A. Programmed cell death in parasitic protozoans that lack mitochondria. *Trends Parasitology*, v. 19, p. 559-564, 2003.

CITOGLU, G.; TANKER, M.; GÜMÜSEL, B. Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. *Phytoterapy Research*, v. 12, p. 205-206, 1998.

CLARKE, P. G. H. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*, v. 181, p. 195-213, 1990.

COOK, J. W.; LOUDON, J. D.; MCCLOSKEY, P. Dehydration of lycorine. *Journal of the Chemical Society*, p. 4176-4181, 1954.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, v. 40, p.1585-1612, 1985.

COTCH, M. F.; PASTOREK II, J. G.; NUGENT, R. P.; YERG, D. E.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A. Demographic and behavioral predictors of *Trichomonas vaginalis* infection among pregnant women. *Obstetrics and Gynecology*, v. 78, p. 1087-1092, 1991.

COTCH, M. F.; PASTOREK II, J. G.; NUGENT, R. P.; HILLIER, S. L.; GIBBS, R. S.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A.; EDELMAN, R.; CAREY, J. C.; REGAN, J. A.; KROHN, M. A.; KLEBANOFF, M. A.; RAO, A. V.; RHOADS, G. G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 24, p. 353-360, 1997.

CROUCH, M. L. V.; BENCHIMOL, M.; ALDERETE, J. F. Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microbial Pathogenesis*, v. 31, p. 131-144, 2001.

DA SILVA, A. F. S.; ANDRADE, J. P.; BEVILAQUA, L. R. M.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, I.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Anxiolytic-, antidepressant- and anti-convulsant- like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 85, p. 148-154, 2006.

DA SILVA, A. F. S.; ANDRADE, J. P.; MACHADO, K. R. B.; ROCHA, A. B.; APEL, M. A.; SOBRAL, M. E. G.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine*, v. 15, p. 882-885, 2008.

DE CARLI, G. A. *Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas*. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. v. 01. 907 p.

DE CARLI, G. A.; TASCA, T. Cultivo de *Trichomonas tenax* e *Trichomonas hominis*. In: De Carli, G. A. *Parasitologia Clínica. Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para Diagnóstico das Parasitoses Humanas*. 2 Ed. São Paulo: Atheneu, p. 491-496. 2007.

DEBNATH, J.; BAEHRECKE, E. H.; KROEMER, G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*, v. 1, p. 66-74, 2005.

DEL GIUDICE, L.; MASSARDO, D. R.; PONTIERI, P. WOLF, K. Interaction between yeast mitochondrial and nuclear genomes: null alleles of RTG genes affect resistance to the alkaloid lycorine in rho0 petites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, v. 354, p. 9-14, 2005.

DÖPKE, W. Alkaloids of the *Hippeastrum* type. *Pharmazie*, v. 295, p. 920-924, 1962.

DUMONT, P.; INGRASSIA, L.; ROUZEAU, S.; RIBAUCCOUR, F.; THOMAS, S.; ROLAND, I.; DARRO, F.; LEFRANC, F.; KISS, R. Amaryllidaceae isocarbostryl narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia*, v. 9, p. 766-776, 2007.

DYALL, S.; JOHNSON, P. J. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Current Opinion Microbiology*, v. 3, p. 404-411m, 2000.

ELGORASHI, E.; STAFFORD, I.; JÄGER, A.; VAN STADEN, J. Inhibition of [3H] Citalopram binding to the rat brain serotonin transporter by Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, v. 72, p. 470-473, 2006.

- ENGBRING, J.; ALDERETE, J. F. Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Molecular Microbiology*, v. 28, p. 305-313, 1998.
- EVIDENTE, A.; ARRIGONI, O.; LUSO, R.; CALABRESE, G.; RANDAZO, G. Further experiments on structure-activity relationships among lycorine alkaloids. *Phytochemistry*, v. 25, p. 2739-2743, 1986.
- EVIDENTE, A.; KORNIENKO, A. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews*, v. 8, p. 449-459, 2009.
- EVIDENTE, A.; KIREEV, A. S.; JENKINS, A. R.; ROMERO, A. E.; STEELANT, W. F. A.; VAN SLAMBROUCK, S.; KORNIENKO, A. Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Medica*, v. 75, p. 501-507, 2009.
- EVIDENTE, A.; RANDAZZO, G. Degradation of lycorine by *Pseudomonas* species strain ITM 311. *Journal of Natural Products*, v. 48, p. 564-570, 1985.
- FALES, H. M.; WILDMAN, W. C. Interconversions of Amaryllidaceae alkaloids by sodium and amyl alcohol. *Journal of Organic Chemistry*, v. 80, p. 4395-4404, 1958.
- FEHER, M.; SCMIDT, J.M. Property distributions: differences between drugs, natural products and molecules from combinatorial chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 43, p. 218-227, 2003.
- FENNELL, C. W.; VAN STADEN, J. *Crinum* species in traditional and modern medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, p. 15-21, 2001.
- FILLIPINI, A.; TAFFS, R. E.; AGUI, T.; SITKOVISKY, M. V. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, p. 334-340, 1990.
- FORTENBERRY, J. D.; BRIZENDINE, E. J.; KATZ, B. P. Subsequent sexually transmitted infections among adolescent women with genital infection due to *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea* or *Trichomonas vaginalis*. *Sexual Transmitted Diseases*, v. 26, p. 26-32, 1999.
- FURTADO, M. B.; BENCHIMOL, M. Observation of membrane fusion on the interaction of *Trichomonas vaginalis* with human vaginal epithelial cells. *Parasitology Research*, v. 84, p. 213-20, 1998.
- GABRIELSEN, B.; MONATH, T. P.; HUGGINS, J. W.; KEFAUVER, D. F.; PETTIT G.; GROSZEK, G.; HOLLINGSHEAD, M.; KIRSI, J. J.; SHANNON, W. M.; SHUBERT, E. M.; DARE, J.; UGARKAR, B.; USSERY, M. A.; PHELAN, M. J. Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. *Journal of Natural Products*, v. 55, p. 1569-1581, 1992.

GALM, U.; SHEN, B. Natural product drug discovery: the times have never been better. *Chemical Biology*, v. 14, p. 1098-10104, 2007.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 12, p. 306-317, 2008.

GARCIA, A. F.; BENCHIMOL, M.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. *Infection and Immunology*, v. 73, p. 2602-2610, 2005.

GARCIA, A. F.; ALDERETE, J. F. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiology*, v. 25, p. 7-16, 2007.

GILBERT, R.; BIA, G.; BEACH, D.; KLAESSIG, S.; SINGH, B. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultures in vitro. *Infection and Immunology*, v. 68, p. 4200-4206, 2000.

GIORDANI, R. B. *Estudo fitoquímico de Hippeastrum morelianum e Hippeastrum santacatarina: duas espécies de Amaryllidaceae*, 2007. 185 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, Porto Alegre.

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; DUTILH, J. H.; ZUANAZZI, J. A. S. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Química Nova*, v. 31, p. 2042-2046, 2008.

GIORDANI, R. B.; DE ALMEIDA, M.; FERNANDES, E.; FRANÇA DA COSTA, C.; DE CARLI, G.; TASCA, T.; ZUANAZZI, J. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of synthetic lipophilic diamine and amino alcohol derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 63, p. 613-617, 2009.

GIORDANI, R. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A. S.; TASCA, T. *Trichomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitology International*, v. 59, p. 226-231, 2010.

GOLSTEIN, P.; AUBRY, L.; LEVRAUD, J. P. Cell-death alternative model organisms: why and which. *Nature*, v. 4, p. 1-6, 2003.

GOTTLIEB, S. L.; DOUGLAS, J. M. JR.; SCHMID, D. S. GAIL, B.; IATESTA, M.; MALOTTE, K.; ZENILMAN, J.; FOSTER, M.; BARÓN, A. E.; STEINER, J. F. Soroprevalence and correlates of herpes simplex virus type 2 infection in five sexually transmitted disease clinics. *Journal of Infection Diseases*, v. 186, p. 1381-1389, 2004.

GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology*, v. 137, p. 577-584, 1993.

- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 1-93, 2006.
- HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 218, p. 916-923, 1996.
- HANLEY, P. J.; MUSSTE, B.; RENIGUNTA, V.; LIMBERG, S. H.; DALPKE, A. H.; SUS, R.; HEEG, K. M.; PREISIG-MULLER, R.; DAUT, J. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca^{2+} and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 9479-9484, 2004.
- HARVEY, A. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 9, p. 294-232, 2008.
- HEBY, O.; ROBERTS, S. C.; ULLMAN, B. Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. *Biochemical Society Transactions*, v. 31, p. 415-419, 2003.
- HEINRICH, M.; TEOH, H. L. Galanthamine from snow-drop: the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 92, p. 147-162, 2004.
- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, v. 141, p. 106-110, 1982.
- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, v. 176, p. 55-60, 1984.
- HOFMANN JUNIOR, A. E.; SEBBEN, C.; SOBRAL, M.; DUTILH, J. H. A.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. S. Alkaloids of *Hippeastrum glaucescens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 1455-1456, 2003.
- HOUGHTON, P. J.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEGBULUBE, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochemistry*, v. 65, p. 2893-2896, 2004.
- HUPPERT, J. S. Trichomoniasis in teens: an update. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, v. 21, p. 371-378, 2009.
- JIMENEZ, A.; SANTOS, A.; ALONSO, G.; VAZQUEZ, D. Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 425, p. 342-348, 1976.
- JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports*, v. 24, p. 886-905, 2009.

JOHNSTON, V. J.; MABEY, D. C. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 21, p. 56-64, 2008.

JUNGER, W. G. Purinergic regulation of neutrophil chemotaxis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 2528-2540, 2008.

KARADENIZ, H.; GULMEZ, B.; SAHINCI, F.; ERDEM, A.; KAYA, G. I.; UNVER, N.; KIVCAK, B.; OZSOZ, M. Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 295-302, 2003.

KENNEDY, J. Mutasynthesis, chemobiosynthesis and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. *Natural Products Report*, v. 25, p. 25-34, 2008.

KIGOZI, G. G.; BRAHMBHATT, H.; WABWIRE-MANGEN, F.; WAWER, M.; SERWADDA, D.; SEWANKAMBO, N.; GRAY, R. Treatment of *Trichomonas* in pregnancy and adverse outcomes of pregnancy: a subanalysis of a randomized trial in Rakai, Uganda. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 189, p. 1398-1400, 2003.

KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH J. C.; MARK A.; SHARON, L.; HILLIER, R. P.; NUGENT, M. P. H.; ELIZABETH, A.; ERNEST, J. M.; HEINE, J. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; Miodovnik, M.; SIBAI, B. M.; VAN DORSTEN, J. P.; DOMBROWSKI, M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J. M.; LEVENO, K. J. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 345, p. 487-493, 2001.

KLEINA, P.; BETTIM-BANDINELLI, J.; BONATTO, S. L.; BENCHIMOL, M.; BOGO, M. R. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. *International Journal for Parasitology*, v. 34, p. 963-670, 2004.

KRIEGER, J. N.; JENNY, C.; VERDON, M.; SIEGEL, N.; SPRINGWATER, R.; CRITCHLOW, C. W.; HOLMES, K. K. Clinical manifestations of trichomoniasis in men. *Annals of International Medicine*, v. 118, p. 844-849, 1993.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*, v. 6, p. 513-519, 2000.

KROEMER, G.; LEVINE, B. Autophagic cell death: the history of a misnomer. *Nature Review Molecular Cell Biology*, v. 9, p. 1004-1010, 2008.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, D.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.;

LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differentiation*, v. 16, p. 3-11, 2009.

KUCKNOOR, A. S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* adherence mediates differential gene expression in human vaginal epithelial cells. *Cellular Microbiology*, v. 7, p. 887-897, 2005.

KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 199-212, 1999.

LAGA, M.; MANOKA, A.; KIVUVU, M.; MALELE, B.; TULZA, M.; NZILA, M.; GOEMAN, J.; BEHETS, F.; BATTER, V.; ALARY, M.; HEYWARD, W. L.; RYDER, R. W.; PIOT, P. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: Results from a cohort study. *AIDS*, v. 7, p. 95-102, 1993.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, v. 15, p. 279-289, 2007.

LAMORAL-THEYS, D.; ANDOLFI, A.; VAN GOIETSENOVEN, G.; CIMMINO, A.; LE CALVÉ, B.; WAUTHOZ, N.; MÉGALIZZI, V.; GRAS, T.; BRUYÈRE, C.; DUBOIS, J.; METHIEU, V.; KORNIENKO, A.; KISS, R.; EVIDENTE, A. Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: An investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 6244-6256, 2009.

LAMORAL-THEYS, D.; DECAESTECKER, C.; MATHIEU, V.; DUBOIS, J.; KORNEINKO, A.; KISS, R.; EVIDENTE, A.; POTTIER, L. Lycorine and its derivatives for anticancer drug design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 10, p. 41-50, 2010.

LAND, K. M.; DELGADILLO-CORREA, G.; TACHEZY, J.; VANACOVA, S.; HSIEH, C. L.; SUTAK, R.; JOHNSON, P. J. Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Molecular Microbiology*, v. 51, p. 115-122, 2004.

LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Biology of trichomoniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 13, p. 37-45, 2000.

LEVINE, W. C.; POPE, V.; BHOOMKHAR, A. Increase in endocervical CD4 lymphocytes among women with nonulcerative sexually transmitted diseases. *Journal of Infectious Diseases*, v. 177, p. 167-174, 1998.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, v. 132, p. 27-42, 2008.

- LI, R.; TAN, X. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Research*, v. 67, p. 18-23, 2005.
- LI, S.; LIU, J.; TANG, L.; SHI, Y.; REN, W.; HU, W. Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. *Oncology Reports*, v. 17, p. 377-384, 2007.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *Journal of Natural Products*, v. 56, p. 1331-1338, 1993.
- LIU, J.; HU, W.; HE, L.; YE, M.; LI, Y. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS Letters*, v. 578, p. 245-250, 2004.
- LIU, J.; LI, Y.; TANG, L. J.; ZHANG, G. P.; HU, W. X. Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 61, p. 229-234, 2007.
- LIU, X.S.; JIANG, J.; JIAO, X.Y.; WU, Y.E.; LIN, J.H.; CAI, Y.M. Lycorine induces apoptosis and down regulation of MCL-1 in human leukemia cells. *Cancer Letters*, v. 274, p. 16-24, 2009.
- LOPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, v. 71, p. 2521-2529, 2002.
- LOUW, C. A. M.; REGNIER, T. J. C.; KORSTEN, L. Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in the control of infectious disease. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, p. 147-154, 2002.
- MACKAY, Z. B.; BACA, A. M.; MALLARI, J. P.; APSEL, B.; SHELAT, A.; HANSELL, E. J.; CHIANG, P. K.; WOLFF, B.; GUY, K. R.; WILLIAMS, J.; MCKERROW, J. H. Discovery of trypanocidal compounds by whole cell HTS of *Trypanosoma brucei*. *Chemical and Biology on Drug Discovery*, v. 67, p. 355-363, 2006.
- MADEIRO DA COSTA, R. F.; BENCHIMOL, M. The effect of drugs on cell structure of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology Research*, v. 92, p. 159-170, 2004.
- MANSKE, R. H.; HOLMES, H. L.; RODRIGO, R. G. Alkaloids of the Amaryllidaceae. In: *The alkaloids*. Academic Press, New York. 1965. v.18. p.315-333.
- MARIANTE, R. M.; GUIMARÃES, C. A.; LINDEN, R.; BENCHIMOL, M. Hydrogen peroxide induces caspase activation and programmed cell death in the amitochondrial *Tritrichomonas foetus*. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 120, p. 129-141, 2003.

- MARIANTE, R. M.; VANCINI, R. G.; BENCHIMOL, M. Cell death in trichomonads: new insights *Histochemistry and Cell Biology*, v. 125, p. 545-556, 2006.
- MATOS, J. A. A.; BORGES, F. P.; TASCA, T.; BOGO, M. R.; DE CARLI, G. A.; FAUTH, M. G.; DIAS, R. D.; BONAN, C. D. Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 770-775, 2001.
- MCCLELLAND, R. S.; SANGARE, L.; HASSAN, W. M.; LAVREYS, L.; MANDALIYA, K.; KIARIE, J.; NDINYA, J.; JAOKO, W.; BAETEN, J. M. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *Journal of Infectious Diseases*, v. 195, p. 698–702, 2007.
- MCLACHLAN, A.; KEKRE, N.; MCNULTY, J.; PANDEY, S. Pancratistatin: a natural anticancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis. *Apoptosis* v. 10, p. 619–630, 2005.
- MCNULTY, J.; NAIR, J. J.; BASTIDA, J.; PANDEY, S.; GRIFFIN, C. Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry*, v. 70, p. 913-919, 2009.
- MEEROW, A. W.; SNIJMAN, D. A. Amaryllidaceae. In: Kubitzki, K. *The families and genera of vascular plants – Flowering plants Monocotyledons Lilianae (except Orchidaceae)*, Berlin: Springer-Verlag, 1998. p. 83-110.
- MILER, W. C.; SWYGARD, H.; HOBBS, M. M.; MARCIA, M.; FORD, C. A.; HANDCOCK, M. S.; MORRIS, M.; SCHMITZ, J. L.; COHEN, M. S.; HARRIS, K. M.; UDRY, J. R. The prevalence of *Trichomonas* in young adults in the United States. *Sexual Transmitted Diseases*, v. 32, p. 593–598, 2005.
- MOODLEY, P.; WILKINSON, D.; CONNOLLY, C.; MOODLEY, J.; STURM, A. W. *Trichomonas vaginalis* is associated with pelvic inflammatory disease in women infected with human immunodeficiency virus. *Clinical and Infectious Diseases*, v. 34, p. 519–522, 2002.
- MÜLLER, M. Biochemistry of *Trichomonas vaginalis*. In: Trichomonads parasitic in humans. Springer-Verlag, New York. 1990. p. 53-83.
- MÜLLER, M. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, v. 139, p. 2879-2889, 1993.
- MULLER, S.; COOMBS, G. H.; WALTER, R. D. Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. *Trends in Parasitology*, v. 17, p. 242-249, 2001.
- MUNAGALA, N. R.; WANG, C. C. Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Biochemistry on Parasitology*, v. 127, p. 143–149, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477, 2007.

OFER, K.; GOLD, D.; FLESCHER, E. Methyl jasmonate induces cell cycle block and cell death in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology*, v. 38, p. 959-968, 2008.

OLIE, R. A.; DURRIEU, F.; CORNILLON, S.; LOUGHRAN, G.; GROSS, J.; EARNSHAW, W.C.; GOLSTEIN, P. Apparent caspase independence of programmed cell death in *Dictyostelium*. *Current Biology*, v. 27, p. 955-958, 1998.

PETERMAN, T. A.; TIAN, L. H.; METCALF, C. A.; SATTERWHITE, C. L.; MALOTTE, C. K.; DEAugustine, N.; PAUL, S. M.; CROSS, H.; RIETMEIJER, C. A.; DOUGLAS, J. M. JR. High incidence of new sexually transmitted infections in the year following a sexually transmitted infection: a case for re-screening. *Annals of Internal Medicine*, v. 145, p. 564-572, 2006.

PETERSON, K. M.; ALDERETE, J. F. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v. 37, p. 755-762, 1982.

PETERSON, K. M.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* is dependent on uptake and degradation of human low density lipoproteins. *Journal of Experimental Medicine*, v. 160, p. 1261-1272, 1984.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: Identities and functions. *International Review of Cytology*, v. 158, p. 141-214, 1995.

PROVENZANO, D.; ALDERETE, J. F. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunology*, v. 63, p. 3388-3395, 1995.

QU, X.; ZOU, Z.; SUN, Q.; LUBY-PHELPS, K.; CHENG, P.; HOGAN, R. N.; GILPIN, C.; LEVINE, B. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell*, v. 128, p. 931-946, 2007.

RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *Journal of Cellular Physiology*, v. 192, p. 131-137, 2002.

REGUERA, R. M.; TEKWANI, B. L.; BALAÑA-FOUCE, R. Polyamine transport in parasites: A potential target for new antiparasitic drug development. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 140, p. 151-164, 2005.

REIS, I. A.; MARTINEZ, M. P.; YARLETT, N.; JOHNSON, P. J.; SILVA-FILHO, F. C.; VANNIER-SANTOS, M. A. Inhibition of polyamine synthesis arrests trichomonad growth and induces destruction of hydrogenosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, p. 1919-1923, 1999.

RENDÓN-MALDONADO, J. G.; ESPINOSA-CANTELLANO, G. R. A.; MARTINEZ-PALOMO, A. *Trichomonas vaginalis*: In vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leucocytes, and erythrocytes. *Experimental Parasitology*, v. 89, p. 241-250, 1998.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. *American Journal of Cardiology*, v. 101, p. 43D–49D, 2008.

SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v. 72, p. 765-781, 2008.

SARKIS, J. J. F.; BATTASTINI, A. M. O.; OLIVEIRA, E. M.; FRASSETTO, S. S.; DIAS, R. D. ATP diphosphohydrolases: An overview. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v. 47, p. 131-136, 1995.

SAWYER, P. R. N.; BROGDEN, R. M.; PINDER, T. M.; SPEIGHT, M.; AVERY, S. Tinidazole: a review of its antiprotozoal activity and therapeutic efficacy. *Drugs*, v. 11, p. 423-440, 1976.

SCHEMEDA-HIRSHMANN, G.; ASTUDILLO, L.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. A new activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, v. 45, p. 515-518, 2000.

SCHULTZ, A. *Introdução à Botânica Sistemática*. 6. ed Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990. v. 2. 414p.

SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 794-803, 2004.

SENA, A. C.; MILLER, W. C.; HOBBS, M. M.; SCHWEBKE, J. R.; LEONE, P. A.; SWYGARD, H.; ATASHILI, J.; COHENT, M. *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, p. 13–22, 2007.

SHOEI-SHENG, L.; UPPALA, V.; PRASAD, R. C.; SIO-HONG, L.; JUNG-HSIN, L. Preparation of secolycorines against acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 1034-1043, 2007.

SHEW, M. L.; FORTENBERRY, J. D.; TU, W.; JULIAR, B. E.; BATTEINGER, B. E.; QADADRI, B.; BROWN, D. R. Association of condom use, sexual behaviours, and sexually transmitted infections with the duration of genital human papillomavirus infections among adolescent women. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, v. 160, p. 151-156, 2006.

SHI, J.-D., KUKAR, T., WANG, C.-Y., LI, Q.-Z., CRUZ, P.E., DAVOODI-SEMIROMI, A., YANG, P., YUNRONG, G., LIAN, W., WU, D.H., SHE, J.X. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 17474-17478, 2001.

SILVA, A. F. S.; ANDRADE, J. P.; BEVILAQUA, L. R. M.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, I.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Anxiolytic, antidepressant and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine from *Hippeastrum vitattum*. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, v. 85, p. 148-152, 2006.

SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochimica and Biophysics Acta*, v. 1386, p. 65-78, 1998.

SOBEL, J.; NYIRJESY, P.; BROWN, W. Tinidazole therapy for metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis. *Clinical and Infectious Disease*, v. 33, p. 1341-1346, 2001.

SORVILLO, F.; KERNDT, P. *Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission. *Lancet*, v. 351, p. 213-214, 1998.

SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and Africans. *Emergent Infectious Disease*, v. 7, p. 927-932, 2001.

SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 14376-14381, 2000.

SUTTON, M.; STERNBERG, M.; KOUMANS, E. H.; MCQUILLAN, G.; BERMAN, S.; MARKOWITZ, L. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001–2004. *Clinical and Infectious Diseases*, v. 45, p. 1319–1326, 2007.

SZLAVIK, L.; GYURIS, A.; MINAROVITS, J.; FORGO, P.; MOLNAR, J.; J. HOHMANN. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, v. 70, p. 871–873, 2004.

TASCA, T., BONAN, C. D., DE CARLI, G. A., SARKIS, J. J. *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. *Parasitology Research*, v. 93, p. 300-303, 2005.

TASCA, T.; BONAN, C. D.; DE CARLI, G. A.; BATTASTINI, A. M.; SARKIS, J. J. Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology*, v. 105, p. 167-173, 2003.

TORIIZUKA, Y.; KINOSHITA, E.; KOGURE, N.; KITAJIMA, M.; ISHIYAMA, A.; OTOGURO, K.; YAMADA, H.; ŌMURA, S.; TAKAYAMA, H. New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 10182-10189, 2008.

VAN LOO, G.; SAELENS, X.; VAN GURP, M.; MACFARLANE, M.; MARTIN, S.J.; VANDENABEELE, P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation*, v. 9, p. 1031-1042, 2002.

VIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica*, v. 39, p. 71-75, 2000.

VISCOGLIOSI, E.; EDGCOMB, V. P.; GERBOD, D.; NOEL, C.; DELGADO-VISCOGLIOSI, P. Molecular evolution inferred from small subunit rRNA sequences: what does it tell us about phylogenetic relationships and taxonomy of the parabasilids? *Parasite*, v. 6, p. 279-291, 1999.

WALLACE, H. M.; FRASER, A. V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochemistry*, v. 376, p. 1-14, 2003.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 9898-9901, 1996.

WANG, Y. C.; CHU, J. J. H.; YANG, P. L.; CHEN, W.; YATES, M. V. rapid identification inhibitors that interfere with poliovirus replication using a cell-based assay. *Antiviral Research*, v. 77, p. 232-236, 2008.

WEINSTOCK, H.; BERMAN, S.; CATES, W. JR. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspectives in Sexually Reproductive Health*, v. 36, p. 6-10, 2004.

WENIGER, B.; ITALIANO, L.; BECK, J. P.; BASTIDA, J.; BERGOÑON, S.; CODINA, C.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, v. 61, p. 77-79, 1995.

WHO, 1995. The World Health Report. Bridging the Gaps. WHO, Geneva, p. 1-118.

WHO, 1997. The World Health Report, Conquering Suffering, Enriching Humanity. WHO, Geneva, p. 1-162.

WHO, 2001. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. WHO, Geneva, p. 1-120.

WYLLIE, A. H.; GOLSTEIN, P. More than one way to go. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 11-13, 2001.

YARLETT, N.; BACCHI, C. J. Effect of DL-alpha-difluoromethylornithine on polyamine synthesis and interconversion in *Trichomonas vaginalis* grown in a semi-defined medium. *Molecular Biochemistry on Parasitology*, v. 31, p. 1-9, 1988.

YARLETT, N.; BACCHI, C. J. Parasite polyamine metabolism: targets for chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, v. 146, p. 2715-2722, 1994.

YUI, S.; MIKAMI, M.; KITAHARA, M.; YAMAZAKI, M. The inhibitory effect of lycorine on tumor cell apoptosis induced by polymorphonuclear leukocyte-derived calprotectin. *Immunopharmacology*, v. 40, p. 151-162, 1998.

ZHANG, Z. F.; BEGG, C. B. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *International Journal of Epidemiology*, v. 23, p. 682-690, 1994.

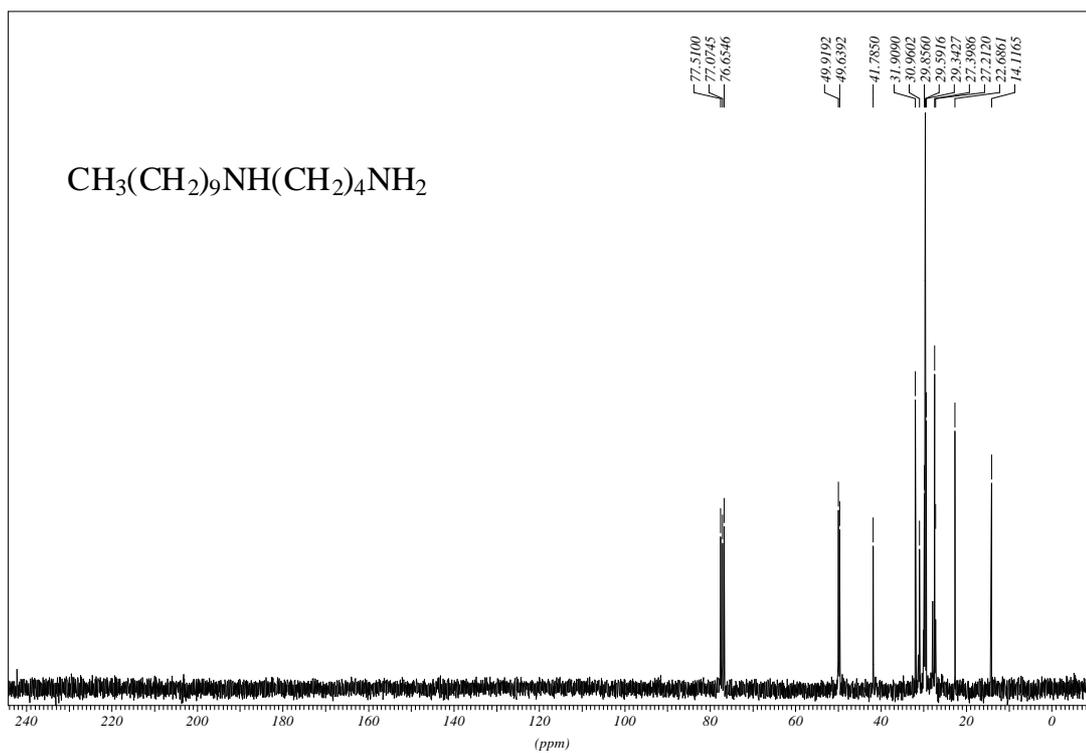
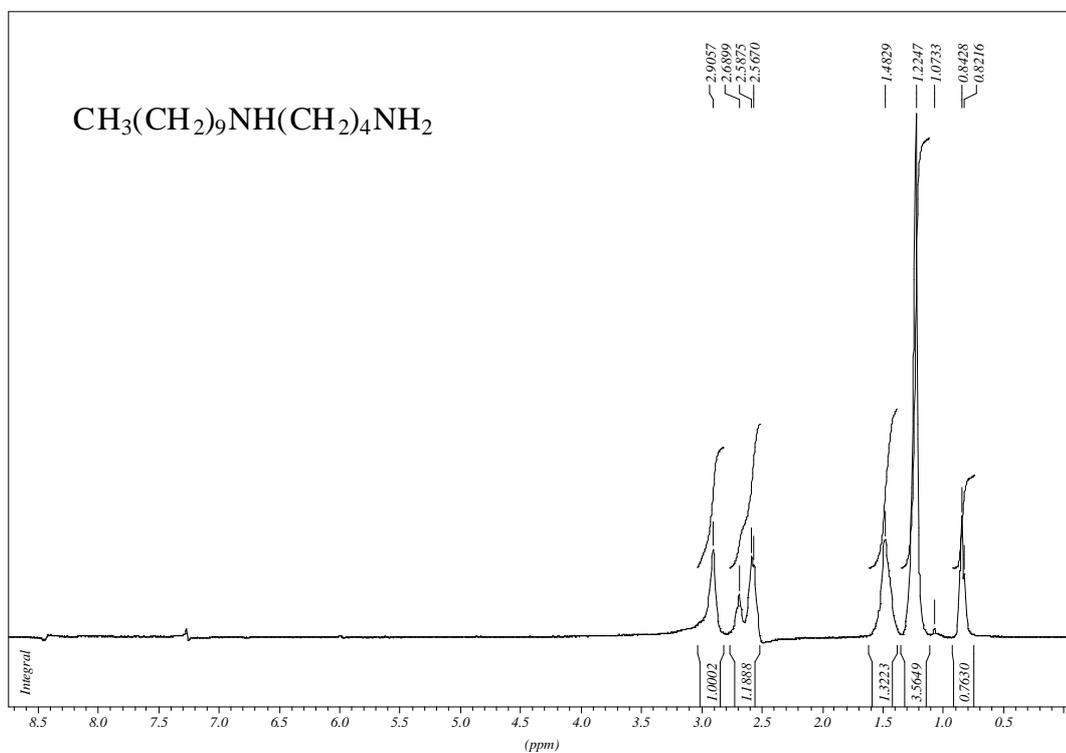
ZHONG, J. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Products Report*, v. 22, p. 11-126, 2007.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Development Research*, v. 52, p. 44-56, 2001.

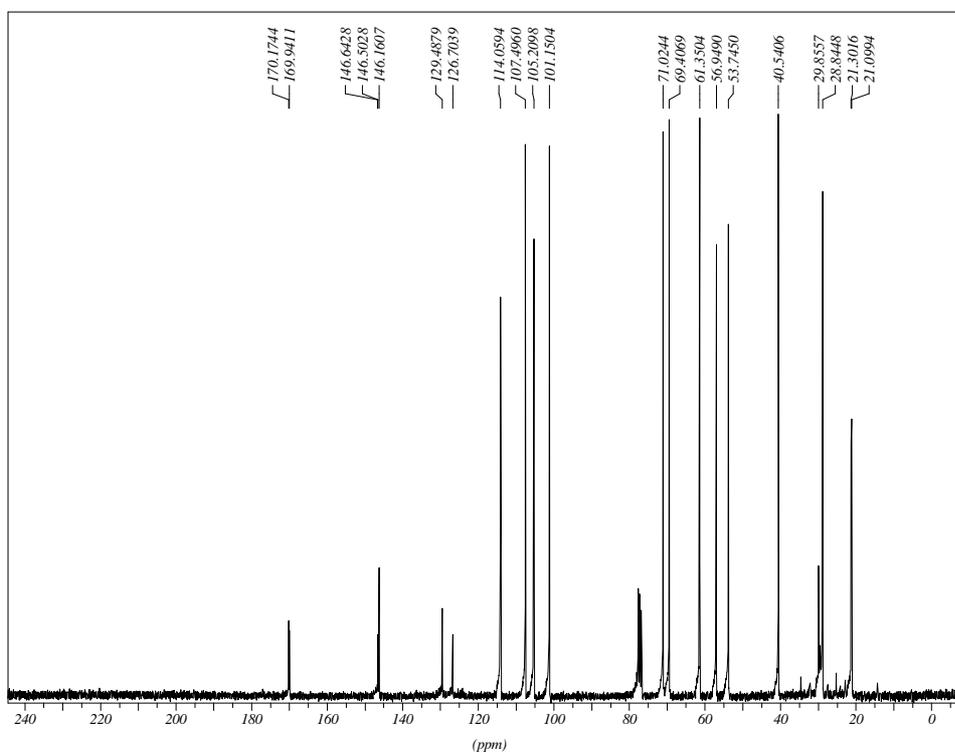
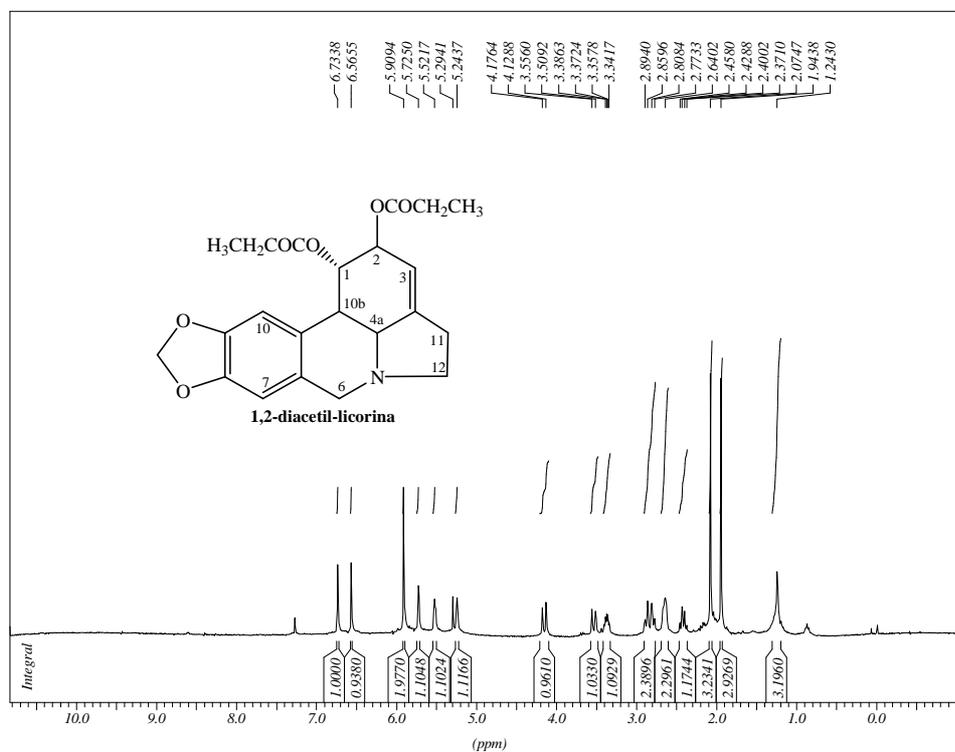
ZIMMERMANN, H. Extracellular purine metabolism. *Drug Development Research*, v. 39, p. 337-352, 1996.

ZIMMERMANN, H. Nucleotide signalling in nervous system development. *European Journal for Physiology*, v. 452, p. 573-588, 2006.

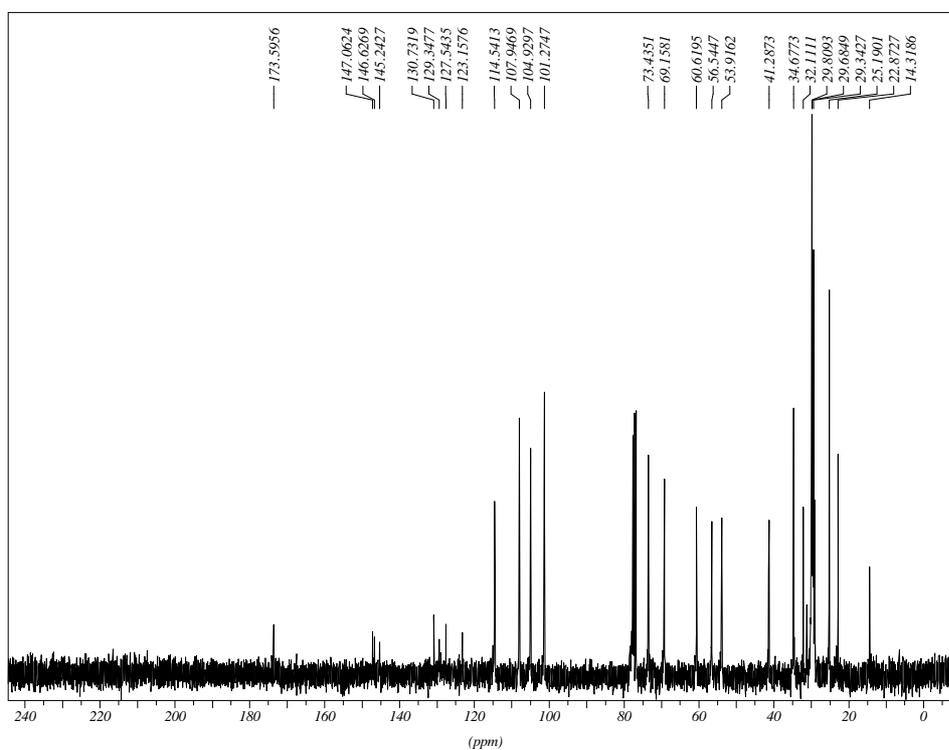
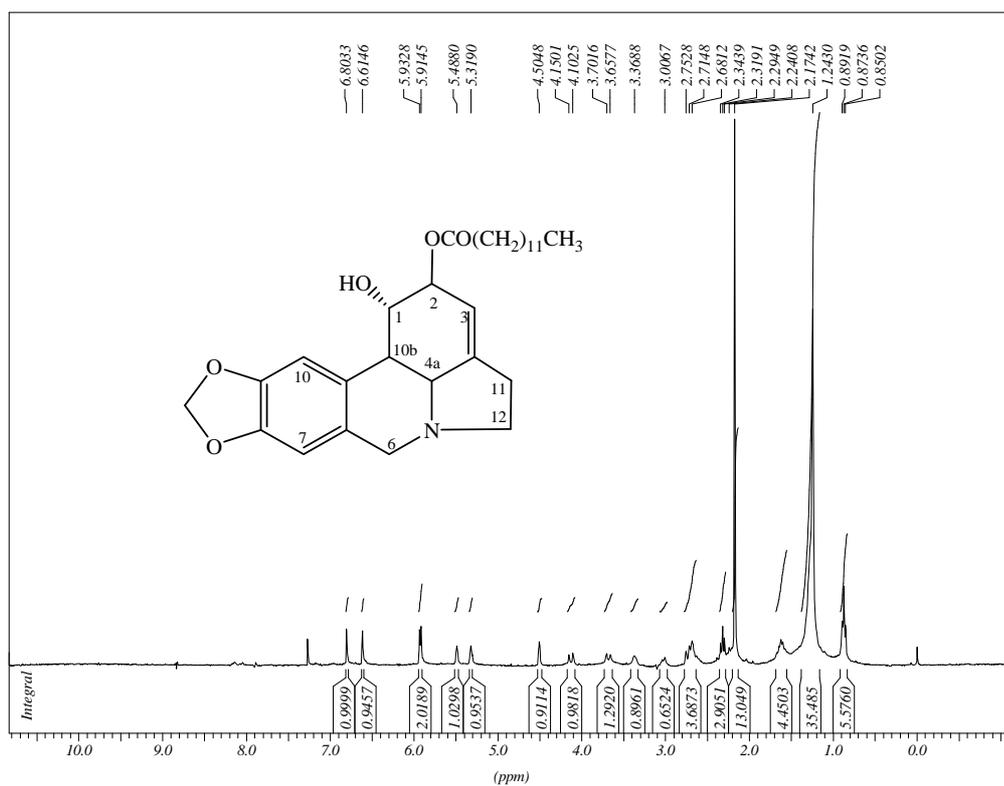
Anexo I – ^1H RMN e ^{13}C RMN representativo dos derivados de diaminas
(Composto (2) referente ao CAPÍTULO VI).



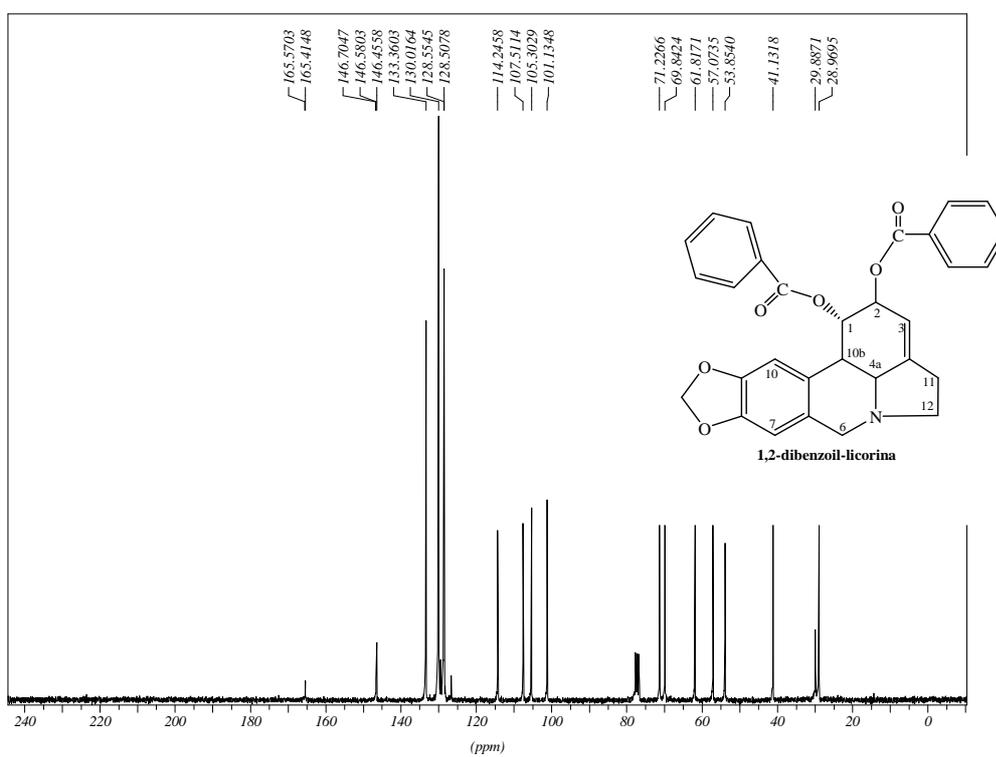
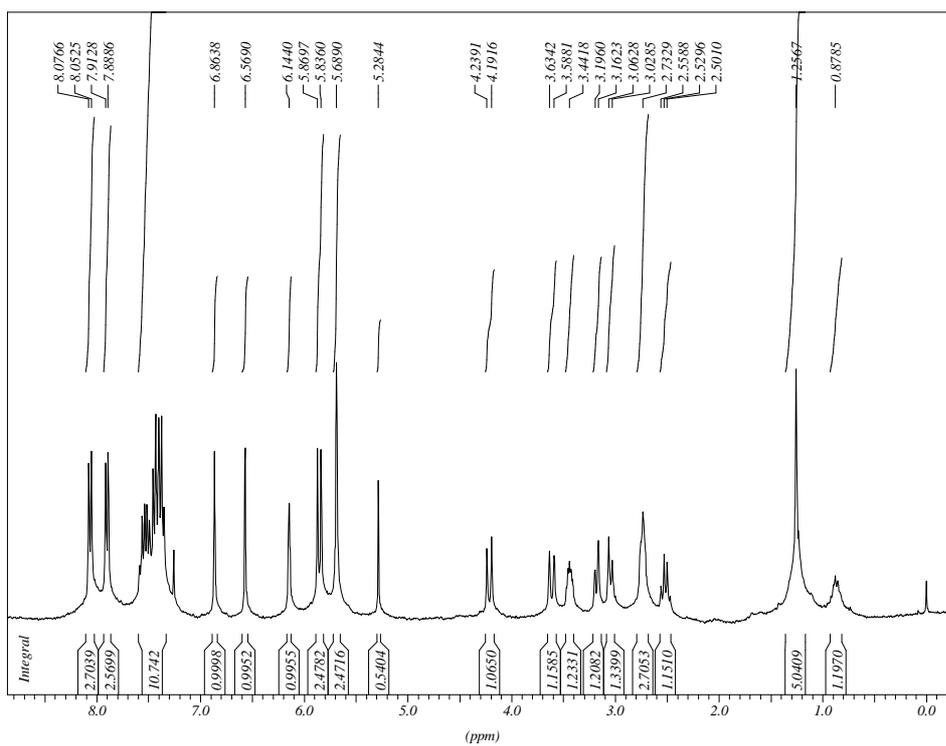
Anexo II – ¹H RMN e ¹³C RMN dos derivados da licorina (referente ao CAPÍTULO VII).



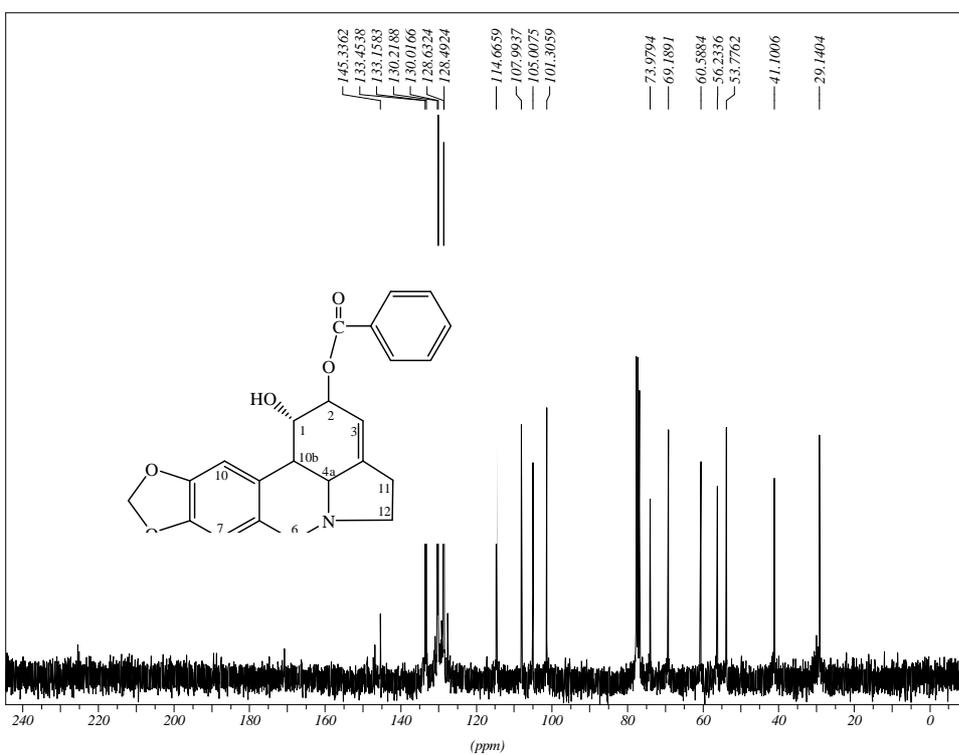
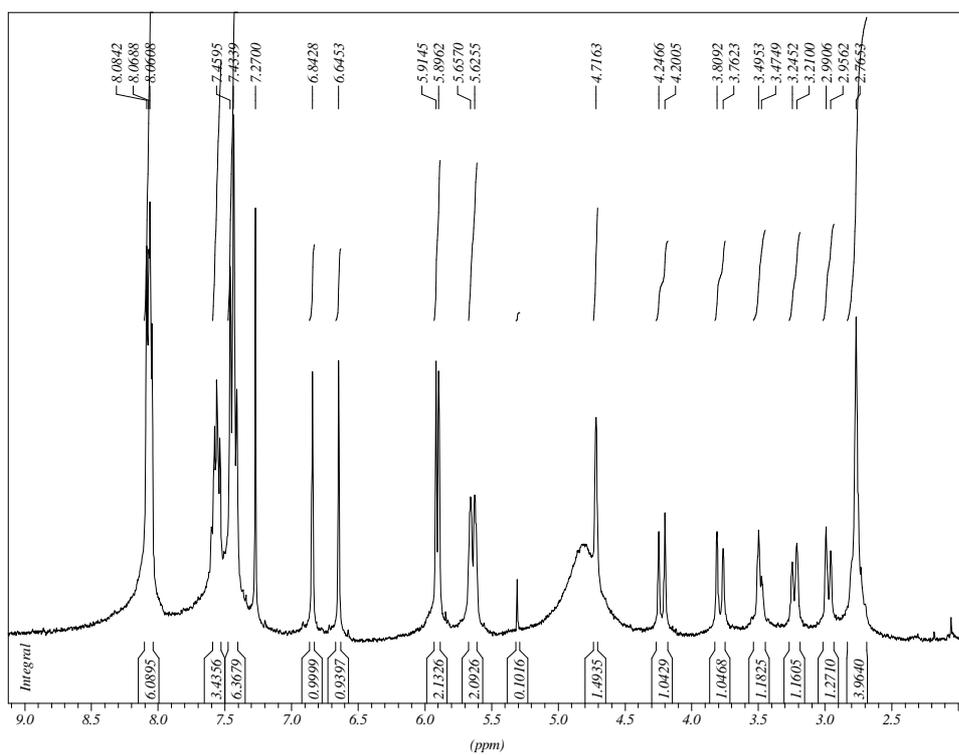
1,2-diacetil-licorina



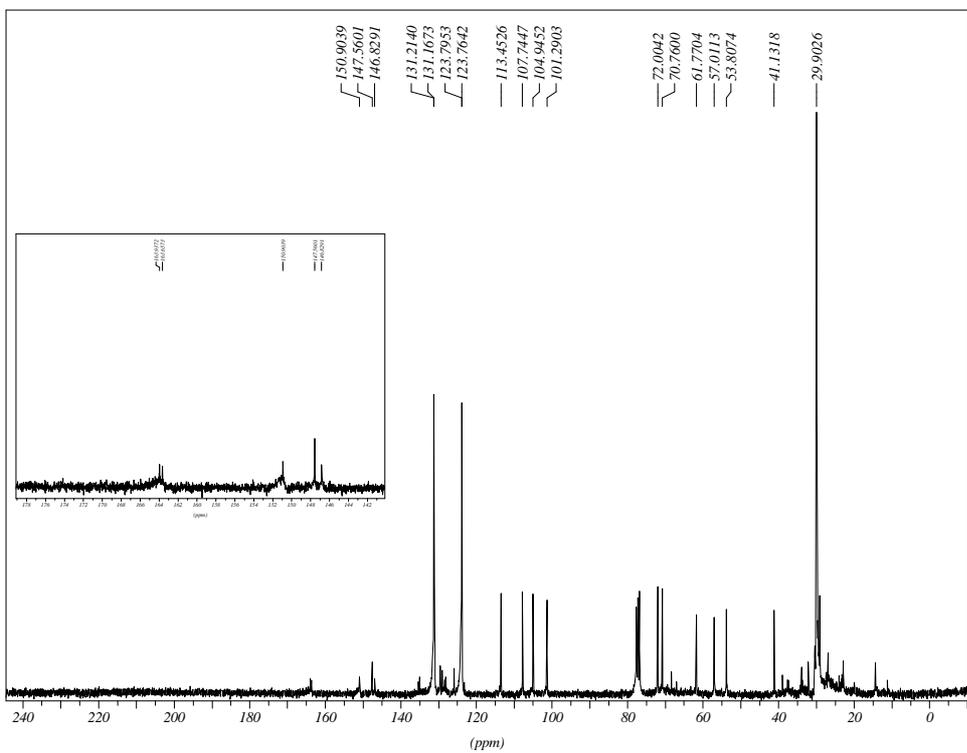
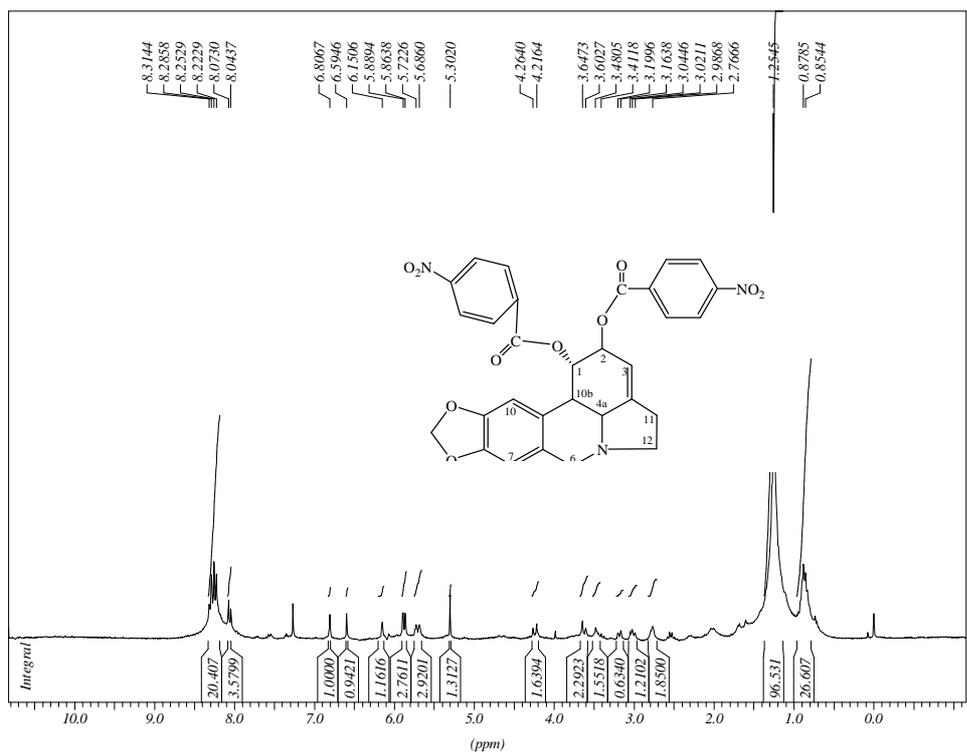
2-mono-éster C12 licorina



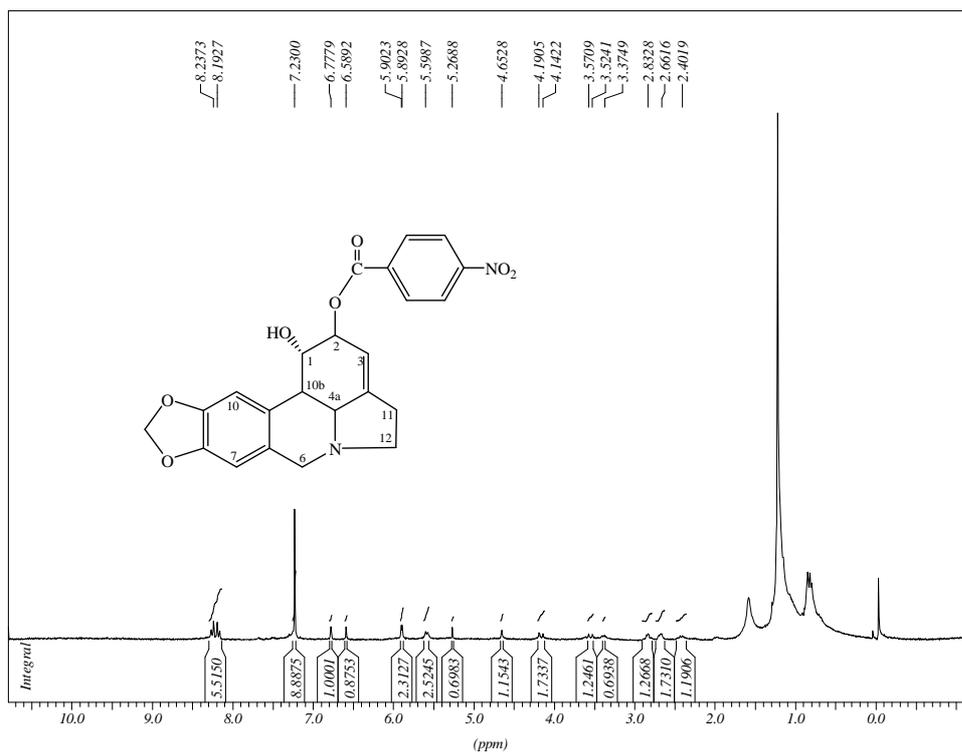
1,2-dibenzoil-licorina



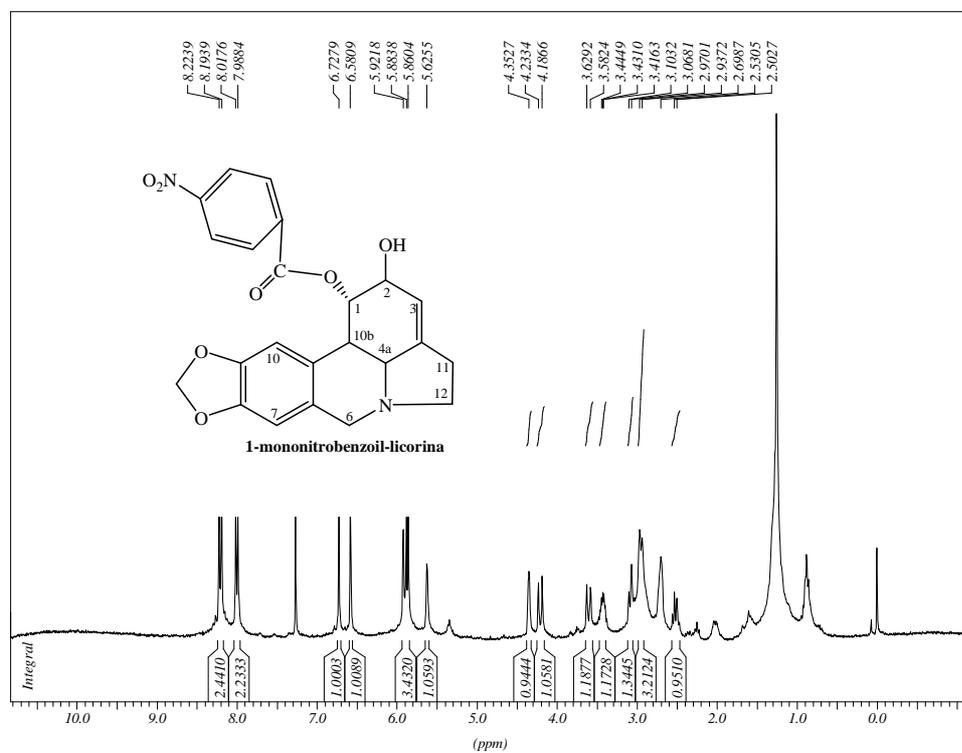
2-monoibenzoyl-licorina



1,2-dinitrobenzoil-licorina



2-mononitrobenzoil-licorina



1-mononitrobenzoil-licorina

ANEXO III - Artigos publicados durante o período de doutorado

1. TRETER, J.; PEIXOTO, M. P. G.; GIORDANI, R. B.; HOLZ, C. L.; ROHE, P. M.; TASCA, T.; ORTEGA, G. G. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Ilex paraguariensis* (Mate) fruits. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 2010 (no prelo).
2. BRANDELLI, C. L. C.; GIORDANI, R. B.; DE CARLI, G. A.; TASCA, T. Indigenous traditional medicine: in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitology Research*, v. 104, p. 1345-1349, 2009.
3. DUARTE, M.; GIORDANI, R. B.; DE CARLI, G. A.; ZUANAZZI, J. A.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. A quantitative resazurin assay to determinate the viability of *Trichomonas vaginalis* and the cytotoxicity of organic solvents and surfactant agents. *Experimental Parasitology*, v. 123, p. 195, 2009.
4. DUARTE, M.; GIORDANI, R. B.; DE CARLI, G. A.; ZUANAZZI, J. A.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Cytotoxicity of solubilization vehicles for *Trichomonas gallinae* and *Tritrichomonas foetus* measured by the resazurin microtiter assay. *Veterinary Parasitology*, v. 166, p. 167-170, 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)