

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Investigação “in vitro” do potencial giardicida de quatro análogos
do metronidazol**

Haendel Gonçalves Nogueira Oliveira Busatti

Belo Horizonte - MG.

2006

Haendel Gonçalves Nogueira Oliveira Busatti

Investigação “in vitro” do potencial giardicida de quatro análogos do metronidazol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de mestre em Parasitologia

Orientadora: Prof. Dra. Maria Aparecida Gomes

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo José Alves

Belo Horizonte - MG.
2006

Trabalho realizado no Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio financeiro de: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Ao meu pai, Beethoven Oliveira Busatti, minha
mãe, Kátia Gonçalves N. Oliveira, meus irmãos
Jonathan e Beethoven Jr. e minha irmã Morgana,
pelo companheirismo, carinho e amor.**

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade concedida, pela confiança, pela formação e aprendizado, e por facilitar a realização deste trabalho.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais, professora Maria A. Gomes, professor Edward Félix Silva, João C. Viana, Edna Pires, Michele Freitas, Sílvio Dolabella, Elisa Vianna, pelo apoio, pela amizade e pelos momentos de incentivo;

Em especial a minha orientadora Maria Aparecida Gomes por seu valioso apoio, confiança e oportunidade a mim concedida, pela orientação, ensinamentos, amizade e por tornar possível a realização deste trabalho;

Ao professor Ricardo José Alves pelo apoio, amizade, ensinamentos e pela valiosa co-orientação;

Aos amigos João C. Viana e Edna Pires pelos incentivos, dedicação, apoios constantes e por serem fundamentais na realização deste trabalho;

Aos amigos Michele Freitas, Elisa Vianna e Sílvio S. Dolabella pelo apoio e alegre convivência;

Aos colegas de mestrado pela companhia, apoio e amizade;

Aos colegas e funcionários do Departamento de Parasitologia ICB/UFMG pelo apoio e incentivos diários;

Ao Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia/UFMG, Laboratório de Química Farmacêutica;

A Sumara pelo apoio, disponibilidade e boa vontade;

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida;

Ao Prof. Ivan pela consultoria prestada;

Várias pessoas são importantes na minha vida, avós, tios (as) e primos (as) que me proporcionam alegrias e incentivos;

A uma pessoa em especial que mesmo de longe, me incentivou e proporcionou alegrias em minha vida, minha namorada Caroline Franco. agradeço pelo carinho, amor e amizade;

Ao apoio, carinho e amor que sempre recebi de meus pais e irmãos, amigos que enchem minha vida de energia e incentivos;

E finalmente a Deus;

A todos muito obrigado!

RESUMO

A *Giardia lamblia* é um protozoário intestinal humano de ampla distribuição mundial. A giardíase é responsável por diarreia, síndrome de má absorção e perda de peso, depauperando física e mentalmente crianças de países subdesenvolvidos. É ainda, principal causa de diarreia em países desenvolvidos. Em 1962, o metronidazol passou a ser utilizado no tratamento da giardíase, por apresentar excelente eficácia e baixa toxicidade. Contudo, tem sido observado que isolados de *G. lamblia*, provenientes de pacientes de diferentes regiões do mundo, apresentam diferenças na sensibilidade ao metronidazol “in vitro”. Há ainda, relatos de pacientes refratários ao tratamento.

Desta forma, a pesquisa de análogos do metronidazol mais efetivos contra o parasita torna-se uma opção importante para o controle desta parasitose.

O presente trabalho tem por objetivo investigar o potencial giardicida de quatro análogos nitroimidazóis, X-etil-2-metil-5-nitroimidazol (X = OMs, MTZMs, X = Br, MTZBr, X = N₃, MTZN₃, X = I, MTZI), sintetizados a partir do metronidazol. A eficácia dos compostos foi avaliada “in vitro”, utilizando a amostra Portland de *G. lamblia*, através da DE₅₀ (dose efetiva que inibe em 50% o crescimento dos trofozoítos) e da CIM (concentração necessária para inibir ao máximo o crescimento dos trofozoítos). O metronidazol foi utilizado como controle de eficácia. A eficácia do metronidazol, foi avaliada inicialmente por dois métodos quantitativos: contagem dos trofozoítos em câmara de Neubauer e por colorimetria.

Considerando a sensibilidade e precisão do método, a técnica colorimétrica apresentou resultados mais precisos quando comparado com a contagem de trofozoítos em câmara de Neubauer.

Trofozoítos de *G. lamblia*, em fase logarítmica de crescimento, foram distribuídos em placas de cultura de células de 24 poços para associação com os derivados nitroimidazóis, em condições anaeróbicas a 37°C. O metronidazol e seus derivados foram associados aos trofozoítos em concentrações crescentes buscando determinar a DE₅₀ e CIM.

O metronidazol apresentou DE₅₀ = 1,96 ± 0,13 µM e CIM = 34,10 ± 1,95 µM. Todos os análogos testados apresentaram elevado potencial giardicida quando comparados ao metronidazol.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - DEFINIÇÃO

A *Giardia lamblia* (sinônimos *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*) é um protozoário flagelado que pode ser encontrado infectando o intestino delgado do homem, causando a doença conhecida como giardíase (Gardner e Hill, 2001).

Durante muitos anos não se deu importância à presença do protozoário *G. lamblia* em seres humanos, pois sua patogenicidade era discutível. Somente nas últimas décadas a infecção por *Giardia* começou a despertar interesse, pela frequência com que era relatada e pela sua importância no desencadeamento de quadros de diarreia e má absorção. A sintomatologia da giardíase é extremamente variável, muitos indivíduos apresentam a forma assintomática, outros diarreia aguda ou ainda a diarreia crônica, que pode durar vários meses, determinando síndrome de má absorção e perda de peso (Meyer e Radulescu, 1979; Ungar et al., 1984; Goldin et al., 1990). O impacto clínico parece ser maior durante os três primeiros anos de vida e em indivíduos subnutridos ou imunodeficientes (Farthing, 1989). Frequentemente a *G. lamblia* tem sido apontada como causa de distúrbio de crescimento entre as crianças (Goldin et al., 1990), sendo a presença e a frequência da diarreia, duração da infecção e oportunidade de reinfecção fatores essenciais no depauperamento físico e mental dessas crianças (Thompson et al., 1993).

1.2 - IMPORTÂNCIA

Giardia lamblia, o mais freqüente dos flagelados parasitas do intestino do homem, tem ampla distribuição mundial, sendo encontrado tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos, incluindo o Reino Unido, Estados Unidos da América, Canadá e Austrália, a *G. lamblia* é o parasita intestinal mais comumente identificado, alcançando taxas de prevalência entre 2-7% (Wolfe, 1975; Acha e Szyfres, 1987; Thompson et al., 1990; Schantz, 1991). É a causa mais freqüente de surtos epidêmicos de diarreia, relatados nos Estados Unidos (Ungar et al., 1984). Nos países em desenvolvimento a giardíase mostra prevalência de 20-60% em algumas áreas (Ungar et al., 1984; Farthing, 1989; Goldin et al., 1990). A maior prevalência da giardíase ocorre em crianças de oito meses a dez anos de idade. No Brasil, sua prevalência varia conforme a localidade, as populações estudadas e a metodologia empregada no estudo. A faixa etária mais atingida é a de pré-escolares e escolares, constituindo-se, nessa população, um sério problema de saúde pública. Estudos da ocorrência da *G. lamblia* em crianças de várias regiões do Brasil mostraram prevalência variando de 13,8% a 63,3% (Costa et al., 1988; Torres et al., 1991; Cury et al., 1994; Guimarães e Sogayar, 1995).

A transmissão da *G. lamblia* ocorre, predominantemente, através da ingestão de água ou alimentos contaminados com os cistos do parasito. O cisto é altamente infectante para o homem, sendo que infecções experimentais, em voluntários humanos, já foram obtidas com apenas 10 cistos. Estes cistos podem permanecer viáveis no ambiente por até três meses em condições favoráveis de temperatura e umidade. Dois aspectos são importantes no contexto epidemiológico da doença: a resistência dos cistos no meio ambiente

e a quantidade de cistos eliminados pelos pacientes. Sendo a giardíase uma zoonose, outros animais contribuem ainda, para a contaminação do ambiente. A transmissão indireta através da água tem sido relatada como a forma mais comum de disseminação do parasita.

As epidemias, em países desenvolvidos, têm sido atribuídas ao tratamento inadequado da água, à sua contaminação com fezes humanas ou de animais, especialmente em coleções de águas superficiais e lagos. A transmissão direta de pessoa a pessoa constitui outro mecanismo de infecção, particularmente importante em instituições coletivas, como creches e orfanatos, entre membros da mesma família e entre homossexuais masculinos (Ungar et al., 1984). Nestas populações, a giardíase atinge níveis epidêmicos.

Uma característica das infecções por *G. lamblia* é a acentuada variabilidade na sintomatologia. Fatores relacionados com o parasita e/ou hospedeiro, provavelmente determinam o curso da infecção. Entre estes se incluem a imunidade e o estado nutricional do hospedeiro, infecções concomitantes, heterogeneidade na infectividade e a virulência e patogenicidade das cepas (Thompson et al., 1993).

1.3 - HISTÓRICO

A *Giardia* foi inicialmente descrita em 1681, por Van Leeuwenhoek, a partir de fezes humanas diarréicas, e melhor descrita por Lambl em 1859. Inicialmente a denominação *Cercomonas intestinalis*, em humanos, e *Dimorphus muris* em roedores. Em 1888, Blanchard sugeriu o nome *Lamblia intestinalis*, em homenagem a Lambl, que foi modificado para *Giardia duodenalis* em 1902, por Stiles. Subseqüentemente, Kofoid e Christiansen propuseram os nomes

Giardia lamblia, em 1915, e *Giardia entérica* em 1920, respectivamente. A controvérsia a respeito da nomenclatura das espécies de *Giardia* continuou por muitos anos, até que Simon usou critérios morfológicos para distinguir *G. lamblia* e *G. muris* sendo *G. lamblia* considerada a espécie que parasita o homem, e *G. muris* a de roedores. O nome *G. intestinalis* foi utilizado por outros pesquisadores posteriormente mas, o uso de *G. lamblia* não foi abandonado. Em 1952, Felice publicou a descrição morfológica detalhada da *Giardia* e finalmente propôs três espécies com base na morfologia do corpo celular, *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. agilis* (Adam, 2001). Durante a década de 90 alguns pesquisadores adotaram o nome *G. intestinalis* (Kulda e Nohýnková, 1996) mas, atualmente a denominação *G. lamblia* continua sendo bem aceita pela literatura científica (Adam, 2001).

1.4 - METABOLISMO DE *Giardia lamblia*

Ao contrário de outros eucariotos, que primariamente metabolizam carboidratos aerobicamente, *Trichomonas spp.*, *Entamoeba spp.* e *Giardia spp.* são organismos caracterizados pela ausência de mitocôndrias e de fosforilação oxidativa mediada por citocromos. O metabolismo desses protozoários é fermentativo (mesmo na presença de O₂), com a glicólise e a geração de ATP (adenosina trifosfato) dependendo apenas do nível de fosforilação do substrato. A conversão do piruvato a acetil-coenzima A é catalisada por uma enzima, piruvato ferredoxina oxireductase (Townson et al., 1996), que utiliza a ferredoxina e NAD⁺ (nicotidamina adenina dinucleotídeo) como acceptor de elétrons, em substituição ao complexo piruvato desidrogenase (presente nos organismos aeróbicos). O complexo enzimático piruvato:ferredoxina

orireductase (PFOR) e a proteína ferredoxina são primordiais para a produção de energia em microorganismos anaeróbicos. A glicose não é totalmente oxidada formando acetato, alanina, etanol e CO₂. O balanço final dos produtos é dependente da tensão de O₂ e da concentração de glicose no meio (Adam, 2001). Em condições estritamente anaeróbicas, alanina é o principal produto do metabolismo de carboidrato (Edwards et al., 1989; Paget et al., 1990; Paget et al., 1993). Porém, na adição de uma quantidade mínima de O₂ (concentrações abaixo de 0,25 µM), a produção de etanol é estimulada e a produção de alanina é inibida (Paget et al., 1993). Aumentando-se a concentração de O₂, tanto a produção de alanina quanto a produção de etanol serão inibidas. Para concentrações de O₂ acima de 0,46 µM, a produção de alanina é completamente inibida, sendo acetato e CO₂ os produtos predominantes do metabolismo energético. No ambiente intestinal a concentração de oxigênio varia entre 0 e 60 µM. Estes valores são relevantes pois, os trofozoítos de *G. lamblia* necessitam de concentração de oxigênio para replicarem (Adam, 2001).

Além dos carboidratos, os aminoácidos são importantes componentes no metabolismo energético da *G. lamblia*. O uso de aspartato, alanina e arginina de meios extracelulares, bem como o metabolismo glicose-independente, comprovam a importância dos aminoácidos na produção de energia desse parasito (Schofield et al., 1990; Mendis et al., 1992).

Muitos protozoários patogênicos, incluindo *G. lamblia*, dependem do armazenamento de purina e pirimidina, principalmente por não possuírem vias de síntese para essas bases nitrogenadas. Além disso, a síntese de DNA (ácido desoxiribonucléico) nestes organismos, depende de desoxinucleotídeos

exógenos, já que trofozoítos de *G. lamblia* são deficientes na enzima ribonucleotídeo redutase (Baum et al., 1989).

Thompson et al. (1990) revisaram publicações de vários autores que reportaram variações genéticas entre as amostras de *Giardia* isoladas do homem. Acredita-se que tais diferenças possam influenciar de forma significativa a epidemiologia e o controle da giardíase, especialmente quanto a suscetibilidade do hospedeiro, a virulência, a sensibilidade a drogas, a antigenicidade e o desenvolvimento “in vivo” e “in vitro” (Thompson et al., 1993). Embora tenham sido obtidos avanços no isolamento e caracterização de amostras de *Giardia*, poucos são os estudos no que concerne a quimioterapia deste parasito que infecta cerca de 1 bilhão de pessoas por ano (Wright et al., 2003).

1.5 - TRATAMENTO

A giardíase humana é tratada quase que exclusivamente com os nitroimidazóis. Estes compostos têm grande uso clínico por causa de sua alta seletividade para anaeróbios e baixa toxicidade para aeróbios. Na classe dos nitroimidazóis, utilizados como quimioterápicos para o tratamento da infecção por *G. lamblia*, inclui-se o metronidazol, tinidazol, ornidazol, e secnidazol. O 2-nitroimidazol foi descoberto em 1953 e selecionado pela sua eficiência terapêutica no tratamento de infecções causadas por protozoários e bactérias anaeróbias (Maeda et al., 1953; Gardner e Hill, 2001).

Em 1957, um laboratório farmacêutico francês do grupo Rhône-Poulence, sintetizou o fármaco 1-(β -hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (metronidazol) pela manipulação da estrutura química da azomicina (2-nitroimidazol) (Maeda et al.,

1953), e este se mostrou um agente altamente efetivo contra infecção por *Trichomonas vaginalis* (Cosar e Julou, 1959). Em 1960 na França, foi lançado o medicamento de marca Flagyl, cujo princípio ativo é o metronidazol.

Em 1962, Darbon et al. reportaram que o metronidazol poderia ser utilizado para o tratamento da giardíase. O FDA (The U.S. Food and Drug Administration) impediu a introdução do metronidazol nos Estados Unidos até 1963, por considerar a droga potencialmente tóxica.

Foi demonstrado efeito mutagênico do metronidazol para bactérias e carcinogênico para ratos em doses altas de aplicação e por longo período. Entretanto, jamais foi demonstrada mutagenicidade em humanos, sugerindo que seu uso é seguro. Assim, desde sua descoberta, o metronidazol e outros nitroimidazóis são utilizados pelos clínicos para o tratamento da infecção por *G. lamblia*. Hoje o metronidazol é a droga mais utilizada no tratamento da giardíase em todo o mundo, inclusive nos USA (Gardner e Hill, 2001).

O Metronidazol é rápida e completamente absorvido após a administração oral, penetra nos tecidos e secreções corporais, sendo metabolizado, principalmente, no fígado e excretado na urina (Lau et al., 1992; Tracy et al., 1996).

Metronidazol é um agente microbicida de amplo espectro com atividade contra bactérias anaeróbicas e protozoários. O passo inicial para ativação da droga é a transferência de elétrons para o grupo nitro. O piruvato e a ferredoxina parecem ser a principal fonte de elétrons para esta reação. Em anaerobiose, a descarboxilação do piruvato pela enzima piruvato:ferredoxina oxiredutase (PFOR) está acoplada à redução da ferredoxina, a qual, por sua vez é capaz de ativar o metronidazol, no meio intracelular, gerando radical nitro tóxico pela

redução do grupo nitro (Townson et al., 1994; Edwards, 1993). O metronidazol reduzido, aceitor terminal de elétrons, liga-se covalentemente à molécula de DNA, promovendo a perda da estrutura helicoidal e desestabilização molecular do DNA, com subsequente morte do trofozoíto. A ativação do metronidazol pelo processo de redução gera ainda a liberação de radicais tóxicos que reagem com componentes celulares essenciais, interferindo no metabolismo celular (Edwards, 1993). Organismos com via metabólica ligada a ferredoxina podem reduzir o grupo nitro e organismos onde esta via é ausente ou pouco usada são ineficientes para ativar o metronidazol.

Ferredoxinas são proteínas transportadoras de elétrons de baixo peso molecular presentes em plantas, animais, fungos, protistas e procariotos. Possuem baixo potencial de redução mas, suficiente para reduzir o metronidazol à sua forma citotóxica (Bruschi et al., 1988; Matsubara et al., 1992).

Para o tratamento da giardíase encontram-se disponíveis além dos nitroimidazólicos, os benzimidazólicos e nitrofuranos, que nem sempre são efetivos contra os parasitos (Gardner e Hiil, 2001).

Na classe dos benzimidazóis o albendazol é uma alternativa atrativa por sua eficiência como anti-helmíntico. A susceptibilidade da *Giardia*, aos benzimidazóis, “in vitro” é limitada quando comparada com a ação dos nitroimidazóis. No entanto tem sido demonstrado que os benzimidazóis têm ainda, considerável efeito sobre os trofozoítos (Farbey et al., 1995; Morgan et al., 1993; Reynoldson et al., 1992; Reynoldson et al., 1991). Contudo, é facilmente obtida resistência in vitro ao albendazol (Lindquist, 1996).

Em países subdesenvolvidos onde precárias condições de engenharia e educação sanitária, além do poliparasitismo, levam a constância do uso de medicamentos, muitas vezes até para fins profiláticos, o albendazol ocupa local de destaque na dispensação em drogarias. Este particular faz com que ocorra um aumento nos casos de resistência, tornado esta droga uma opção pouco promissora para o tratamento da giardíase.

A furazolidona é uma droga pertencente à classe dos nitrofuranos, descoberta em 1940 (Kucers et al., 1997). Em 1950 passou a ser utilizada no tratamento da giardíase. Contudo, seu uso foi desestimulado pelo relato de casos clínicos refratários ao tratamento e aos efeitos colaterais aliados a sua menor eficácia, comparada ao metronidazol (Levi et al., 1977).

O metronidazol é o principal fármaco usado no tratamento da giardíase. Entretanto, isolados de *Giardia* provenientes de humanos de diversas regiões do mundo, apresentam diferenças na sensibilidade a esse fármaco. Foi observado ainda, número significativo de pacientes refratários ao tratamento com esta droga (Gardner e Hiil, 2001).

O mecanismo de resistência não está definitivamente esclarecido, sendo algumas hipóteses mais aceitas, como, a redução da atividade da PFOR que levaria a diminuição da eletrotransferência para ferredoxina (Liu et al., 2000). A diminuição da síntese de ferredoxina ou haloferedoxina a partir da apoferredoxina também pode levar a ineficiência da ativação do metronidazol (Beinert et al., 1997). Desta forma, o baixo nível de ferredoxina associado com a diminuição da atividade da PFOR está relacionado com a redução da habilidade da *G. lamblia* em ativar o metronidazol (Liu et al., 2000).

Finalizando, a *Giardia* parece adquirir resistência medicamentosa com muita facilidade, sendo substancial o número de casos refratários ao tratamento com as diferentes drogas disponíveis. A resistência acentua os efeitos mórbidos da doença que atinge, principalmente, as camadas menos favorecidas das populações, na sua maioria localizadas em países como o nosso. Esta peculiaridade sinaliza a importância da pesquisa de novos fármacos para o tratamento desta parasitose, já que a medida política de melhoria das condições sanitárias e educacionais pode ser muito demorada.

1.6 - JUSTIFICATIVA

Em países onde doenças diarréicas, como a giardíase, são causa de mortalidade e principalmente morbidade, o saneamento básico deveria constituir prioridade em saúde pública. Nestes países a giardíase deve ser analisada com especial cuidado. A doença crônica causa síndrome de má absorção intestinal, que em crianças desnutridas contribui, de forma substancial, para a geração de adultos com deficiência física e mental. Enquanto não são melhoradas as condições de saneamento básico, a pesquisa de novos fármacos mais ativos contra *G. lamblia* constitui área prioritária.

O metronidazol é hoje a droga mais usada no mundo, e mais efetiva contra *G. lamblia*. A relativa facilidade de manipulação das cadeias ligadas ao anel imidazólico torna a pesquisa de análogos do metronidazol um campo atrativo e promissor.

Recentemente, derivados do metronidazol sintetizados no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, apresentaram atividade significativa contra cepas de *Helicobacter pylori* resistentes ao metronidazol (Alves, R. J., comunicação pessoal). É importante avaliar a ação destes derivados contra amostra de *Giardia lamblia* considerando a severidade dos efeitos do parasitismo, principalmente, na população infantil de países pobres, bem como pelos aspectos da resistência de algumas amostras ao metronidazol. Por outro lado, é relevante que sejam realizados testes biológicos para as substâncias químicas sintetizadas no país pela importância para a indústria farmacêutica nacional.

2. OBJETIVO

2.1 - OBJETIVO GERAL:

- Investigar, através de teste “in vitro”, o potencial giardicida de quatro análogos nitroimidazóis: X-etil-2-metil-5-nitroimidazol, onde [X = OMs, MTZMs (1), X = Br, MTZBr (2), X = N₃, MTZN₃ (3), X= I, MTZI (4)], sintetizados a partir do metronidazol.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Propor um teste “in vitro” para investigar o potencial giardicida de novas substâncias.
- Determinar a dose efetiva (DE₅₀) que inibe 50% do crescimento e a concentração inibitória mínima (CIM) do metronidazol, para a amostra Portland de *G. lamblia*.
- Avaliar o potencial giardicida dos nitroimidazóis 1, 2 ,3 e 4, para a amostra Portland.
- Determinar a DE₅₀ e CIM para o(s) composto(s) que tenha revelado ação giardicida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - AMOSTRA DE *G. lamblia*

Foi utilizada a amostra Portland (ATCC 30888), adquirida da American Type Culture Collection. Esta amostra é originária do Estados Unidos da América (Oregon, Portland), foi isolada em 1976 por Meyer, de uma paciente de 36 anos de idade sintomática, com história de diarreia por vários anos. Desde então vem sendo mantida em cultivo axênico.

3.2 - MEIO DE CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO

Os trofozoítos foram cultivados em tubos de vidro contendo meio TYI-S-33, segundo Diamond et al. (1968), modificado por Keister (1983), e incubados em estufa a 37⁰ C.

Repiques, três vezes por semana, garantiram a utilização de parasitos sempre em fase exponencial de crescimento. Anteriormente aos experimentos, os trofozoítos foram transferidos para tubos de vidro ou tubos tipo eppendorf de 1,5 mL ou placas de cultivo de células de 24 poços (Nunc[®] e Sarsted[®]) para avaliação do rendimento das culturas neste ambiente, antes da associação com as substâncias químicas.

Foram utilizados materiais e equipamentos do Laboratório de Amebíase e Protozoários intestinais do Departamento de Parasitologia do ICB – UFMG.

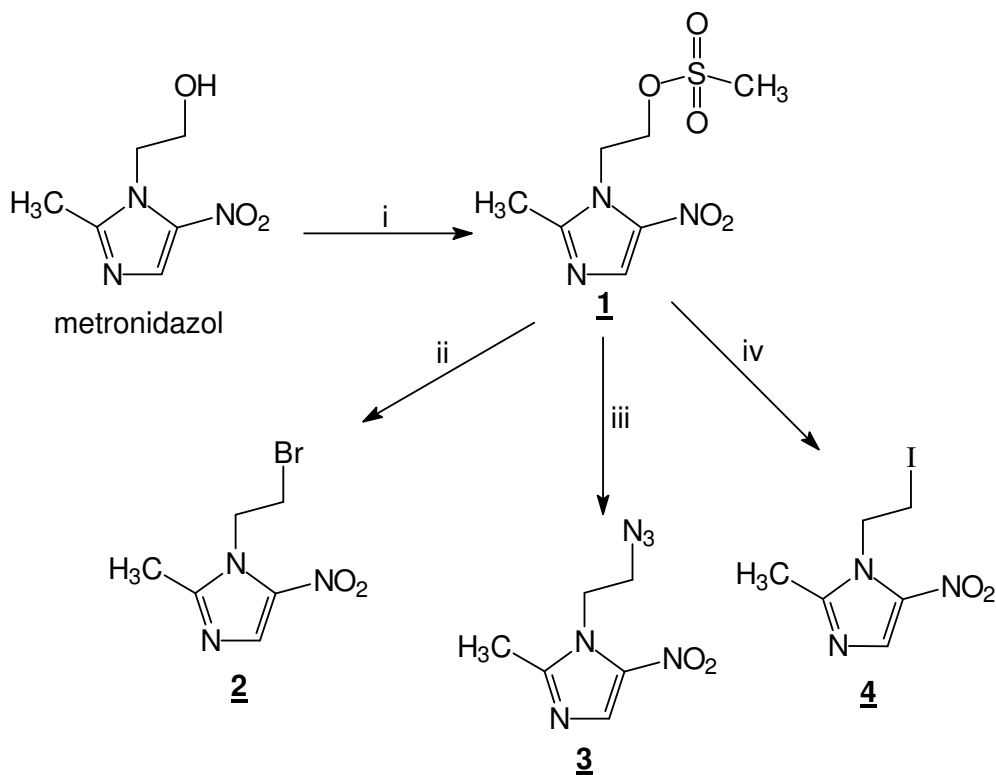
3.3 - SÍNTESE DOS NITROIMIDAZÓIS

A síntese dos derivados do metronidazol foi realizada pelo Dr. Ricardo José Alves do Departamento de Produtos Farmacêuticos, Laboratório de Química

Farmacêutica - Faculdade de Farmácia, a partir do produto metronidazol (Sigma). A matéria-prima de partida, foi submetida a modificações químicas em sua estrutura, para obtenção dos derivados nitroimidazóis, como descuti a seguir:

Inicialmente o metronidazol é convertido no seu derivado O-mesilado **1** (MTZMs) por reação com cloreto de metanossulfonila em piridina anidra. Este é convertido nos derivados **2** (MTZBr), **3** (MTZN₃) e **4** (MTZI) por reação com brometo de potássio, azida de sódio e iodeto de potássio, respectivamente, em dimetilformamida (DMF), com aquecimento a 60°C. A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada de sílica. A pureza dos compostos foi avaliada pela determinação de sua faixa de fusão e pela comparação com amostras puras dos produtos por cromatografia em camada delgada de sílica.

O esquema abaixo representa a síntese dos análogos do metronidazol.



i-CH₃SO₂Cl, piridina, t.a.; ii- KBr, DMF, 60 °C; iii- NaN₃, DMF, 60 °C; iv- KI, DMF, 60 °C.

O quadro 1, a seguir, mostra a massa molecular do metronidazol e de seus análogos.

Substância	Massa molecular (g/mol)
Metronidazol	171,13
MTZMs	249,25
MTZBr	234,05
MTZN ₃	196,17
MTZI	281,05

Todos os derivados sintetizados foram utilizados nos testes de ensaio de inibição.

3.4 - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DO METRONIDAZOL E DE SEUS ANÁLOGOS

Os nitroimidazóis (5 a 40 mg) foram dissolvidos diretamente em 1 mL dimetilsulfóxido (DMSO) e as soluções obtidas variaram entre 5 mg/mL e 40 mg/mL. Alíquotas de 100 µL das soluções foram diluídas em 10 mL ou 20 mL de meio TYI-S-33, para se obter concentrações finais variando entre 0,05 mg/mL e 0,4 mg/mL.

As soluções foram filtradas em uma membrana esterilizante de nitrocelulose de 0,2 µm e alíquotas, em volumes crescentes de 1 a 120 µL, foram adicionadas aos poços das placas de cultivo contendo os trofozoítos em culturas axênicas, para se obter concentrações finais variando de 0,086 a 50 µM.

3.5 - DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE *Giardia lamblia*

Para avaliar a sensibilidade e precisão na quantificação da eficácia das substâncias testadas, foram utilizados dois métodos, contagem de trofozoítos em câmara de Neubauer e o colorimétrico. Para esta avaliação foram realizados testes preliminares utilizando apenas o metronidazol.

Na determinação da DE₅₀ e da CIM o metronidazol foi associado aos trofozoítos em concentrações crescentes.

3.5.1 - QUANTIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO UTILIZANDO CÂMARA DE NEUBAEUR

Para o ensaio de inibição, 5 a 5,5 x 10⁵ trofozoítos de *G. lamblia*, em fase logarítmica de crescimento, foram distribuídos em tubos de vidro (10 x 100mm) contendo meio de cultura TYI-S-33 para um volume final de 6,0 mL. O crescimento dos parasitos foi avaliado pela observação em microscópio invertido e quantificado pela contagem em câmara de Neubauer, utilizando a técnica de contagem de leucócitos adaptada. A inibição do crescimento dos trofozoítos foi expressa em porcentagem.

O metronidazol, em solução estéril, na concentração de 0,4 mg/mL, foi associado ao meio de cultura para se obter concentrações finais variando de 0,78 a 50 µM, os tubos foram incubados em estufa a 37°C, por 24 horas.

Após 24 horas da associação do metronidazol aos trofozoítos, os parasitos foram observados em microscópio invertido. Então, cada tubo de cultura foi colocado em banho de gelo por 20 minutos, para os trofozoítos se desprenderem da superfície do tubo. Após homogeneização dos parasitos no

meio de cultura foram retirados 25 μ L da suspensão de trofozoítos, e transferidos para tubos “ependorfs” contendo 50 μ L de solução de eosina 0,125% e uma gota de solução de formol a 10%, efetuando uma nova homogeneização. Com o auxílio de uma pipeta foi colocada uma alíquota sob os retículos da câmara de Neubauer, tendo o cuidado de evitar excesso de líquido e bolhas de ar. A câmara foi levada ao microscópio, focalizada no aumento de 100X e realizado a contagem dos parasitos.

3.5.1.1 - CÁLCULO DO NÚMERO DE TROFOZOÍTOS POR MILILITRO DE SUSPENSÃO

Para o cálculo do número de trofozoítos por mililitro de suspensão foi empregada a seguinte equação:

$$Z = Fc \times Fd \times Y$$

Sendo:

Z = número de trofozoítos por mililitro (mL) de suspensão.

Fc = fator de correção da câmara de Neubauer.

Fd = fator de diluição.

Y = número de trofozoítos contados nos quatro retículos laterais da câmara.

Diluição da suspensão de trofozoítos = 1/3 (Fd = 3).

Fator de correção da câmara de Neubauer = 2500.

Portanto **Z = 2500 x 3 x Y**

Resultado expresso em Z trofozoítos por mL de suspensão (Carvalho e Silva, 1988).

3.5.2 - MÉTODO COLORIMÉTRICO

A ação dos análogos do metronidazol MTZMs, MTZBr, MTZN₃ e MTZI sobre o crescimento dos trofozoítos de *Giardia* foi avaliada “in vitro” e comparada aos controles negativos, isto é, na ausência dos nitroimidazóis, controles positivos, na presença do metronidazol, e ainda, foi avaliado o crescimento na presença de DMSO, o diluente dos derivados testados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes.

Inicialmente foi realizado um teste tipo ‘screening’, de todos os derivados nitroimidazóis para se determinar àqueles que possuíam algum efeito sobre a viabilidade e/ou vitalidade dos trofozoítos de *G. lamblia*. A viabilidade foi determinada qualitativamente observando-se a motilidade e aderência dos trofozoítos em microscópio invertido e a vitalidade foi avaliada pelo método colorimétrico, de acordo com Gomes et al. (1995), com modificações. Os derivados nitroimidazóis eleitos foram associados aos trofozoítos em concentrações crescentes buscando determinar a DE₅₀ e CIM.

A inibição do crescimento dos trofozoítos foi expressa em porcentagem.

Para o ensaio de inibição, 4 a 4,5 x 10⁵ trofozoítos de *G. lamblia*, em fase logarítmica de crescimento, foram distribuídos em placas de cultura de células de 24 poços (Nunc[®] e Sarsted[®]) contendo meio para um volume final de 2,5 mL. O crescimento das culturas foi avaliado pela observação em microscópio invertido e quantificado pelo método colorimétrico, princípio da densidade ótica.

O metronidazol, seus análogos e DMSO foram associados a cada poço e as placas foram incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de CO₂ a 5%, por 24 horas.

Após, os trofozoítos não aderidos foram retirados com o auxílio de uma pipeta de vidro, cada poço foi lavado, cuidadosamente, duas vezes com salina tamponada pH 7,2. Em seguida, os trofozoítos aderidos à placa foram fixados com metanol PA por 15 minutos. Após nova lavagem com salina tamponada pH 7,2, para retirar o excesso de metanol, as células foram coradas com azul de metileno 0,1% em tampão borato 0,1M pH 8,7, por 10 minutos. O excesso de corante foi removido por meio de lavagens sucessivas dos poços com solução de tampão borato 0,01 M pH 8,7, e o corante incorporado pelos trofozoítos foi extraído pela adição de 500 µL de solução de ácido clorídrico 0,1M em cada orifício, por 10 minutos.

Alíquotas de 100 µl, de cada poço, foram então transferidas para placa de Elisa de 96 poços e levadas ao leitor de Elisa (BIO-RAD Model 3550 Microplate Reader). A leitura foi realizada com filtro de 655 nm.

3.6 - CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de inibição} = [1 - (A_{655} \text{ teste} \div A_{655} \text{ controle negativo})] \times 100$$

Sendo:

A_{655} = absorvância em filtro de 655 nm.

A_{655} controle negativo = absorvância do controle negativo.

A_{655} teste = absorvância referente à ação do nitroimidazol.

Foram empregados cálculos de média, variância e desvio padrão (Magalhães e Lima, 2001), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{Varobs} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - X_{\text{obs}})^2$$

Sendo:

Varobs = variância observada, referente à variável X de um conjunto de dados.

n = número total de um conjunto de dados.

X_i = variável x de um conjunto de dados.

X_{obs} = média observada de um conjunto de dados.

$$\text{dp}_{\text{obs}} = \text{Varobs}^{1/2}, \text{ raiz quadrada da variância observada}$$

Sendo:

dp_{obs} = desvio padrão observado.

Varobs = variância observada, referente à variável X de um conjunto de dados.

Para o processamento dos dados e montagem das curvas de inibição do crescimento foi utilizado o programa ORIGIN 7.0.

Foi feita uma análise de variância (ANOVA) para se comparar às porcentagens de inibição em relação aos níveis de concentrações das substâncias, utilizando o programa STATISTICA 5.1.

As curvas da porcentagem de inibição do crescimento versus concentração em μM seguem um modelo não linear, em exponencial, representado pela equação $y = a - b \cdot c^x$, onde y é o valor da porcentagem de inibição pertencente ao eixo y, a é assíndota (porcentagem máxima de inibição), b é uma constante (porcentagem total a ser controlada), c é a taxa de eficiência e x a variável a ser obtida (concentração).

A CIM é a menor concentração da substância química capaz de inibir ao máximo o crescimento da cultura. A CIM é calculada através da equação $y = a - b \cdot c^x$ onde x será o valor em μM que representa a porcentagem máxima (y) de inibição de crescimento provocada pela substância.

4 - RESULTADOS

Foram testados diferentes ambientes para a obtenção dos trofozoítos de *G. lamblia* em meio de cultura que possibilitasse células com melhor viabilidade e vitalidade, necessários para a avaliação da ação dos nitroimidazóis. De todos os ambientes testados, tubos de vidro, tubos tipo “ependorf” de 1,5 mL e placas de cultura de células de 24 poços (Nunc[®] e Sarsted[®]), as placas de cultivo de células proporcionaram a obtenção das melhores condições para avaliação da viabilidade dos trofozoítos antes da associação com as substâncias.

Avaliamos a melhor forma de quantificar a vitalidade das culturas, associando-as ao metronidazol. Quando comparados, a contagem das células em câmara de Neubauer e o método colorimétrico, na quantificação da ação giardicida, o método colorimétrico se mostrou mais preciso. Por esta razão os resultados foram apresentados baseados na aplicação deste método.

Todas as substâncias testadas, o metronidazol (MTZ) e seus análogos, MTZMs (1), MTZBr (2), MTZN₃ (3) e MTZI (4), mostram atividade parasiticida, afetando diretamente a vitalidade e viabilidade dos trofozoítos, avaliada pela observação da mobilidade e aderência do parasito observado ao microscópio invertido. Ocorreram alterações morfológicas como aumento de tamanho e vacuolização, perda da capacidade aderente à superfície das placas, perda de mobilidade e presença de trofozoítos mortos.

As figuras 1 e 2 mostram as curvas, em porcentagem, da ação inibitória do metronidazol sobre o crescimento dos trofozoítos de *G. lamblia*. A DE₅₀ foi de $1,82 \pm 0,41 \mu\text{M}$ e CIM de $24,64 \pm 4,52 \mu\text{M}$ quando os parasitos foram avaliados pela contagem dos trofozoítos em câmara de Neubauer (fig. 1).

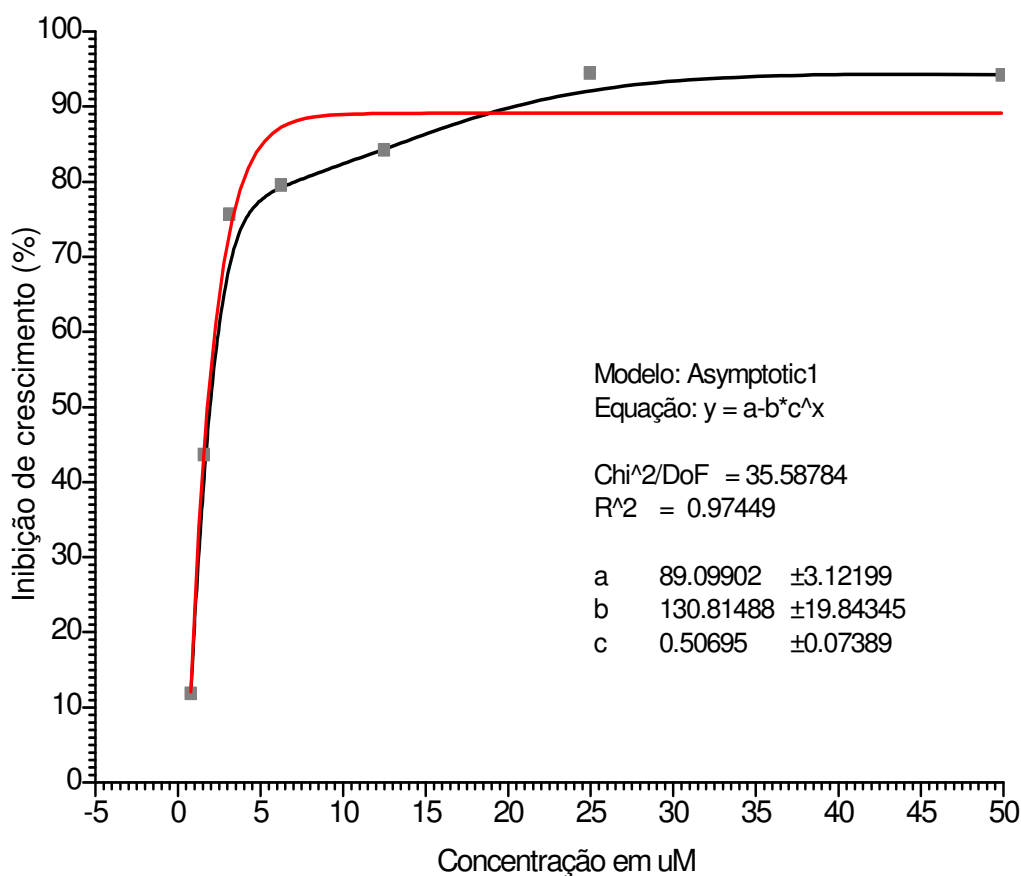


Figura 1 - Curva da porcentagem de inibição do crescimento de *G. lamblia*, amostra Portland, em cultura axênica, após 24 horas de associação com concentrações crescentes do metronidazol, variando de 0,78 a 50 μM , a partir da solução 0,4 mg/mL de metronidazol em meio de cultura.

Na avaliação pelo método colorimétrico, a DE_{50} foi de $1,96 \pm 0,13 \mu\text{M}$ e CIM de $34,10 \pm 1,95 \mu\text{M}$ (fig. 2).

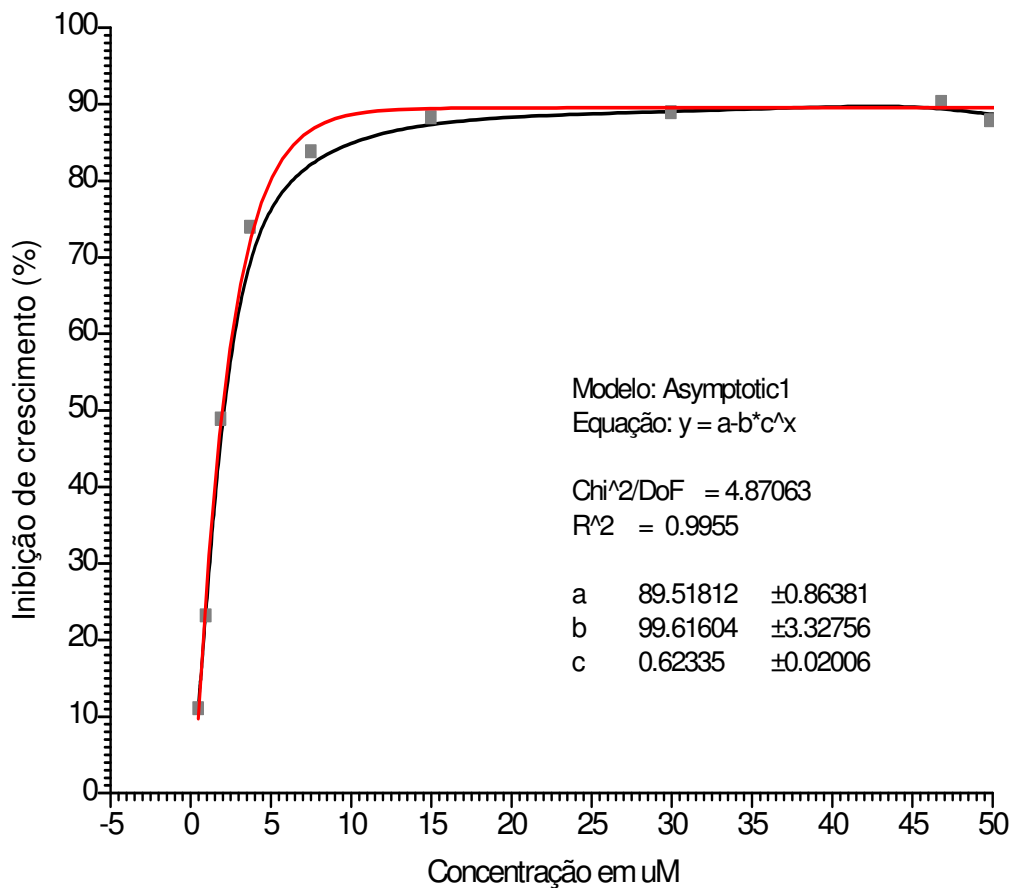


Figura 2 - Curva da porcentagem de inibição do crescimento de *G. lamblia*, amostra Portland, em cultura axênica, após 24 horas de associação com concentrações crescentes do metronidazol, variando de 0,47 a 50 μM , a partir das soluções 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL de metronidazol em meio de cultura.

As figuras 3 e 5 mostram cultivos de *G. lamblia* na ausência dos compostos (controle negativo) e as figuras 4 e 6 mostram ação inibitória do metronidazol sobre o crescimento dos trofozoítos.

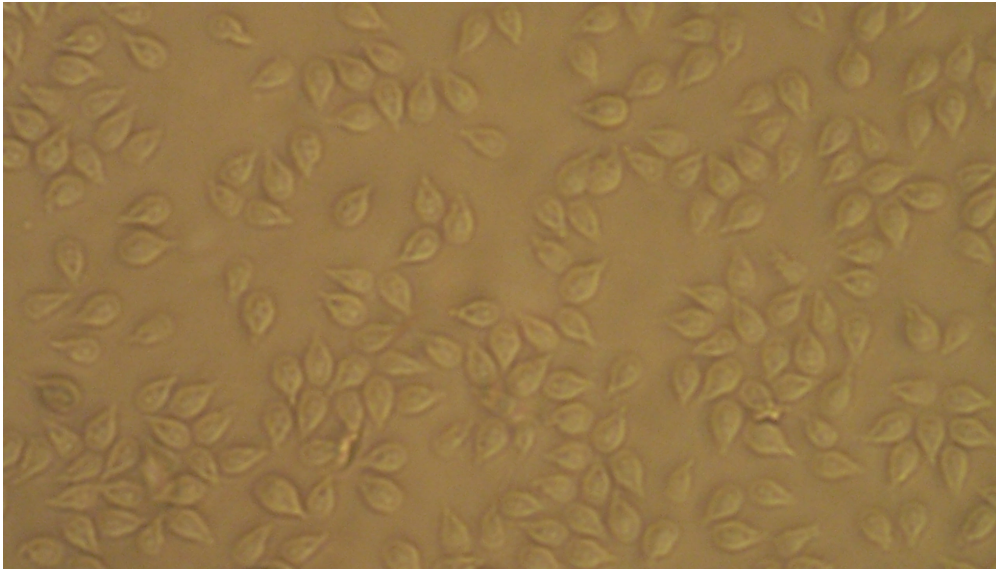


Figura 3 - Trofozoítos de *G. lamblia*, controle negativo, em meio de cultura.200X .

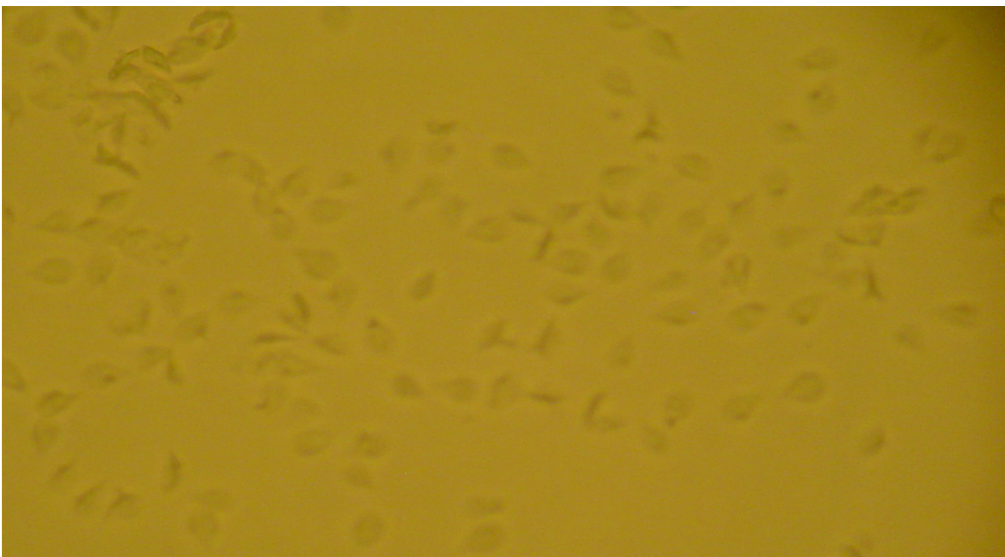


Figura 4 - Trofozoítos de *G. lamblia* em meio de cultura após 24 horas de associação com metronidazol 15 µM.200X.

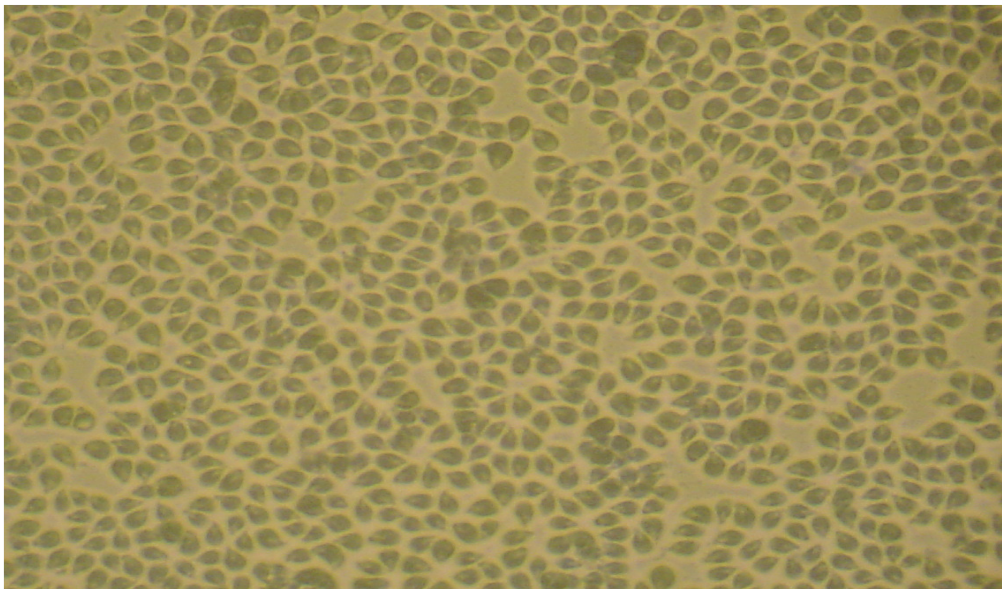


Figura 5 - Trofozoítos de *G. lamblia*, controle negativo, fixados na superfície da placa de cultura e corados com azul de metileno 0,1%. 200X.



Figura 6 - Trofozoítos de *G. lamblia* corados com azul de metileno 0,1%, após 24 horas de associação com metronidazol 15 μ M.200X.

As figuras 7, 8, 9 e 10 mostram, em porcentagem, a ação inibitória dos derivados MTZMs, MTZBr, MTZN₃ e MTZI, respectivamente.

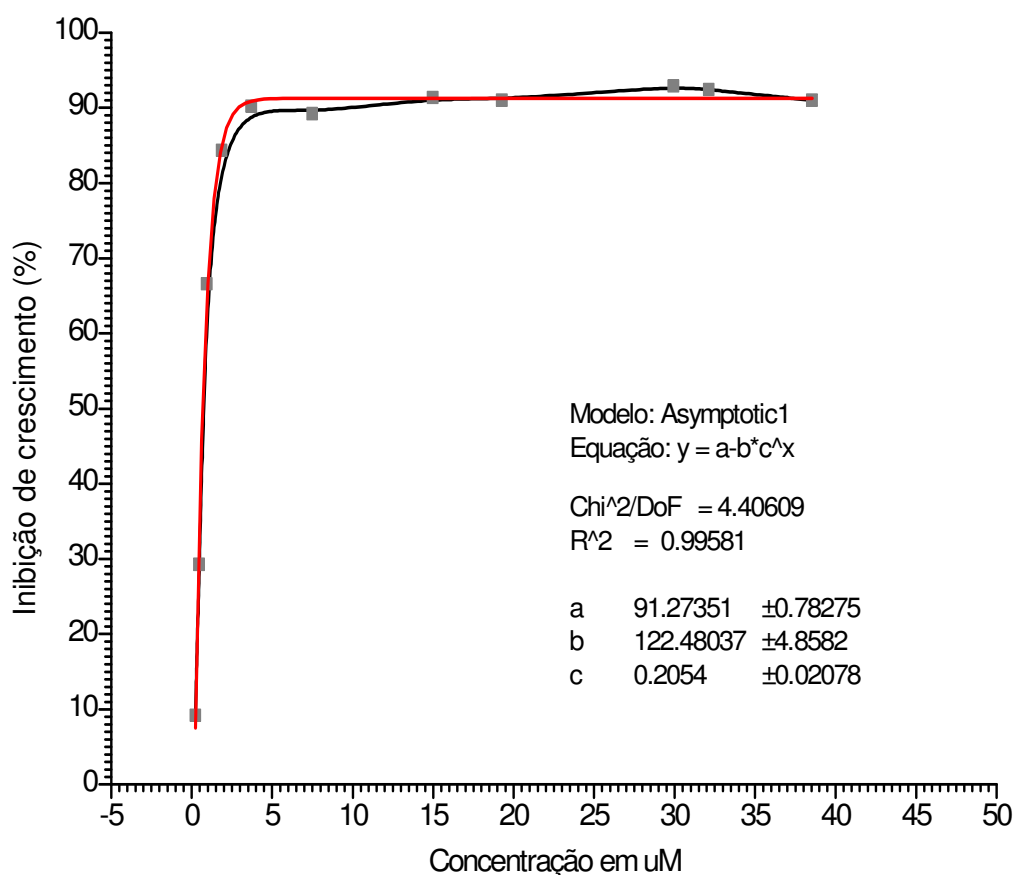


Figura 7 - Curva da porcentagem de inibição do crescimento de *G. lamblia*, amostra Portland, em cultura axênica, após 24 horas de associação com concentrações crescentes do OMs-etil-2-metil-5-nitroimidazol (MTZMs), variando de 0,24 a 38,5 µM, a partir das soluções 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL de MTZMs em meio de cultura.

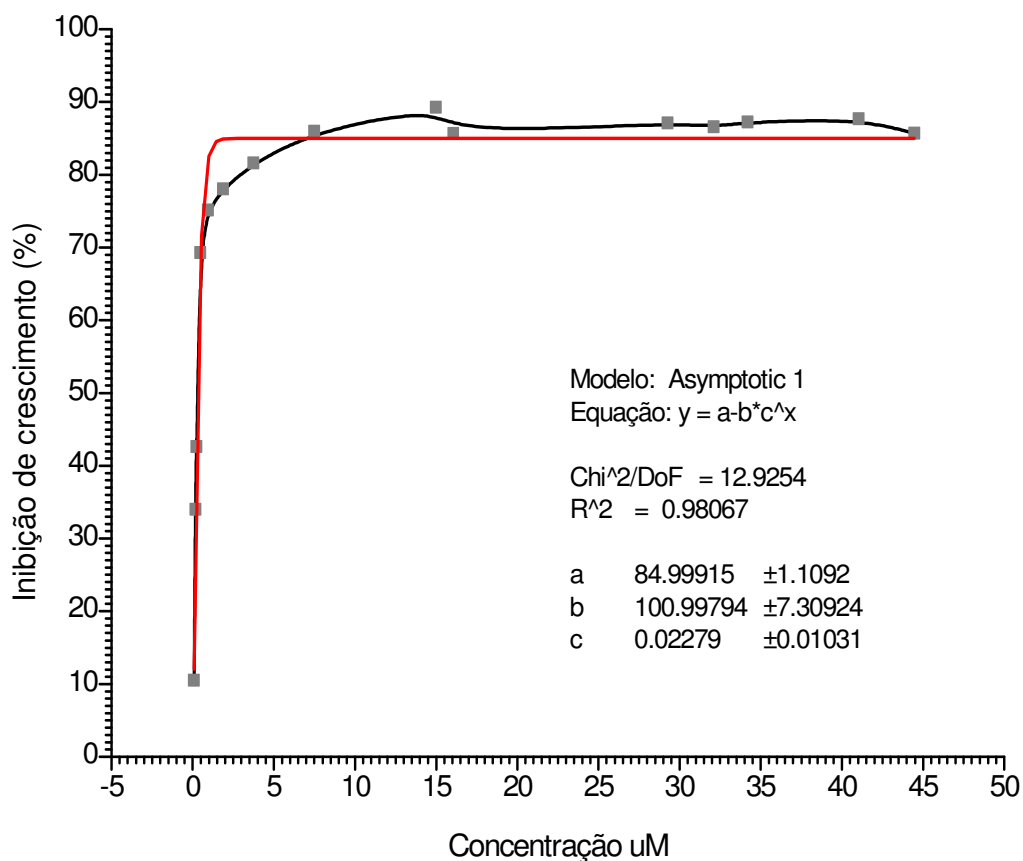


Figura 8 - Curva da porcentagem de inibição do crescimento de *G. lamblia*, amostra Portland, em cultura axênica, após 24 horas de associação com concentrações crescentes do Br-etil-2-metil-5-nitroimidazol (MTZBr), variando de 0,086 a 44,5 μ M, a partir das soluções 0,05mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL de MTZBr em meio de cultura.

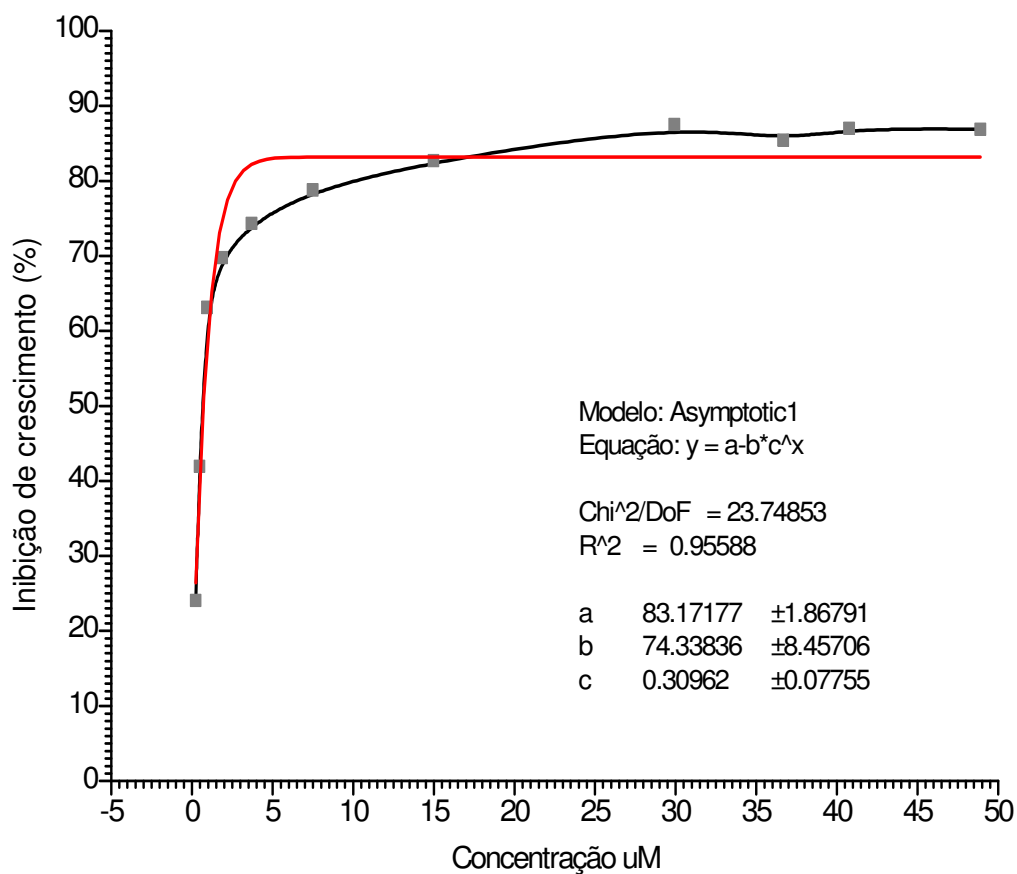


Figura 9 - Curva da porcentagem de inibição do crescimento de *G. lamblia*, amostra Portland, em cultura axênica, após 24 horas de associação com concentrações crescentes do N3-etil-2-metil-5-nitroimidazol (MTZN3), variando de 0,23 a 48,90 μ M, a partir das soluções 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL de MTZN3 em meio de cultura.

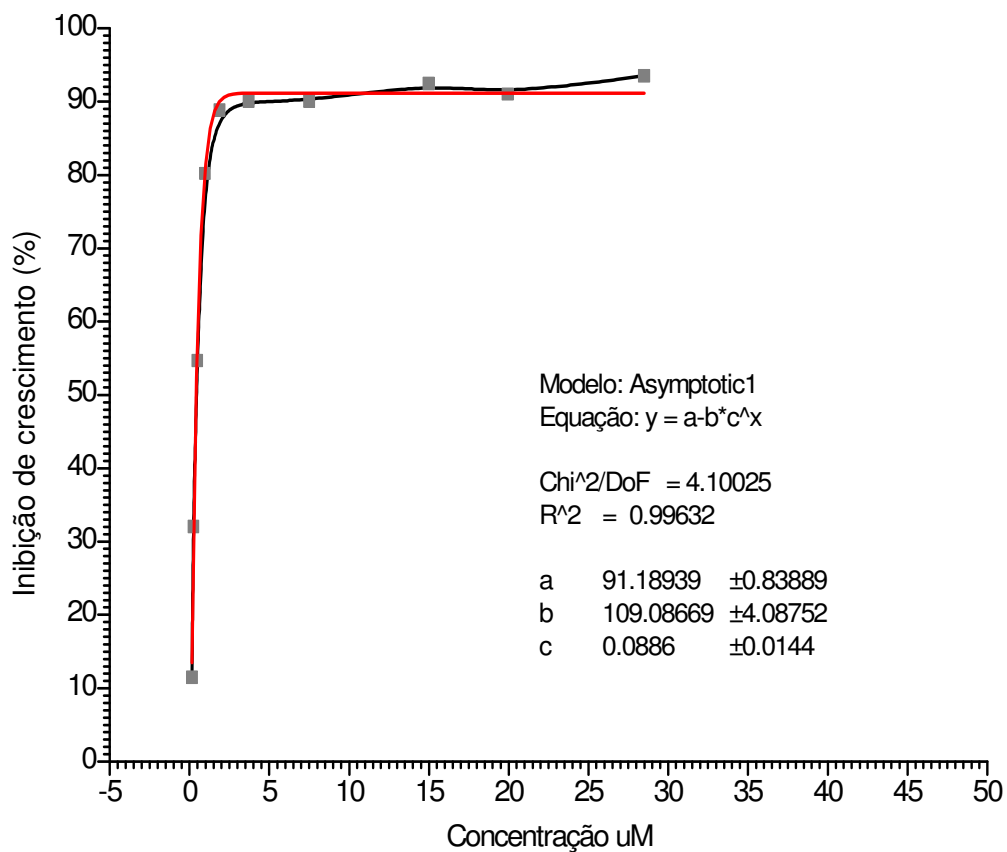


Figura 10 - Curva da porcentagem de inibição do crescimento de *G. lamblia*, em cultura axênica, amostra Portland, após 24 horas de associação com concentrações crescentes do l-etil-2-metil-5-nitroimidazol (MTZI), variando de 0,14 a 28,0 μM , a partir das soluções 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL de MTZI em meio de cultura.

O quadro 2, a seguir, mostra a comparação de DE₅₀ e CIM para cada um dos derivados testados, comparados à ação do metronidazol.

Substância	DE ₅₀ ± DP (µM)	CIM ± DP (µM)
Metronidazol	1,96 ± 0,13	34,10 ± 1,95
MTZMs	0,69 ± 0,05	10,32 ± 0,56
MTZBr	0,28 ± 0,04	4,23 ± 0,45
MTZN ₃	0,70 ± 0,16	13,47 ± 2,43
MTZI	0,40 ± 0,03	6,69 ± 0,38

DE₅₀ – Dose efetiva que inibe em 50 (%) o crescimento da cultura.

CIM – Concentração inibitória mínima.

DP – Desvio padrão.

Os resultados indicam que todos os derivados do metronidazol possuem elevado potencial giardicida quando comparados à ação deste fármaco. A substância MTZBr foi a que apresentou entre todas maior atividade, para um nível de 5% de significância.

O DMSO, utilizado como solvente na solubilização das substâncias, também exerce ação tóxica sobre os trofozoítos de *G. lamblia*. A figura 11 mostra entretanto, que não ocorreu inibição significativa do crescimento dos trofozoítos de *G. Lamblia* pela adição de volumes variando de 25 a 300 µL da solução de DMSO, que indica que o volume de DMSO utilizado na preparação das soluções dos nitroimidazóis não foi capaz de potencializar o efeito tóxico dos nitroimidazóis.

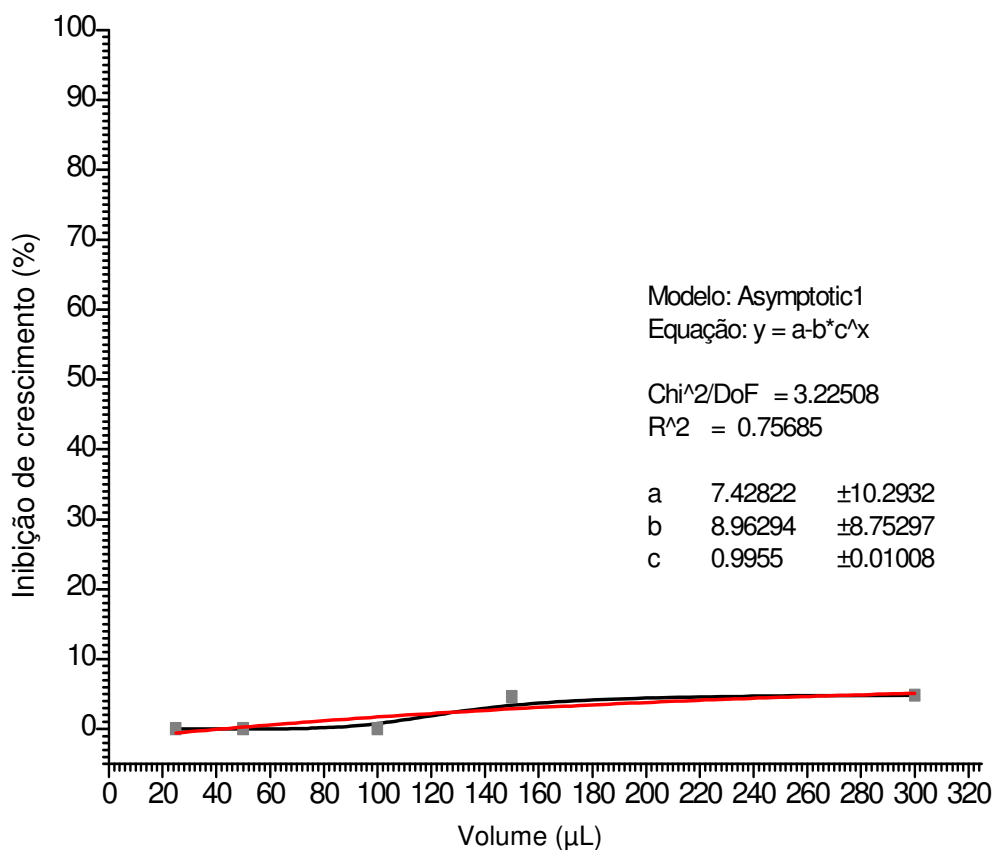


Figura 11 - Curva em porcentagem, da ação inibitória de solução de DMSO sobre o crescimento dos trofozoítos de *G. Lamblia*, amostra Portland, após 24 horas de incubação, com volumes crescentes de 25 a 300 µL.

4.1 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO POR SUBSTÂNCIA

O quadro 3 mostra as estatísticas descritivas das porcentagens médias de inibição do metronidazol e dos derivados por níveis de concentração. Perceba que para as concentrações 0,47, 0,94, 1,87 e 3,71 μM , a porcentagem média de inibição do metronidazol é a menor entre todos os derivados, sendo também que os valores se apresentam mais homogêneos em torno da média.

Note ainda, que dependendo do nível de concentração utilizado a maior porcentagem média de inibição depende da substância (metronidazol, MTZMs, MTZBr, MTZN₃ ou MTZI), ou seja, parece haver uma interação entre porcentagem de inibição da substância e nível de concentração.

Quadro 3: Estatística Descritiva dos Derivados por Níveis de Concentração.

Concentração = 0,47 μM				
<u>Substâncias</u>	<u>Média(%)</u>	<u>DP</u>	<u>CV</u>	<u>Mediana</u>
Metronidazol	11.70	1.78	15.21	11.97
MTZMs	31.18	2.84	9.10	29.90
MTZBr	68.09	5.87	8.61	67.62
MTZN ₃	44.31	5.68	12.82	42.87
MTZI	55.19	1.99	3.61	54.95
Concentração = 0,94 μM				
<u>Substâncias</u>	<u>Média(%)</u>	<u>DP</u>	<u>CV</u>	<u>Mediana</u>
Metronidazol	23.33	1.96	8.39	23.88
MTZMs	65.85	2.67	4.05	65.33
MTZBr	77.31	6.06	7.84	76.48
MTZN ₃	64.47	5.30	8.21	66.07
MTZI	78.49	2.64	3.36	79.73
Concentração = 1,87 μM				
<u>Substâncias</u>	<u>Média(%)</u>	<u>DP</u>	<u>CV</u>	<u>Mediana</u>
Metronidazol	48.56	3.73	7.69	48.29
MTZMs	84.21	2.33	2.76	84.87
MTZBr	78.33	5.53	7.06	80.25
MTZN ₃	71.46	5.74	8.04	73.97
MTZI	87.35	2.81	3.21	88.11

Concentração = 3,71 µM				
<u>Substâncias</u>	<u>Média(%)</u>	<u>DP</u>	<u>CV</u>	<u>Mediana</u>
Metronidazol	73.84	3.92	5.30	74.47
MTZMs	89.00	2.71	3.04	88.53
MTZBr	81.88	3.24	3.96	83.11
MTZN ₃	75.93	8.37	11.02	77.22
MTZI	89.48	2.43	2.71	89.13
Concentração = 7,49 µM				
<u>Substâncias</u>	<u>Média(%)</u>	<u>DP</u>	<u>CV</u>	<u>Mediana</u>
Metronidazol	84.20	1.22	1.44	84.04
MTZMs	89.23	1.08	1.22	88.95
MTZBr	86.41	0.95	1.10	86.39
MTZN ₃	79.45	6.87	8.65	81.10
MTZI	89.85	0.41	0.46	89.83
Concentração = 14,98µM				
<u>Substâncias</u>	<u>Média(%)</u>	<u>DP</u>	<u>CV</u>	<u>Mediana</u>
Metronidazol	87.67	1.02	1.16	87.32
MTZMs	90.62	2.36	2.61	90.31
MTZBr	89.32	1.99	2.22	89.84
MTZN ₃	83.23	4.53	5.44	84.03
MTZI	91.49	0.79	0.87	91.10

Média – média das porcentagens de inibição das substâncias por nível de concentração.

DP – desvio padrão.

CV – coeficiente de variação.

4.2 - COMPARAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO EM RELAÇÃO ÀS SUBSTÂNCIAS E ÀS CONCENTRAÇÕES.

Foi feita uma análise de variância (ANOVA) para se comparar às porcentagens médias de inibição das substâncias em relação aos níveis de concentração e para se comparar às porcentagens médias de inibição das substâncias para o mesmo nível de concentração.

Na tabela 1, são apresentados os resultados dos testes que comparam as porcentagens de inibição das substâncias, as porcentagens de inibição das substâncias para cada nível de concentração e a interação entre porcentagem de inibição das substâncias e os níveis de concentração.

As hipóteses testadas em relação às substâncias foram:

H_0 : Não existe diferença entre as porcentagens médias de inibição das substâncias;

H_1 : Pelo menos uma das substâncias apresenta porcentagens médias de inibição diferentes.

Analisando a Tabela 1, pode-se concluir que existe diferença entre as porcentagens médias de inibição das substâncias, há um nível de significância de 5%, ou seja, pelo menos uma das substâncias apresenta porcentagens de inibição diferentes das demais, pois o p-valor, probabilidade de rejeitar H_0 dado que ele é verdadeiro, é igual a zero.

As hipóteses testadas para as porcentagens de inibição em relação aos níveis de concentração foram as seguintes:

H_0 : Não existe diferença entre as porcentagens médias de inibição das substâncias para cada nível de concentração;

H_1 : Pelo menos um dos níveis de concentração apresenta porcentagens médias de inibição das substâncias diferentes.

Note ainda pela tabela 1, que há diferença entre os valores das porcentagens médias de inibição para cada nível de concentração, para um nível de 5% de significância, isto é, pelo menos um dos níveis de concentração apresenta porcentagens médias de inibição diferentes, rejeitando H_0 .

As hipóteses testadas para a interação entre as porcentagens de inibição das substâncias e os níveis de concentração foram as seguintes:

H₀: Não existe efeito de interação entre as porcentagens médias de inibição das substâncias e os níveis de concentração;

H₁: Existe efeito de interação entre as porcentagens médias de inibição das substâncias e os níveis de concentração;

Para um nível de significância de 5%, há fortes evidências para se rejeitar a hipótese H₀, de que não existe efeito de interação entre as porcentagens médias de inibição das substâncias e os níveis de concentração. Note pela figura 12, por exemplo, que para uma concentração de 0,47 µM a porcentagem média do metronidazol é a menor entre todos os derivados e a do MTZBr é a maior entre todos os derivados, indicando-o como o análogo mais efetivo. Perceba que para as concentrações 0,47, 0,94, 1,87 e 3,71 µM todos os derivados apresentam porcentagens médias de inibição maiores que a do metronidazol. Note ainda, que a medida que a concentração aumenta os valores das porcentagens médias de inibição das substâncias se aproximam.

Tabela 1: Análise de Variância (ANOVA).

Efeito	F	P-valor
Substância	285,83	0,00
Concentração	629,05	0,00
Substância*Concentração	47,42	0,00

F – valor crítico.

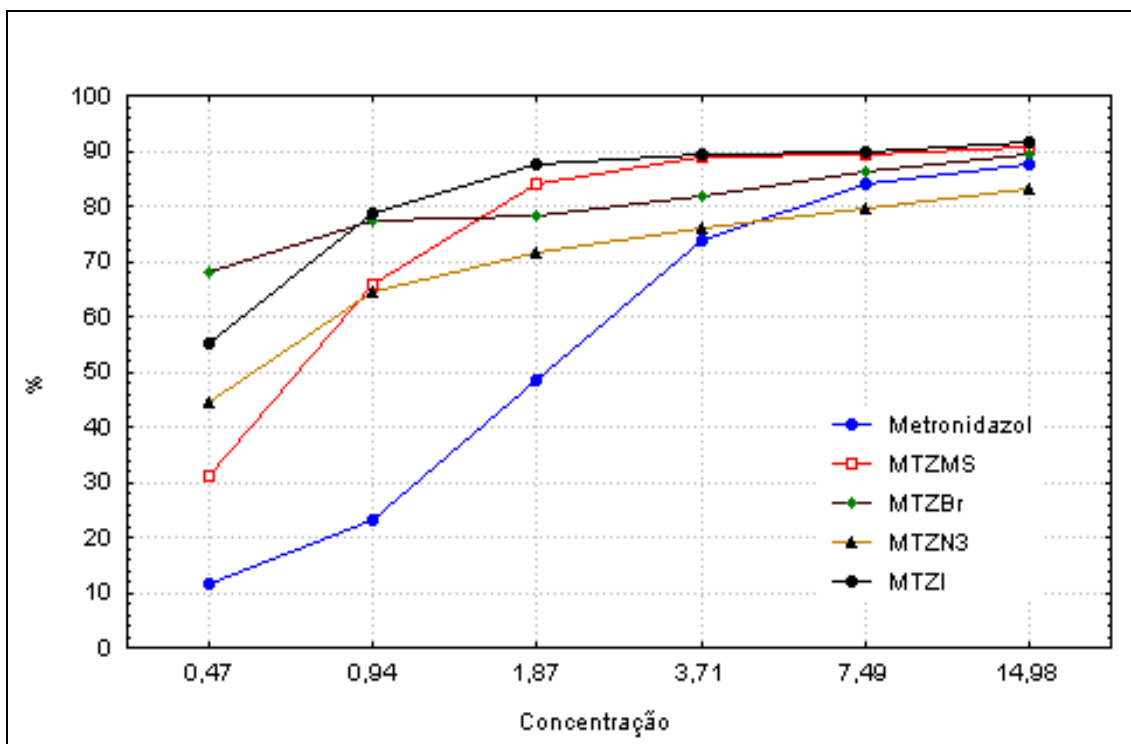


Figura 12 - Gráfico das porcentagens médias de inibição para interação entre substâncias e concentração. Estando contido no eixo X os valores das porcentagens médias de inibição e no eixo Y os valores das concentrações, em μM , dos nitroimidazóis.

4.3 - COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS POR CONCENTRAÇÃO

Nesta seção foram feitas comparações múltiplas para detectar diferenças mínimas significativas entre as porcentagens médias de inibição do metronidazol e dos derivados por valor de concentração. O teste de comparações múltiplas foi feito para um nível de 5% de significância. Para facilitar as comparações múltiplas, no quadro 4, é mostrada a notação utilizada para as combinações das substâncias e das concentrações. Por exemplo, a combinação {1} significa porcentagem média de inibição do metronidazol para a concentração 0,47 μM e assim por diante para as demais combinações.

O quadro 4, a seguir, mostra a notação, utilizada nas comparações múltiplas, para a combinação entre a porcentagem média de inibição da substância e concentração.

Combinação	Concentração (μM)	Substâncias
{1}	0,47	Metronidazol
{2}	0,47	MTZMs
{3}	0,47	MTZBr
{4}	0,47	MTZN ₃
{5}	0,47	MTZI
{6}	0,94	Metronidazol
{7}	0,94	MTZMs
{8}	0,94	MTZBr
{9}	0,94	MTZN ₃
{10}	0,94	MTZI
{11}	1,87	Metronidazol
{12}	1,87	MTZMs
{13}	1,87	MTZBr
{14}	1,87	MTZN ₃
{15}	1,87	MTZI
{16}	3,71	Metronidazol
{17}	3,71	MTZMs
{18}	3,71	MTZBr
{19}	3,71	MTZN ₃
{20}	3,71	MTZI
{21}	7,49	Metronidazol
{22}	7,49	MTZMs
{23}	7,49	MTZBr
{24}	7,49	MTZN ₃
{25}	7,49	MTZI
{26}	14,98	Metronidazol
{27}	14,98	MTZMs
{28}	14,98	MTZBr
{29}	14,98	MTZN ₃
{30}	14,98	MTZI

A tabela 2 mostra as comparações múltiplas entre as substâncias para todos os níveis de concentração. As hipóteses testadas, para a comparação de duas substâncias A e B, foram as seguintes:

H_0 : As porcentagens médias de inibição das substâncias A e B são iguais para determinado nível de concentração;

H_1 : As porcentagens médias de inibição das substâncias A e B são diferentes para determinado nível de concentração.

Analisando a tabela 2, pode-se concluir que existe diferença entre as porcentagens médias de inibição do metronidazol e as porcentagens médias de inibição dos derivados, para um nível de 5% de significância para qualquer nível de concentração, exceto para os derivados MTZN₃ (concentração igual a 3,71 μ M), MTZBr (concentrações iguais a 7,49 μ M e 14,98 μ M) e MTZMs (nível de concentração igual a 14,98 μ M) que têm porcentagens médias de inibição iguais ao do metronidazol, para estas comparações os p-valores foram maiores que 0,05.

Note que entre os derivados MTZMs e MTZN₃, e entre os derivados MTZBr e MTZI não há diferenças entre as porcentagens médias de inibição para o nível de concentração igual a 0,94 μ M, para um nível de significância de 5%.

Note ainda, que para o nível de concentração 7,49 μ M não existe diferença significativa entre as porcentagens médias de inibição dos derivados MTZMs e MTZI, e entre as porcentagens médias de inibição dos derivados MTZBr e MTZI, enquanto que para a concentração de 14,98 μ M, existe diferença estatística significativa há um nível de 5%, entre as porcentagens médias de inibição dos derivados MTZMs e MTZN₃, MTZBr e MTZN₃, MTZI e MTZN₃ e entre o metronidazol e MTZN₃.

Tabela 2: Comparações múltiplas das porcentagens médias de inibição das substâncias por concentração.

Comparação	P-valor	Comparação	P-valor
{1} e {2}	0,00	{14} e {15}	0,00
{1} e {3}	0,00	{16} e {17}	0,00
{1} e {4}	0,00	{16} e {18}	0,00
{1} e {5}	0,00	{16} e {19}	0,40
{2} e {3}	0,00	{16} e {20}	0,00
{2} e {4}	0,00	{17} e {18}	0,00
{2} e {5}	0,00	{17} e {19}	0,00
{3} e {4}	0,00	{18} e {19}	0,00
{3} e {5}	0,00	{18} e {20}	0,00
{4} e {5}	0,00	{19} e {20}	0,00
{6} e {7}	0,00	{21} e {22}	0,00
{6} e {8}	0,00	{21} e {23}	0,30
{6} e {9}	0,00	{21} e {24}	0,00
{6} e {10}	0,00	{21} e {25}	0,00
{7} e {8}	0,00	{22} e {24}	0,00
{7} e {9}	0,50	{22} e {25}	0,80
{7} e {10}	0,00	{23} e {24}	0,00
{8} e {9}	0,00	{23} e {25}	0,10
{8} e {10}	0,60	{26} e {27}	0,20
{9} e {10}	0,00	{26} e {28}	0,50
{11} e {12}	0,00	{26} e {29}	0,00
{11} e {13}	0,00	{26} e {30}	0,10
{11} e {14}	0,00	{27} e {28}	0,60
{11} e {15}	0,00	{27} e {29}	0,00
{12} e {13}	0,00	{27} e {30}	0,70
{12} e {14}	0,00	{28} e {29}	0,00
{12} e {15}	0,20	{28} e {30}	0,30
{13} e {14}	0,00	{29} e {30}	0,00
{13} e {15}	0,00		

5 - DISCUSSÃO

A *Giardia lamblia* é um protozoário parasita que infecta o trato intestinal humano causando uma grande variedade de sintomas clínicos. A doença varia de assintomática a severa, apresentando morbidade significativa em desnutridos e imunodeficientes. Estima-se que a incidência da giardíase no mundo chegue a 1 bilhão de casos (Wright et al., 2003), a maioria deles localizados em países subdesenvolvidos. No entanto, cerca de 8% das crianças em países desenvolvidos apresentam a infecção, sendo a giardíase a responsável pela maioria dos casos de diarreia nos Estados Unidos da América (Craun, 1996; Kramer et al., 1996). Apesar disso, é uma doença negligenciada, principalmente em países pobres. Uma grande quantidade de agentes quimioterápicos têm sido usados na terapia da giardíase. No entanto, protocolos de tratamento definitivos e revisões da terapia tem sido pouco explorados. A maioria das drogas usadas apresentam efeitos adversos consideráveis e são muitas vezes contra-indicadas. Além disso, a *Giardia* parece ter uma grande habilidade para resistência a estes agentes (Boreham et al., 1988; Lindquist, 1996; Upcroft et al., 1999; Upcroft et al., 1990).

A introdução das drogas nitroheterocíclicas, na década de 50, representou uma nova era no tratamento de infecções por bactérias e protozoários. Como consequência foi sintetizado o metronidazol (1- β -hidroxi-etil-2-metil-5-nitroimidazol), que é hoje a droga mais usada no mundo para tratamento de infecções por *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica* (Maeda et al., 1953; Cosar e Julou, 1959). Embora não tenha sido documentada ainda resistência clínica ao metronidazol pela *E. histolytica*, casos de resistência têm sido significantes em *Trichomonas vaginalis* e

Giardia lamblia (Johnson, 1993; Upcroft, 1993; Voolmann, 1993). Neste contexto, o estudo de novos agentes quimioterápicos, ocupa lugar de destaque. Optamos por estudar análogos do metronidazol, não só por considerar sua eficácia como agente protozoaricida e bactericida, mas pela facilidade de manipulação das cadeias ligadas ao anel imidazólico.

5.1 - ADEQUAÇÃO DO MODELO “IN VITRO”

A manipulação de culturas axênicas de *Giardia* requer cuidados. Os trofozoítos são delicados e sentem mínimas modificações não só no cultivo (componentes do meio e temperatura) como também no ambiente físico onde se encontram aderidas. O cultivo dos parasitos em placas de 24 orifícios foi importante para a execução deste trabalho. As placas Nunc[®] e Sarsted[®] apresentaram excelente rendimento no cultivo dos parasitos. Não sabemos precisar os motivos deste resultado, talvez se deva à estrutura de polimerização do poliestireno, empregado na fabricação destas placas, capaz de gerar receptores com maior afinidade para a adesão dos trofozoítos de *G. lamblia*.

As placas de cultura, utilizadas no método colorimétrico, possibilitam ótima visualização e resolução dos trofozoítos em microscópio invertido, além de serem de fácil manipulação.

Nos ensaios de quantificação da ação do metronidazol o método colorimétrico apresentou resultados mais precisos quando comparado com a contagem de trofozoítos em câmara de Neubauer. Pelo método colorimétrico, a DE₅₀ e a CIM do metronidazol foi, respectivamente, $1,96 \pm 0,13 \mu\text{M}$ e $34,10 \pm 1,95 \mu\text{M}$, enquanto pela contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, a DE₅₀ foi de $1,82 \pm 0,41 \mu\text{M}$ e CIM de $24,64 \pm 4,52 \mu\text{M}$. O desvio padrão apresentado pela

DE₅₀ e pela CIM, determinadas pelo método de contagem em câmara de Neubauer, foi maior que aqueles encontrados quando a determinação se fez pelo método colorimétrico.

A quantificação pela contagem de trofozoítos em câmara de Neubauer apresenta uma série de variáveis, que pesam sobre sua precisão, como a homogeneização e a diluição da suspensão dos trofozoítos, antes da contagem. A contagem dos trofozoítos em microscópio óptico exige muita atenção do pesquisador, tornando o método cansativo.

Relevante ainda é o número de tubos de vidro usados neste ensaio. Estes tubos além de serem de difícil manutenção não permitem a visualização clara dos parasitos ao microscópio invertido, dificultando a avaliação de sua viabilidade.

O método colorimétrico, além de ser mais preciso, apresenta maior objetividade. A elevada objetividade é determinada pela leitura da densidade ótica, excluindo, assim a interferência humana durante a leitura (subjetividade).

5.2 - AVALIAÇÃO DOS ANÁLOGOS DO METRONIDAZOL

Os valores de DE₅₀ e CIM verificados para os análogos nitroimidazóis foram abaixo dos valores da DE₅₀ e CIM do metronidazol.

O MTZBr apresentou elevado potencial giardicida (DE₅₀ de $0,28 \pm 0,04 \mu\text{M}$ e CIM de $4,23 \pm 0,45 \mu\text{M}$) e os valores apresentados pelo MTZI (DE₅₀ de $0,40 \pm 0,03 \mu\text{M}$ e CIM de $6,69 \pm 0,38 \mu\text{M}$) foram menores que os encontrados para o metronidazol e para os análogos MTZMs e MTZN₃. Todos os análogos foram mais ativos que o metronidazol. Para um nível de 5% de significância,

existe diferença entre as porcentagens médias de inibição do metronidazol e dos derivados para cada valor de concentração.

De acordo com Upcroft et al. (1999) o caráter hidrofóbico do metronidazol é de grande importância para sua atividade giardicida, haja vista que o mecanismo de ação do metronidazol, em anaeróbicos, requer redução intracelular do grupo nitro, para formar a estrutura citotóxica. A ferredoxina é reduzida pela enzima transportadora de elétrons, PFOR localizada na membrana celular.

Pela análise da estrutura química, os novos compostos testados, MTZBr e MTZI, apresentam maior caráter hidrofóbico que o metronidazol, e isto pode estar refletindo no aumento da atividade giardicida destes novos compostos, pois a ativação do metronidazol em protozoários é dependente da enzima transportadora de elétrons, a PFOR citada anteriormente. Assim a maior hidrofobicidade destes compostos permitiria maior ativação destas substâncias no meio intracelular. No entanto, o fato de todos os novos compostos testados se mostrarem mais ativos, pode esta atividade estar relacionada, além do caráter hidrofóbico, ao potencial de redução ou com a presença de outras vias ativadoras.

Neste contexto, Cavalcanti et al. (2003) demonstraram que o caráter oxidante é essencial para a atividade microbicida de derivados nitroimidazóis. O maior potencial giardicida apresentado pelos análogos do metronidazol se deve às modificações químicas realizadas sobre a estrutura do metronidazol, fazendo com que esses apresentem maior reatividade frente à proteína ferredoxina do complexo PFOR. Os análogos nitroimidazóis no meio intracelular serão ativados por meio de uma reação de redução, envolvendo a ferredoxina do complexo PFOR presente na *G. lamblia*. Desta forma o potencial de redução

dessas substâncias químicas é de fundamental importância para o entendimento da formação de compostos ativos e do mecanismo de ação do efeito giardicida. Cavalcanti et al. (2003) testando eletrotransferência, demonstraram que o derivado MTZBr apresenta maior potencial de redução que o MTZI e este maior que do MTZMs e este ainda maior que do metronidazol. Estes resultados reforçam nossa hipótese de que o maior potencial giardicida dos análogos nitroimidazóis estariam relacionados ao potencial de redução.

Devemos ainda considerar a possibilidade de formação de outros metabólitos provenientes da redução dos análogos que contabilizariam positivamente na eficácia destes compostos.

Portanto, através dos resultados obtidos pode-se sugerir que os análogos nitroimidazóis apresentam maior caráter oxidante quando comparados ao metronidazol e deverão passar por análises de toxicidade para se avaliar principalmente o potencial mutagênico e carcinogênico, para a eleição de qual ou quais poderão ser utilizados em estudos clínicos.

A síntese e a pesquisa de análogos nitroimidazóis mais efetivos contra o parasita *G. lamblia* é de grande importância, pois isolados humanos de *Giardia* provenientes de diferentes regiões do mundo, apresentam diferenças na sensibilidade ao metronidazol, principal fármaco usado no tratamento da infecção, sendo observado um número significativo de pacientes refratários ao tratamento com o fármaco (Gardner e Hiil, 2001); além de abrir novas perspectivas de tratamento em países onde a giardíase afeta milhões de pessoas.

6 - CONCLUSÕES

- O modelo “in vitro” proposto, quantificação por colorimetria, é um método alternativo para avaliar a inibição do crescimento de *Giardia lamblia*.
- Para os testes de eficácia o método colorimétrico apresentou maior objetividade e precisão que a contagem de parasitos em Câmara de Neubauer.
- Os análogos do metronidazol MTZMs, MTZBr, MTZN₃ e MTZI apresentaram ação giardicida em ensaio “in vitro” contra a amostra Portland de *Giardia lamblia*.
- Todos os análogos testados foram mais ativos que o metronidazol.
- Dos quatro análogos testados, o MTZBr e MTZI foram mais eficientes como giardicidas.
- O caráter hidrofóbico e o potencial de redução dos análogos nitroimidazóis são, provavelmente, fatores determinantes para a eficiência destas moléculas como giardicidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N., SZYFRES, B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Washington: Pan American Health Organization (Scientific Publication nº 503). apud Thompson, R.C.A., Reynoldson, J.A., Mendis, A.H.W. 1975. *Giardia* and *Giardiasis*. **Adv. Parasitol.**, v. 32, p. 71-160, 1987.

ADAM, R. D. Biology of *Giardia Lamblia*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 447-475, 2001.

BAUM, K. F., BERENS, R. L., MARR, J. J., HARRINGTON, J. A. & SPECTOR, T. Purine deoxynucleoside salvage in *Giardia lamblia*. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 21087-21090, 1989.

BEINERT, H., HOLM, R. H., and MÜNCH, E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. **Science**, v. 277, p. 653-659, 1997.

BOREHAM, P. F. L., PHILLIPS, R. E. & SHEPHERD, R. W. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p.104-106, 1988.

BRUSCHI, M. & GUERLESQUIM, F. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 155-176, 1988.

CAVALCANTI, J. C. M., ABREU, F. C., OLIVEIRA, N. V., MOURA, M. A. B. F., CHAVES J. G., ALVES, R. J., BERTINARIA, M., FRUTTERO, R. & GOULART, M. O. F. Effect of the leaving group on the electrodic reduction mechanism of anti-*Helicobacter pylori* metronidazole derivates, in aprotic and protic media. **Bioelectrochemistry**, p. 1-5, 2003.

CARVALHO, M. G. & SILVA, M. B. S. **Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação**. Imprensa Universitária, Belo Horizonte, p. 21-22, 1988.

COSAR, C. & JULOU, L. Activité de 1`-(hydroxy-2-ethyl)-1-methyl-2-nitro-5-imidazole (8,823 R.P.) vis-à-vis des infections experimentales *Trichomonas vaginalis*. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 96, p. 238-241, 1959.

COSTA, C.A., SANTOS, M.V., ROCHA, M.O., MELLO, R.T. & BODAN, M.M.B. Parasitoses intestinais em crianças da creche Lenor Franco (SESIMINAS-Contagem, MG): diagnóstico e terapêutica. **Rev. Farm. e Bioq. UFMG**, v. 9, p.7-13, 1988.

CRAUN, G. F. Waterborne outbreaks of giardiasis: current status. In S. L. Erlandsen and E. A. Meyer (ed.), *Giardia* and giardiasis: biology, pathogenesis, and epidemiology. **Plenum Press**, New York, N.Y., p. 243-261, 1996.

CURY, G.C., SALLES, P.G.O., REIS, M.C.W., REGO, V.M., ARNDT, A.W., SOUZA FILHO, C.B.A., MOREIRA, H.B., ABREU, M.S. & LEITE, P.M.G. Prevalência da esquistossomose mansoni e de parasitoses intestinais em escolares da área rural do Município de Jaboticatubas, MG, 1992-1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, p. 217-220, 1994.

DARBON, A., PORTAL, A., GIRIER, L., PANTIM, J. & LECLAIRE, C. Traitement de la giardiase (lamblíase) par le métronidazole. **Presse Med.**, v. 70, p. 15-16, 1962.

EDWARDS, M. R., GILROY, F. V., JIMENEZ, B. M. & O`SULLIVAN, W. J. Alanine is a major end product of metabolism by *Giardia lamblia*: a proton nuclear magnetic resonance study. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 37, p. 19-26, 1989.

EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. Mechanisms of action. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 31, p. 9-20, 1993.

FARBEY, M. D., J. A. REYNOLDSON & R. C. THOMPSON. In vitro drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia intestinalis* from humans as assessed by an adhesion assay. **Int. J. Parasitol.**, v. 25, p. 593-599, 1995.

FARTHING, M.J.G. Host parasite interactions in human *Giardiasis*. **Quart. J. Med.**, v. 70, p. 191-204, 1989.

GARDNER, T. B. & HILL, D. R. Treatment of Giardiasis. Division of Infectious Diseases, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 114-128, 2001.

GOLDIN, A.J., WERNER, A.P.T., AGUILERA, X., ZULANTAY, I., WARHURST, D.C. & MILLES, M.A. Efficient diagnosis of *Giardiasis* among nursery and primary school children in Santiago, Chile by capture ELISA for the detection of fecal *Giardia* antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, p. 538-545, 1990.

GOMES, M. A., MARTINS M. S., COSTA A. O. & SILVA E. F.. Influence of a upon cytophatic effect and erythrophagocytosis different axenic strains of *Entamoeba histolytica*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37(3), p. 197-200, 1995.

GUIMARÃES, S. & SOGAYAR, M. I. L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo**, v. 37, p. 501-506, 1995.

JOHNSON, P. J. Metronidazole and drug resistance. **Parasitol. Today**, v. 9, p. 183-186, 1993.

KEISTER, D.B. Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 487-488, 1983.

KRAMER, M. H., B. L. HERWALDT, G. F. CRAUN, CALDERON, R. L. & JURANEK D. Surveillance for waterborne-disease outbreaks - United States, 1993–1994. CDC Surveillance Summaries, April 12, 1996. **Morb. Mortal. Weekly Rep.**, v. 45(SS-1), p. 1-30, 1996.

KUCERS, A., CROWE, S. M., GRAYSON, M. L. & HOY, J. F. Nitrofurans: nitrofurazone, furazolidone and nitrofurantoin. In a KUCERS, A., CROWE, S. M., GRAYSON, M. L. & HOY, J. F (ed.), The use of antibiotics. **A clinical review of antibacterial, antifungal, and antiviral drugs**, 5th ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, United Kingdom. p. 922-923, 1997.

KULDA, J. & NOÝNKOVÁ, E. *Giardia* in humans and animals. In J. P. Kreier (ed.), **Parasitic Protozoa**, 2nd ed., v. 10, p. 225-422, 1996. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

LAU, A. H., N. P. LAM, S. C. PISCITELLI, L. WILKES & DANZINGER, L. H. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole antiinfectives. **Clin. Pharmacokinet**, v. 23, p. 328-364, 1992.

LEVI, G. C., AVILA, C. A. & NETO, V. A. Efficacy of various drugs for treatment of giardiasis. A comparative study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 26, p. 564-565, 1977.

LINDQUIST, H. D. Induction of albendazole resistance in *Giardia lamblia*. **Microb. Drug Resist.**, v. 2, p. 433-434, 1996.

LIU, S. M., BROWN, D. M., O`DONOGHUE, P., UPCROFT, P. & UPCROFT, J.A. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 108, p. 137-140, 2000.

MAEDA, K., OSATO, T. & UMEZAWA, H. A new antibiotic: Azomycin. **J. Antibiot.**, v. 6A, p. 182, 1953.

MAGALHÃES, M. N. & LIMA, A. C. P. Noções de Probabilidade e Estatística. **Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo**, 3 ed., p. 102-108, 2001.

MATSUBARA, H. & SAEKI, K. Structural and functional diversity of ferredoxins and related proteins. **Adv. Inorg. Chem.**, v. 38, p. 223-280, 1992.

MENDIS, A. H., THOMPSON, R. C., REYNOLDSON, J. A., ARMSON, A., MELONI, B. P. & GUNSBERG, S. The uptake and conversion of L -[$U^{14}C$]-aspartato and L -[$U^{14}C$]-alanine to $^{14}CO_2$ by intact trophozoites of *Giardia duodenalis*. **Comp. Biochem. Physiol. Ser.**, v. B 102, p. 235-239, 1992.

MEYER, E.A. & RADULESCU. S. *Giardia* e *Giardiasis*. **Adv. Parasitol.**, v. 17, p. 1-47, 1979.

MORGAN, U. M., J. A. REYNOLDSON & THOMPSON, R. C. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. In vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, p. 328-331, 1993.

PAGET, T. A., KELLY, M. L., JARROL, E. L., LINDMARK, D. G. & LLOYD, D. The effects of oxygen on fermentation in *Giardia lamblia*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 57, p. 65-71, 1993.

PAGET, T. A., RAYNOR, M. H., SHIPP, D. W. & LLOYD, D. *Giardia lamblia* produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 42, p. 63-67, 1990.

REYNOLDSON, J. A., R. C. A. THOMPSON & HORTON, R. J. Albendazole as a future anti-giardial agent. **Parasitol. Today**, v. 8, p. 412–414, 1992.

REYNOLDSON, J. A., R. C. A. THOMPSON & MELONI, B. P. The mode of action of benzimidazoles against *Giardia* and their chemotherapeutic potential against *Giardia* and other parasitic protozoa, In G. H. Coombs and M. J. North (ed.), **Biochem. Protozool.**, p. 587–593, 1991. Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom.

SCHANTS, P.M. Parasitic zoonoses in perspective. **Int. J. Parasitol.**, v. 21, p. 161-170, 1990 apud Thompson, R.C.A., Reynoldson, J.A. & Mendis, A.H.W. *Giardia* and *Giardiasis*. **Adv. Parasitol.**, v. 32, p. 71-160, 1991.

SCHOFIELD, P. J., COSTELLO, M., EDWARDS, M. R. & O`SULLIVAN, W. J. The arginine dihydrolase pathway is present in *Giardia intestinalis*. **Int. J. Parasitol.**, v. 20, p. 697-699, 1990.

THOMPSON, R.C.A., LYMBERY, A.J. & MELONI, B.P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. **Protozoological Abstracts**, v. 14, p.1-28, 1990.

THOMPSON, R.C.A., REYNOLDSON, J.A. & MENDIS, A.H.W. *Giardia* and *Giardiasis*. **Adv. Parasitol.**, v. 32, p. 71-160, 1993.

TORRES, D.M.A.G.V., CHIEFFI, P.P., COSTA, W.A. & KUDZIELICS, E. Giardiase em creches mantidas pela Prefeitura do Município de São Paulo, 1982/1983. **Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo**, v. 33, p.137-142, 1991.

TOWNSON, S. M., BOREHAM P. F. L., UPCROFT P. & UPCROFT, J. A. Resistance to nitroheterocyclic drugs. **Acta Trop.**, v. 56, p. 173-94, 1994.

TOWNSON, S. M., UPCROFT, J. A. & UPCROFT, P. Characterisation and purification of piruvate ferredoxin oxireductase from *Giardia duodenalis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 79, p. 183-193, 1996.

TRACY, J. W. & WEBSTER, L. T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In J. G. Hardman and L. E. Limbird(ed.), **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9th ed. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y., p. 987-1008, 1996.

UNGAR, B.L.P., YOLKEN, R.H., NASH, T.E. & QUINN, T. C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. **Journal of Infectious Diseases**, v. 149, p. 90-97, 1984.

UPCROFT, J. A., CAMPBELL, R. W., BENAKLI, K., UPCROFT, P. & VANELLE, P. Efficacy of new 5-nitromidazoles against metronidazole-susceptible and resistant *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba* spp. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 43, p. 73-76, 1999.

UPCROFT, J. A. & UPCROFT, P. Drug resistance and *Giardia*. **Parasitol. Today**, v. 9, p. 187-190, 1993.

UPCROFT, J. A., P. UPCROFT & P. F. L. BOREHAM. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. **Int. J. Parasitol.**, v. 20, p. 489–496, 1990.

VOOLMANN, T. & BOREHAM P.F.L. Metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis* in Brisbane. **Med. J. Aust.**, v. 159, p. 490, 1993.

WRIGHT, J. M., DUNN, L. A., UPCROFT, P. & UPCROFT, J. A. Efficacy of anti-giardial drugs. **Expert. Opin. Drug Saf.**, v. 2(6), p. 529-541, 2003.