UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica
Área de Concentração Tecnologia Químico-Farmacêutica

Estudo para otimização de etapas da síntese do megazol e obtenção
de alguns de seus sais orgânicos

Hélio Martins Lopes Júnior

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^aDr^aCristina Northfleet de Albuquerque

São Paulo
2008

19.086

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013416

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L864e Lopes Júnior, Hélio Martins
Estudo para otimização de etapas de síntese do megazol e obtenção
de alguns de seus sais orgânicos / Hélio Martins Lopes Júnior. --
São Paulo, 2008.
75p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Albuquerque, Cristina Northfleet de

I. Tecnologia químico-farmacêutica I. T. II. Albuquerque,
Cristina Northfleet de, orientador.

660 CDD

Hélio Martins Lopes Júnior

Estudo para otimização de etapas de síntese do megazol e obtenção
de alguns de seus sais orgânicos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Cristina Northfleet de Albuquerque
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. INTRODUÇÃO	3
1.2. Parte I: Megazol e as doenças negligenciadas:	3
1.2.1. Bioquímica dos Tripomatidae	6
1.2.1.1. Redução do dehidroascorbato pela tripanotiona	13
1.2.1.2. Tripanotiona na estrusão de metais e fármacos	13
1.2.1.3. Tripanotiona na detoxificação do Tripomastidae	14
1.2.1.4. Tripanotiona na redução do peroxinitrito	16
1.2.1.5. Tripanotiona na detoxificação dos cetoaldeídos	16
1.2.1.6. Tripanotiona e Ovotiol A	16
1.2.1.7. Tripanotiona e od desoxiribonucleotídeos	18
1.2.1.8. Tripanotiona sobre os tiois de baixo peso molecular	18
1.2.2. Fármacos utilizados para doenças tripanossomias	19
1.2.2.1. Fármacos Subversivos	21
1.2.2.2.Síntese do Megazol	23
1.3. Parte II: Solubilidade de fármacos:	32
1.3.1.Solubilidade do Megazol	36
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Parte I: Otimização da síntese do megazol	40
3.1.1.Materiais	40
3.1.2.Métodos	41
1º Etapa: Alquilação	41
2º Etapa: Nitração	43
3º Etapa: Oxidação	44
4º Etapa: Cianação	45
5º Etapa: Ciclização	46

3.2. Parte II: Solubilidade de fármacos	46
3.2.1.Obtenção dos sais de megazol	46
3.2.2. Procedimento dos ensaios de solubilidade	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Parte I: Otimização das etapas de síntese do megazol	49
4.1.1. Tautomeria do anel imidazólico	49
4.1.2. Ativação do grupo tiol	50
4.1.3. Alquilação do grupo tiólico	52
4.1.4. Pré-nitração do alquilado	58
4.1.5. Nitração do alquilado	58
4.1.6. Oxidação do 1-metil-2-etil-5-nitroimidazol	59
4.1.7. Cianação a partir da substituição da sulfona	59
4.1.8. Ciclização	60
4.2. Parte II: Solubilidade dos sais de megazol	60
4.2.1. Obtenção dos sais	60
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cálculos das quantidades de reagentes empregados para obtenção dos sais de megazol	48
Tabela2: Classificação de perfil de solubilidade de um composto	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do megazol, fármaco modelo deste trabalho.	3
Figura 2: Moléculas ativas contra a família Tripomastidae.	7
Figura 3: Etapas da biossíntese da tripanotona (T(SH ₂)).	9
Figura 4: Processo de redução da tripanotona (T(SH ₂)).	11
Figura 5: Reações dependentes da tripanotona (T(SH ₂)).	12
Figura 6: Redução de hidroperóxido e ribonucleotídeos.	15
Figura 7: Biossíntese do ovotiol A.	17
Figura 8: Estruturas dos principais fármacos antitripanossômicos.	20
Figura 9: Estruturas dos principais fármacos antichagásicos.	21
Figura 10: Mecanismo de ação dos fármacos subversivos.	21
Figura 11: Síntese do megazol pelo método utilizado por Asato e Berkelhammer, 1968.	24
Figura 12: Síntese do megazol utilizada por Remers, Gibs e Weiss, 1969.	25
Figura 13: Esquema de síntese do megazol, proposto por Albright e Shepahard, em 1973.	26
Figura 14: Rota de síntese proposta para obtenção do megazol por Albuuquerque, em 1995.	27
Figura 15: Rota de síntese otimizada por Moretto, em 2001.	29
Figura 16: Rota de síntese utilizada por Amaro, em 2003	30
Figura 17: Rota de síntese do megazol, empregada neste trabalho.	31
Figura 18: Tautomeria do composto 2-mercapto-1-metilimidazol.	49
Figura 19: Reação de ativação do 2-mercapto-1-metilimidazol.	50
Figura 20: Reação de alquilação.	53
Figura 21: Reação de alquilação sem catalisador.	53
Figura 22: Mecanismo de reação interfacial de Makosza para CTF-LL em presença de hidróxido.	56
Figura 23: Nitração do alquilado.	58
Figura 24: Nitração do nitrado alquilado.	59

RESUMO

A obtenção e o estudo de sais orgânicos de megazol constituem a meta deste trabalho. Problemas futuros de formulação poderão surgir em função da dificuldade de solubilização do fármaco em água, o que justifica a necessidade de obtenção dos referidos sais.

Alterações na rota de síntese do megazol também foram estudadas, visto ser este a matéria prima do estudo. Observou-se que o megazol pode ser obtido por diferentes caminhos sintéticos e o escolhido foi uma rota já desenvolvida em nosso grupo.

Nesta rota foram detectados alguns pontos de estrangulamento tornando-se necessária ativar o grupamento tiólico na alquilação e modificar as condições de nitração do produto alquilado. Quanto aos demais processos envolvidos, parecem não haver necessidade de modificações experimentais.

ABSTRACT

This work has the purpose of obtaining and studying of some organic salts of megazol. the reason for obtaining is due to the difficulty solubilization of drug in water, carrying problems on formulation.

Modification in route of synthesis to obtention of megazol has been studied. The obtention of megazol has been observed and because of this can be in different synthetic routes, processes and reagents of chemistry of heterocyclics, example imidazoles modifying.

It's necessary the activation of thiol group in step alkylation, and the nitration of alkylated products simplify the nitration. There are no need for changes in additional processes.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. INTRODUÇÃO:

Este trabalho foi dividido em duas partes, a primeira enfoca a síntese do megazol (Figura 1), um potente fármaco antiparasitário, discorrendo sobre a química de nitroimidazóis, bem como a importância do estudo de fármacos direcionados as doenças negligenciadas. A segunda parte de trabalho trata da importância da solubilidade de fármacos para a ação farmacológica.

Figura 1: Estrutura do megazol, fármaco modelo deste trabalho.

1.2. Parte I: Megazol e as doenças negligenciadas:

Doenças negligenciadas são patologias causadas por parasitas que não apresentam interesse comercial para o desenvolvimento de fármacos pela indústria farmacêutica. Dentre as doenças negligenciadas incluem-se aquelas ligadas ao subdesenvolvimento e à falta de infra-estrutura de saneamento básico.

As doenças parasitárias mais estudadas são aquelas causadas pela família Trypanmatidae. Uma destas parasitoses conhecida no Brasil é a doença de Chagas que afeta de 16 a 18 milhões de pessoas, com mais de 100 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção. O agente etiológico da doença é o *Trypanossoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado, cujo ciclo de vida envolve passagem obrigatória através de hospedeiros vertebrados (incluindo o homem) e invertebrados (inseto triatomídeo hematófago conhecido como barbeiro ou chupão). (Coura, Castro, 2002).

Além da doença de Chagas, causada pelo *Trypanossoma cruzi* na América, no continente africano, várias doenças negligenciadas; como a doença do sono, que é transmitida através da mosca tsé-tsé. Na África, o que contribui para a disseminação da doença é a falta de infra-estrutura na área da saúde e os conflitos entre os países que, por sua vez, levam à destruição da estrutura existente deixando a população sem assistência. Existem duas formas de tripanossomíases africanas humanas causadas por dois parasitas idênticos morfológicamente: *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*. (Legros et al, 2002).

Outra doença provocada pela família Trypanastidae é a leishmaniose. A leishmaniose é causada pelo *Leishmania sp*, um parasita microscópico transmitido pela picada de mosquitos. Cerca de trinta espécies de insetos podem transportar o parasita, que é transmitido a eles por animais domésticos ou silvestres infectados, como roedores e cachorros. A leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar, é fatal, se não for tratada. É comum no Brasil, na Índia, no Nepal e em partes da África Central.

O Calazar é algumas vezes visto como uma infecção paralela em pacientes com HIV. Na leishmaniose cutânea, a forma da doença que afeta a pele, causa úlceras no rosto, nos braços e pernas, o que resulta em sérias deficiências físicas e problemas sociais. A leishmaniose mucocutânea, sempre derivada da forma cutânea, causa ulceração, seguida da destruição de membranas mucosas e do tecido do nariz, da boca e da garganta. Ela pode levar à morte por infecção secundária das vias respiratórias. A leishmaniose afeta 12 milhões de pessoas em todo o mundo, mas somente 30% dos casos são reportados. Trezentos e cinquenta milhões de pessoas correm riscos de infecção em 88 países onde a doença prevalece. As diferentes formas de leishmaniose se espalharam por outras áreas do mundo, com o auxílio de pessoas não imunes que fugiam das guerras ou de desastres econômicos para áreas remotas e infectados, sem acesso ao tratamento médico. (Legros et al 2002).

Há urgência do desenvolvimento de novos fármacos para as doenças negligenciadas, pois apesar da globalização e do alto desenvolvimento tecnológico existem focos onde não há tratamento, ou o tratamento é precário o que acarreta adaptação dos hospedeiros aos meios urbanos e resistência aos fármacos convencionais empregados nestas doenças. Para o desenvolvimento de novos fármacos ou estudos relacionados às antigas moléculas é necessário o conhecimento minucioso dos processos bioquímicos e metabólicos dos parasitas transmissores. (Legros et al. 2002)

1.2.1. Bioquímica da família Trypanomatidae

A família Trypanomatidae é composta por os tripanosomas e a leishmania, que são parasitas que causam a doença do sono África (*Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*), (*Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma brucei*) doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e as diferentes formas de leishmania (*L. donovani*, *L. major*)

Os tripanossomatídeos diferem de todos os outros eucarióticos e procarióticos por possuírem um sistema redox (antioxidante) específico, o qual é baseado na tripanotiona conjugada com a flavoenzima tripanotiona redutase dependente de NADPH. A tripanotiona foi encontrada em vários organismos como : *T. cruzi*, *T. congolense*, *T. brucei*, *Leishmania donovani* e *L. major*, *Euglena gracilis*, *Entamoeba histolytica*. (Fairlamb et al. 1984, Schmidt et al 2003)

A sensibilidade dos tripanossomatídeos encontra-se no estresse oxidativo, e como as células dos mamíferos não possuem o metabolismo para a tripanotiona torna-se um local interessante para o desenvolvimento de fármacos. Alguns destes já foram testados com este intuito, como a sulfoximina butionina (BSO), um inibidor da gama-glutamilcisteina sintetase (Figura 2). O BSO mostrou ser ativo em animais infectados com *T. brucei* e *L. donovani*. A difluorometilornitina (DFMO) é um inibidor suicida da ornitina descarboxilase e diminui os níveis de tripanotiona celular. (Luise et al, 2003).

BSO=buthionine sulfoximine

Kukoamina A (poliamina)

N¹,N¹,N⁴,N⁸,N¹².- penta(3-fenilpropil)espermina (espermidinas)

Figura 2: Moléculas ativas contra a família Tripomastidae.

Outros pontos de ataque para novas moléculas são as enzimas glutathionileespermidina sintetase e tripanotiona sintetase, que podem vir a ser interessante para o desenvolvimento destas substâncias, uma vez que não tem concorrentes nas células humanas. A

glutamilespermidina sintetase das espécies *E. coli* e *C. fasciculata* são usadas em estudos para os inibidores desejados. Um substrato análogo de fosfinato parece ser um eficiente inibidor. (Krauth-Siegel et al. 2003)

A tripanotiona redutase (TR) é a principal enzima estudada no sistema antioxidativo dos trypanossomas. Esta é a enzima chave da defesa antioxidante do parasita, não ocorre nas células humanas, e é essencial para todos os tripanosomatídeos.

Têm surgido vários inibidores da TR que são possíveis compostos para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários. Muitos estudos foram focados em compostos que inibem a enzima do parasita, mas não a glutathione redutase (GR) do homem. Dentre os inibidores estudados pode-se citar a Kukoamina A (Figura 2), um derivado de espermina natural extraído da *Lycium chinense*. Várias espermidinas e compostos com a base da espermina foram sintetizados. Em muitos casos os derivados de espermina são significativamente mais efetivos do que a correspondente espermidina, sendo o $N^1, N^1, N^4, N^8, N^{12}$ -penta(3-fenilpropil)espermina (Figura 2) o mais efetivo inibidor competitivo da TR no *T. cruzi*. Compostos tricíclicos como a quinacrina, fenotiazina, imipramina e outros compostos tricíclicos usados como fármacos antidepressivos são inibidores competitivos da TR. Os inibidores irreversíveis, como a carmusina (nitroureia), é um inibidor irreversível da TR, mas também da glutathione redutase humana.

A tripanotiona ($T(SH)_2$) é o produto da biossíntese da TR, e é um agente antioxidante dentro do organismo, que produz o mecanismo de defesa, pois protege o organismo do estresse oxidativo e elimina

moléculas exógenas (fármaco) através de conjugação. (Krauth-Siegel et al. 2003)

A biosíntese da $(T(SH)_2)$ pode ser dividida em três etapas, como mostra a figura 3.

Figura 3: Etapas da biossíntese da tripanotona ($T(SH)_2$). (Luise et al, 2005)

Na primeira etapa a glutamina é formada através da formação de gama-glutamilcisteína que é a união de dois aminoácidos, L-glutamato e L-cisteína. A reação depende de ATP e é catalisada pela gama-glutamilcisteína sintetase, que é a enzima limitante de velocidade na síntese da glutamina. A enzima é regulada pela formação de glutamina (feedback-inibitória) e é inativada pela cisteamina e butionina sulfoximina (BSO). A gama-glutamilcisteína reage com um aminoácido de L-glicina para produzir a glutamina através da glutamina sintetase.

A segunda etapa corresponde à produção de espermidina. Não se observa um mecanismo uniforme para a síntese de espermidina entre os tripanossomas. O *T. cruzi* não sintetiza espermidina, precisando recorrer a cadaverina e putrescina do meio. Já os tripanossomas africanos e as *Leishmanias* produzem sua própria espermidina. A síntese da espermidina começa com a descarboxilação da ornitina, através da ornitina descarboxilase que produzirá a putrescina, o qual será o substrato para a espermidina sintetase. A reação requer a S-adenosilmetionina descarboxilada, que se ligará a putrescina formando a espermidina.(Luise et al, 2005)

Na terceira etapa a espermidina se liga a glutathione através da glutathioniespermidina sintetase, esta enzima é dependente de ATP, por último a glutathioniespermidina se ligará a mais uma molécula de glutathione através da tripanotiona sintetase formando a tripanotiona. Vale a pena frisar que a tripanotiona é uma molécula da união da espermidina com duas moléculas de glutathione, ou seja, é um bis (glutathioniespermidina) (Hrauth-Siegel et al, 2003).

A redução da tripanotiona ($T(SH)_2$) se dá pela tripanotiona redutase (TR), e é uma reação dependente de NADPH. Para TR manter a ($T(SH)_2$) no estado reduzido é necessário obrigatoriamente NADPH, e se torna uma enzima essencial para a vida dos tripanossomas por combater o estresse oxidativo (Figura 4).

Figura 4: Processo de redução da tripanotona ($T(SH)_2$). (Luise et al, 2005)

A ($T(SH)_2$) é um espontâneo e eficiente agente redutor de deidroascorbato, glutathione dissulfeto, e da forma dissulfeto do ovotiol. A ($T(SH)_2$) tem um potencial redox de (-242 mV), e é similar ao da glutathione (-230 mV para -250 mV), porém a diferença crucial entre a tripanotona e a glutathione é a cinética de formação de dissulfetos é mais favorecida na tripanotona que na glutathione. Uma segunda diferença são os valores de pK_a dos tiois. A tripanotona tem um tiol com pK_a abaixo de 7,4, provavelmente como resultado de uma carga positivamente carregada no nitrogênio, e os valores da glutathione por volta de 8,7 a 9,2. O pK_a da tripanotona coincide com o pH intracelular do parasita, isto certamente contribui para esta reatividade, como uma constante de segunda ordem exibe um valor ótimo quando o valor do pK_a é próximo ao valor do meio ao redor.

A diferença entre os sítios ativos da tripanotona redutase (TR) e glutathione redutase faz com que inibidores ligantes específicos da TR, tenham uma baixa afinidade para a glutathione redutase. A glutathione redutase tem no sítio de ligação do substrato uma carga positiva

hidrofílica que interage com os carboxilatos de glicina da GSSG, enquanto que o sítio da TR é mais espaçoso, para acomodar substratos maiores, e tem uma região carregada negativamente e hidrofóbica, na qual a espermidina se liga. Embora potentes inibidores da TR pudessem ser desenvolvidos por meio de modelagem molecular, foi visto que vários modelos diferentes de ligação como compostos para TR são energeticamente desfavoráveis (Fraser et al, 1997; Gilbert et al 1990).

A hidrofobicidade do sítio de ligação do substrato da TR também influi na suscetibilidade da enzima para a inibição por uma gama de compostos aromáticos tricíclicos como: derivados da acridina, fenotiazina, benzoazepina, isoaloxazina e pirido quinolona.

Como citado anteriormente, a tripanotiona atua no organismo como uma molécula de defesa, sendo um agente redutor. As reações que participam, como agente redutor, estão mostradas na figura abaixo:

Figura 5: Reações dependentes da Tripanotiona T(SH)₂ (Adaptado de Luise et al, 2005)

As diversas reações são discutidas a seguir:

1.2.1.1. Redução do dehidroascorbato pela tripanotiona

O ácido ascórbico é um poderoso antioxidante e seqüestrador de radicais. O dehidroascorbato formado nestas reações de oxidação pode ser convertido a ácido ascórbico através de tripanotiona. A reação enzimática não está esclarecida, mas se mostrou de duas a três vezes mais ativa do que a glutatona. A oxidação espontânea da tripanotiona parece ser o suficiente para quantidade de dehidroascorbato formado no protozoário (Clark et al, 1994).

1.2.1.2. Tripanotiona na extrusão de metais e fármacos.

A tripanotiona mostrou que se conjugada com metais e fármacos (substâncias exógenas) é um importante mecanismo de resistência a estes fármacos. Na leishmania resistente a arsenitos trivalentes ou antimônio, o gene PGPA (Proteína A ligada glicoproteína P) está freqüentemente amplificado. A PGPA é um transportador em cascata que mostrou transportar o conjugado tripanotiona-arsenito. É interessante observar que a amplificação do PGPA está acompanhada da elevação dos níveis de tripanotiona nas células de leishmania. O *T. brucei* expressa a MRPA (Proteína A associada a resistência de multidrogras), que é estruturalmente parecida com a PGPA, resulta

em um aumento de 10 vezes nos valores para IC50 para fármacos arsenicais como melarsoprol. A tripanotiona pode ter seus níveis elevados em 20 vezes comparados com o estado basal (Ouellete et al, 1991; Legare et al, 1997; Shahi et al, 2002).

1.2.1.3. *Tripanotiona na detoxificação do Tripomastidae.*

Os tripanossomas toleram baixos níveis de hidróperóxidos, provavelmente porque eles não têm as enzimas catalase e glutathione peroxidase. Primeiramente pensava-se que a reação ocorria espontaneamente entre a tripanotiona e o peróxido de hidrogênio, posteriormente observou-se três diferentes classes de peroxidases caracterizadas nos tripanossomas, sendo a tripanotiona a doadora de elétrons.

A primeira enzima é a triparedoxina peroxidase. Enzimas homologas foram encontradas em *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. infantum*, *L. major*. Essa enzima metaboliza peróxido de hidrogênio, hidróperóxido t-butil, hidróperóxido de ácido linolênico e hidróperóxido de fosfatidilcolina. A conjugação tripanotiona/triparedoxina tem um papel fundamental como alvo em cascata do parasita que cataliza a redução dos hidróperóxidos e ribonucleotídeos (Nogoceke et al, 1997), como pode ser observado na figura 6:

Na família Tripomastidae o elétron é transportado do NADPH para redução dos peróxidos através da tripanotiona redutase (TR), tripanotiona (T(SH₂)) e triparedoxina (Tpx), que por sua vez reduz os peróxidos, e a ribonucleotideo redutase (RiboR) que catalisa a redução do difosfatenucleosídeo para desoxinucleosídeo difosfato, que é um precursor na síntese de DNA.

A terceira classe seria uma peroxidase Heme dependente de ascorbato, que reduz especificamente peróxido de hidrogênio. Esta enzima foi observada no *T. cruzi*.(Wilkinson et al 2003)

1.2.1.4. *Tripanotiona* na redução do peroxinitrito

O peroxinitrito (ONOO-) é um produto da reação entre o radical superóxido e o radical óxido nítrico, e é um potente oxidante que ajuda os macrófagos humanos a combaterem um patógeno. O peroxinitrito pode oxidar diretamente a tripanotiona, isso foi observado em *T. cruzi* quando exposto a peroxinitrito, como pode ser oxidada através das enzimas triparedoxina e triparedoxina peroxidase (Thomson et al, 2003; Trujillo et al, 2004).

1.2.1.5. *Tripanotiona* na destoxicação nos cetoaldeídos

Nos mamíferos o sistema de glioxilase é composto pelo glioxilase I e II, que catalisam a dismutação de cetoaldeídos dependente de glutathione nos respectivos hidroácidos, que é o metilglioxal, um subproduto formado da glicólise. O *T. brucei* tem a glioxilase II que tem alta preferência pela tripanotiona ao invés da glutathione (Irsch et al, 2004).

1.2.1.6. *Tripanotiona* e Ovotiol A

A função fisiológica dos ovotiois é mais variada do que inicialmente se pensava. O ovotiol A foi recentemente identificado como sendo um ferormônio masculino da *polichaete* marinho *Platynereis dumerilli*. Os ovotiois podem também estar envolvido na regulação redox em

alguns organismos, um estudo adicional na identificação do regulador redox do complexo sintetase ATP nas algas verdes unicelulares, *Dunaliella salina*, indicou o isolamento da forma disulfeto do ovotiol A. Resultados recentes sugerem que os ovotiois podem ter um papel importante na proteção contra os nitroativos (Steenkamp et al 1996).

A biossíntese do ovotiol A procede pela via de formação de um intermediário 4-mercaptohistidina. Essa biossíntese não está esclarecida e deixa algumas dúvidas.

Figura 7: Biossíntese do Ovotiol A (Steenkamp. 2002)

1.2.1.7. *Tripanotiona e os desoxiribonucleotídeos*

A tripanotiona acoplada com a triparedoxina reduz equivalentemente na síntese do desoxiribonucleotídeo do parasita. A tripanotiona é o primeiro exemplo de um tiol não-proteico fisiológico, que espontaneamente reduz a ribonucleotídeo redutase (Dormeyer et al, 2001).

1.2.1.8. *Tripanotiona sobre os tiois de baixo peso molecular.*

Os eucarióticos e as bactérias Gram-negativas têm como principal tiol de baixo peso molecular a glutathiona, sendo importante como cofator, doador de elétrons para enzimas, na detoxificação de xenobióticos, e na proteção celular contra o stress oxidativo e nitroativo. Já as bactérias Gram-positivas não sintetizam a glutathiona e nos tripanossomatídeos a glutathiona é convertida em mono e *bis*-glutathionil conjugado da espermidina, originando a tripanotiona, a qual é mantida na forma reduzida através da tripanotiona redutase, como explicado anteriormente. Esta mantém na forma reduzida de maneira direta ou indireta as quatro moléculas tiois de baixo peso molecular (tripanotiona, glutathionilespermidina, glutathiona e ovotiol A). Essas moléculas funcionam como um tampão redox. (Daniel, 2002)

1.2.2. Fármacos utilizados em doenças tripanossômicas.

A suramina e pentamidina (Figura 8) são usadas na primeira fase da doença do sono, enquanto o parasita encontra-se no sistema sanguíneo e linfático. A segunda fase quando o parasita encontra-se no sistema nervoso central utiliza-se o melarsoprol (arsênico trivalente) (Luise et al, 2005).

A eflornitina é utilizada no estágio tardio da doença, causada por *T. brucei gambiense*, mas não para *T. brucei rhodesiense*, que é resistente. Das substâncias citadas anteriormente a única com mecanismo de ação conhecido é a eflornitina, e todas parecem ter múltiplos locais de ação. A eflornitina (Figura 8) é um inibidor suicida da ornitina descarboxilase que, no *T. brucei gambiense*, tem uma meia-vida de mais do que 18 h. Como o *T. brucei rhodesiense* a meia-vida para a ornitina descarboxilase é mais curta, é utilizado um tratamento repetido para este último. (Luise et al, 2005)

O melarsoprol (Figura 8) é único fármaco eficaz na fase tardia da doença do sono no leste africano, e 5% dos pacientes morrem devido a encefalopatia causada pela substância. O óxido de melarsen, outro melaminofenil arsenical é transportado para o interior do *T. brucei* pelo transportador P2 adenosina/adenina, que causa lise celular, mas não se compreende ainda este mecanismo. O arsenicais trivalentes são estáveis com numerosas proteínas tiólicas e outros compostos do tipo (di)thiol. O óxido de melarsen se liga de forma irreversível com a tripanotiona redutase e lipomido desidrogenase.

O nifurtimox e benznidazol (Figura 9) são indicados para doença de Chagas na fase aguda, mas na intermediária e crônica é questionável sua ação, além dos vários efeitos colaterais. O nifurtimox induz o

aumento do consumo de O_2 e formação de peróxido de hidrogênio, em seguida há uma redução do grupo nitro gerando o radical anion nitro, e este formará os ânions superóxidos. Já o benzimidazol é transformado em metabólitos que covalentemente ligam-se ao DNA, lipídios e proteínas do parasita. (Docampo and Stoppani, 1979; Nunez-Vergara, et al, 1997; Masana et al., 1984)

Figura 8: Estruturas dos principais fármacos antitripanossômicos. (Steenkamp. 2002)

Figura 9: Estruturas dos principais fármacos antichagásicos.

1.2.2.1. Fármacos Subversivos

Os nitrofuranos, naftoquinonas e os nitroimidazóis agem como substratos subversivos da tripanotona redutase e de outras flavoenzimas. Estes são reduzidos, em etapas por simples troca de elétron, o que caracteriza uma reação radicalar, que reagem com uma molécula de oxigênio produzindo um ânion radicalar superóxido (Cenas et al, 1994; Henderson et al, 1988; Jockers et al 1989; Blumenstiel et al 199; Salmon-Chemin et al, 2001).

No caso da TR, este processo leva a uma redução da tripanotona disponível que será oxidada pelos radicais livres formados na reação, além de diminuir a quantidade de NADPH, uma fonte necessária para a redução da tripanotona e consumo de O₂ (Figura 10).

Figura 10: Mecanismo de ação dos fármacos subversivos (X = meglazol) (Luise et al, 2005)

É interessante observar que estas substâncias não agem no ciclo redox no parasita, mas consomem os substratos necessários para que o ciclo se mantenha estável, ou seja, são moléculas que desestabilizam a proteção antioxidante dos tripanosomatídeos. Vale lembrar que não diminuem apenas a tripanotiona, mas todas as outras moléculas.

Vale salientar que uma simples diferença entre o hospedeiro e o parasita não é suficiente para uma enzima ser a molécula alvo do fármaco, podendo ser apenas um pré-requisito para uma aproximação racional da quimioterapia.

No caso de proteínas muito abundantes será difícil manter altas concentrações de substância ativa para que se ligue reversivelmente na proteína da célula. Outro aspecto importante é a meia vida *in vivo* da proteína alvo, pois proteínas com *turnover* rápido de síntese impedirão o efeito bloqueador de um inibidor (fármaco) irreversível, já que a quantidade deste será insuficiente.

Devido a esses fatores limitantes do fármaco com ação específica, vale a pena frisar que os tratamentos com associação de substâncias com sítios de ação diferentes são de grande interesse. No caso específico dos tripanosomatídeos, a inibição da produção de tripanotiona é essencial, mas também poderia potencializar o efeito dessas substâncias com o uso em conjunto de fármacos com ação oxidante como os substratos subversivos.

Estes fármacos diminuiriam a fonte de substrato para a síntese da tripanotiona através da redução de NADPH, O₂, e a própria oxidação da tripanotiona. Apesar da toxicidade dos nitrofuranos e nitroimidazóis, vale lembrar que muitos antitumorais são registrados

mesmo com problemas sérios de toxicidade e mutagenicidade. Tal contraste parece ser ilógico, pois o fundamento ético para o registro de medicamentos antitumorais é o mesmo para o registro de fármacos contra a doença de Chagas, doença do sono, leishmanioses e outras doenças negligenciadas. Além do que, a possibilidade de associação de substâncias ativas pode trazer a potencialização entre elas, o que acarretará na administração de doses inferiores àquela que se prevê para a monoterapia.

Dentre as moléculas em desenvolvimento com ação do tipo substrato subversivo, aquela que se apresenta na fase mais adiantada é o megazol, uma vez que já foram realizados testes em animais para estudo de farmacocinética, além de ser comprovada a cura em animais infectados com *T. cruzi* (Albuquerque et al, 1999)

1.2.2.2.Síntese do megazol

O megazol foi primeiramente sintetizado no final dos anos 60 por Berkalhammer e Asato, dentro de um programa de síntese de análogos do tipo 5-nitroimidazol (Berkelhammer & Asato, 1968).

Este método utilizou como material de partida o 4-nitroimidazol que foi metilado em posição 1 utilizando o dimetilsulfato em meio aprótico neutro. O produto desta metilação foi hidroximetilado em posição 2 utilizando o paraformaldeído em dimetilsulfoxido, e o álcool produzido foi oxidado ao aldeído correspondente pela ação do tetracetato de chumbo ou pelo dióxido de manganês. Este aldeído reagiu com a tiosemicarbazida em meio ácido ou neutro produzindo a

tiosemicarbazona correspondente. Esta última sofreu ação oxidante de um sal duplo de ferro e amônio formando o anel 1,3,4-tiadiazol, dando origem ao megazol, produto final deste esquema reacional com um rendimento global de 4%. O esquema a seguir mostra o método utilizado por Asato e Berkelhammer e que se caracterizou como o primeiro método de obtenção do megazol (Figura 11).

Figura 11: Síntese do megazol pelo método utilizado por Asato e Berkelhammer, 1968.

Devido à identificação de algumas dificuldades nesta rota de síntese, outras foram propostas. Em 1969, Remers, Gibs e Weiss formularam uma rota baseada na formação inicial do anel tiadiazólico a partir da tiosemicarbazida, finalizando com a formação do anel imidazólico e nitração para obtenção do megazol. Esta rota partiu da tiosemicarbazida que, reagindo tanto com cloretos de ácidos halogenados como anidridos dos mesmos, formou o anel tiadiazólico funcionalizado na posição 5 (Figura 12) (Remers et al., 1969).

O processo de ciclização foi realizado pela ação do ácido sulfúrico, obtendo-se o anel imidazólico. Este foi então metilado pelo dimetilsulfato e, após proteção da amina do anel tiadiazólico, efetuou-se o processo de nitração. O megazol foi então obtido por hidrólise ácida da amida com um rendimento global final em torno de 1%, como pode ser visto a seguir:

Figura 12: Síntese do megazol utilizada por Remers, Gibs e Weiss, 1969.

Outra rota foi formulada por Albright e Shepherd em 1973, que se baseava na reatividade do grupamento metila em posição 2 do anel nitroimidazol. Esta rota sintética apresentou um rendimento global de 12% sendo executada em 4 etapas (Figura 13) (Albright & Shepherd, 1973).

Figura 13: Esquema de síntese do megazol, proposto por Albright e Shephard, em 1973.

O material de partida utilizado foi o 1,2-dimetil-5-nitroimidazol que reagiu com cloreto de benzoíla em presença de uma amina terciária.

O produto desta reação reagiu com nitrito de sódio em presença de ácido sulfúrico formando a oxima correspondente que, sob ação do cloreto de tionila, produziu a nitrila na posição 2. Este foi o

intermediário-chave do processo e reagiu facilmente com a tiosemicarbazida em meio de ácido trifluoracético produzindo o megazol. O rendimento global deste processo de síntese variou em torno de 12%.

Com base na química de nitroimidazóis e em experimentações anteriores das rotas citadas, foi formulado, um novo caminho para a obtenção do megazol a partir de duas matérias primas diferentes. (Figura 14):

Figura 14: Rota de síntese proposta para obtenção do megazol, por Albuquerque, em 1995.

A primeira proposta foi a utilização do 1-metilimidazol que passou por uma formação de carbânion na posição 2 pela ação do butillítio e introdução do grupamento tiometila pela reação do carbânion com dimetildissulfeto. Este processo apesar de rápido requer condições experimentais extremas (temperatura de -78°C e meio anidro) além do que o rendimento alcançado ficou em torno de 30%, baixo para um processo de alquilação.

A matéria-prima foi substituído pelo 1-metil-2-tioimidazol, cuja posição 2 já está funcionalizada necessitando apenas de uma alquilação branda pela ação do dimetilsulfato.

O composto 1-metil-2-tiometilimidazol foi nitrado em posição 5 pelo ácido nítrico a 69% em ácido acético. O 5-nitroimidazol foi submetido a oxidação para produzir a sulfona correspondente, a qual por reação com cianeto de potássio, levou ao 1-metil-2-ciano-5-nitroimidazol.

Na última etapa efetuou-se a reação da nitrila com tiosemicarbazida, em presença de ácido trifluoracético para conduzir ao produto desejado, o megazol.

Os rendimentos globais utilizando-se o 1-metilimidazol e o 1-metil-2-tioimidazol como materiais de partida foram de 7 e 5,5% respectivamente.

Em 2001 Moretto, retomando esta rota, estudou alguns processos de otimização visando aumentar o rendimento das etapas limitantes como a nitração, que rendia 22% do produto desejado.

Á partir de dados experimentais a rota foi modificada segundo indicado na figura 15:

Figura 15: Rota de síntese otimizada por Moretto, em 2001.

Nesta alternativa foi utilizado como matéria-prima o composto 1-metil-2-tioimidazol que foi metilado pelo dimetilsulfato de acetonitrila. O produto obtido foi nitrado com ácido nítrico fumegante a aproximadamente 100°C atingindo um rendimento de 40% do produto nitrado desejado. A sulfona foi então obtida por oxidação empregando o ácido metacloroperbenzóico em diclorometano, atingindo um rendimento de 95% do produto oxidado. Seguiu-se a substituição da sulfona pelo grupo ciano e ciclização do produto obtido com a tiosemicarbazina, sem alterações nas metodologias

originais e com manutenção dos rendimentos. Essa otimização ampliou o rendimento global da rota estudada de 7% para 12%.

Após diversos fracassos experimentais foi encontrada uma metodologia simples, apesar de empregar um agente lacrimogênio (BrCN), mas bastante viável na cianação de imidazóis na posição 2.

A partir deste fato foi formulada uma rota alternativa (Figura 16) para a obtenção do megazol:

Figura 16: Rota de síntese utilizada por Amaro, 2003.

A primeira etapa tem como material de partida o 1-metilimidazol que foi funcionalizado na posição 2 pela ação do complexo (CAP) formado pela reação do brometo de cianogênio com 1,4-dimetilaminopiridino em dimetilformamida. É obtido o 1-metil-2-cianoimidazol com rendimento médio de 60%. A segunda etapa é a ciclização do 1-metil-2-cianoimidazol com a tiosemicarbazida, na presença de ácido trifluoracético, permitindo a formação do anel tiadiazólico com rendimento de 40%. A última etapa é a nitração do anel imidazólico, para este processo é necessária uma proteção da amina do anel

tiadiazólico com anidrido acético. A nitração ocorre pela ação do ácido nítrico em presença do ácido acético com um rendimento médio de 70% e com posterior liberação da amina por ação do ácido clorídrico concentrado. A rota apresentou um rendimento global de 13%.

O Megazol não possui uma rota de síntese que seja viável em escala industrial. As rotas de síntese existentes servem, até o momento, apenas para pequena escala, isto é, quantidade suficiente para realizar ensaios biológicos. (Rebello et al, 2000; Albuquerque et al, 1999).

Para realização deste trabalho foi utilizada a rota proposta por Albuquerque em 1995 e otimizada por Moretto em 2001 com algumas modificações (Figura 17).

Figura 17: Rota de síntese de megazol, empregada neste trabalho (Albuquerque et al, 1995; Moretto, 2001)

1.3. Solubilidade de fármacos

A solubilidade de fármacos em um meio aquoso e nas membranas lipídicas desempenha um importante papel na sua absorção e transporte até os sítios de ação. A solubilidade de um fármaco, bem como seu comportamento na água, são particularmente importantes porque a água é o principal constituinte de toda a matéria biológica.

Em meios biológicos, a água pode atuar como um solvente inerte, um meio de dispersão para soluções coloidais e um reagente nucleofílico em numerosas reações. A atividade metabólica normal somente pode ocorrer quando pelo menos 65% da célula forem compostos de água. A solubilidade e a ionização de fármacos na água, juntamente com a partição destes entre a água e os materiais lipofílicos, influenciam a facilidade de absorção através de uma membrana celular, assim como o transporte de um fármaco desde sua via de administração até o seu sítio de ação. Além disto, a formação de pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas na água, influenciam as conformações das macromoléculas biológicas, o que afeta o seu próprio comportamento (Thomas, G. 2003).

A água está envolvida no transporte de um fármaco a partir da via de administração até o seu sítio de ação. O grau de solubilidade de um fármaco em água é particularmente importante quando este é administrado oralmente, como um sólido ou em suspensão. Nestes casos, geralmente, o fármaco tem que se dissolver no líquido gástrico aquoso antes que possa ser absorvido e transportado, via circulação sistêmica, até o seu sítio de ação. No entanto, a baixa absorção devida à baixa solubilidade em água pode em alguns casos ser usada para liberação do fármaco no sítio de ação desejado. Se um fármaco é insolúvel em água o mesmo é pouco absorvido pelo tubo digestivo

e desse modo a maior parte da dose é retida pelo trato gastrointestinal. Se este for o local de ação, a baixa solubilidade do fármaco será benéfica. No entanto, se o fármaco deve exercer sua ação em outro local, devendo antes ser absorvido no trato gastrointestinal, esta insolubilidade produz uma perda do fármaco levando até a uma irritação local devido a sua retenção. (Thomas, G. 2003)

A baixa solubilidade de um fármaco também pode ser usada como um reservatório do fármaco e serve para produzir formulações mastigáveis ou para mascarar o sabor amargo que o fármaco possa ter.

A reatividade da água também afeta a estabilidade dos fármacos. A hidrólise pela água é uma das principais vias usadas para metabolizar fármacos que contém grupamentos éster, amidas ou outros grupos passíveis de serem hidrolisados.

A solubilidade de um fármaco tanto na água como em outros líquidos é um fator importante na sua eficácia como agente terapêutico e para o desenvolvimento de sua formulação. A solubilidade depende da estrutura do composto e da natureza do solvente. Vários são os métodos que foram propostos para prever a solubilidade de um composto, mas nenhum é suficientemente preciso e abrangente. Em consequência, a solubilidade de um fármaco é sempre determinada por métodos experimentais. Visto que a maioria dos fármacos é administrada à temperatura ambiente (25°C) e à temperatura corporal de 37°C, geralmente, a solubilidade dos fármacos é determinada nestas temperaturas. Entretanto, a correlação entre as atividades de diversos fármacos com estruturas semelhantes e as suas solubilidades em um solvente, por exemplo, água, é geralmente

baixa. Isto indica que existem outros fatores importantes para a atividade do fármaco. (Thomas, G. 2003)

A solubilidade de um fármaco normalmente é registrada como a quantidade do soluto em um volume específico, ou numa mesma massa de solução ou de solvente. As unidades usadas comumente são:

1- *solubilidade*: o número de gramas do soluto dissolvido em 100g de solvente (% p/p). A massa (% p/p) e o volume (% v/v) do soluto em 100 cm³ de solução também são usados para registrar a solubilidade.

2- *molaridade (M)*: o número de moles dissolvidos em um litro de solução (unidades: mol L⁻¹). Deve-se notar que frequentemente a concentração é medida em mol dm⁻³.

3- *molalidade*: o número de moles dissolvidos em 1000g do solvente (unidade: mol kg⁻¹).

As medidas de solubilidade baseadas no volume de solvente ou de solução são dependentes da temperatura porque o volume aumenta com o aumento da temperatura. Em consequência, normalmente estas medidas são registradas a 25°C, a menos que seja mencionado que a medida foi realizada em outra temperatura. No entanto, as solubilidades baseadas em unidades de massa são independentes da temperatura porque a massa não se modifica com variações de temperatura.

A solubilidade de um composto depende do seu grau de solvatação no solvente. As características estruturais da molécula de um soluto melhoram o grau de solvatação e produzem um soluto mais solúvel. Ambas as solubilidades, em água e em lipídios, são importantes para

a ação de um fármaco. Entretanto, um grau razoável de solubilidade em água normalmente é considerado como uma exigência essencial para um fármaco em potencial. Geralmente, a solubilidade em água não é somente essencial para a ação de um fármaco, mas ela também favorece os testes de toxicidade, as avaliações de biodisponibilidade e a aplicação clínica. A produção de compostos com o grau desejado de solubilidade em água logo no início do desenvolvimento de um novo fármaco, pode reduzir consideravelmente o custo global do projeto, porque esta providência não causará atrasos nas etapas posteriores do trabalho.

Os grupamentos polares, tais como a hidroxila, a amina e os aldeídos, que formam pontes de hidrogênio com as moléculas de água, e os grupamentos funcionais que se ionizam na água melhoram a solubilidade de um fármaco porque estes grupamentos são mais capazes de formar hidratos com as moléculas de água. No entanto, a solubilidade em água também depende do tamanho e da natureza da cadeia de carbono-hidrogênio, bem como a presença de outros átomos nesta estrutura. Quanto maior for a razão de átomos de carbono para grupamentos polares na molécula, menor será a solubilidade do composto em água. Além disto, compostos aromáticos tendem a ser menos solúveis em água do que os correspondentes não aromáticos. Os compostos cujas estruturas não contêm grupamentos polares possuem baixa solubilidade em água. Usando estas regras gerais, é possível prever as solubilidades relativas de compostos com estruturas semelhantes. Entretanto, quanto mais complexa for uma estrutura, menos precisa será a previsão.

A solubilidade de um composto em água pode ser melhorada por meio de três métodos gerais: formação de sais; incorporação de grupamentos na estrutura que aumentem a solubilidade em água e o

uso de formulações especiais. Na formação de sais, a atividade do fármaco normalmente permanece inalterada, embora sua potência possa ser diferente. Entretanto, quando novos grupamentos estruturais são incorporados na estrutura de um fármaco, a atividade pode mudar. Em consequência, será necessário realizar um programa completo de testes para este novo composto. Ambas as modificações podem representar um processo custoso, se tiverem que ser realizadas em um estágio mais adiantado do desenvolvimento do fármaco. Geralmente, o uso de formulações especiais não requer adições extensas ao programa de testes, mas estes métodos de formulações somente são adequados para alguns fármacos.

1.3.1.Solubilidade do Megazol

O megazol tem uma característica peculiar quanto à sua solubilidade; é praticamente insolúvel nos solventes mais comumente utilizados na síntese orgânica, como éter, acetato de etila, diclorometano, álcool metílico, álcool etílico, e apresenta certa solubilidade em THF. A questão da solubilidade é um ponto crítico sobre o ponto de vista tecnológico, pois um fármaco que é insolúvel em água, álcool etílico e álcool isopropílico não é viável na Tecnologia Farmacotécnica, uma vez que são estes os solventes utilizados na manipulação industrial.

Outra característica é que fármacos pouco solúveis têm baixa biodisponibilidade, e com isso é necessário aumentar a dose, o que acarreta incidência maior de efeitos tóxicos. O fato é muito característico do megazol. O fármaco apresentou efeito farmacológico para várias doenças como Chagas, Leishimaniose, tricomonas,

amebíase; porém o fator limitante para a aplicação da droga é a solubilidade. Uma proposta interessante é o estudo dos derivados e sais de megazol, pois novos derivados podem melhorar tanto a solubilidade como o efeito terapêutico.

É de grande interesse o desenvolvimento de derivados de megazol, uma vez que este possui um grande espectro de ação (antiprotozoário, antimicrobiano, fungos), e a forma farmacêutica aplicada para cada etiologia é diferente sendo necessário diferentes derivados de megazol.

Os estudos de farmacocinética demonstram resultados peculiares para o megazol, dentre eles a velocidade de absorção que é alterada conforme o tempo de infecção do animal, isto é, animais com um tempo de infecção maior tiveram uma velocidade de absorção maior, fato este observado em primatas infectados com *Trypanosoma brucei gambiense* (Enanga et al, 2000). Nos ensaios de farmacocinética utilizaram-se modelos diferentes como ovelhas, primatas e ratos (Boda et al, 2004; Enanga et al 2000 a; Enanga et al, 2000 b; Rebello et al 2000).

A via de eliminação do megazol é preferencialmente renal, sendo que 80-96% é eliminada na forma inalterada. Observou-se a eliminação de 4 metabólitos de megazol nos primatas e nos ratos (Enanga et al, 2000 a; Enanga et al, 2000 b). Nas ovelhas percebeu-se que os níveis de megazol no fluido cérebro-espinhal correspondiam de 5,5% a 10,6% dos níveis plasmáticos (Boda et al, 2004).

Os ensaios realizados nos animais foram todos em dose única, mas elevadas 100mg/Kg (primatas); 80mg/Kg (rato); 40 a 80 mg/Kg (ovelhas). Isso se deve pela pobre biodisponibilidade do fármaco,

mas sendo efetiva para o tratamento de *Trypanossoma*; por isso alguns autores indicam o megazol para o tratamento, mas não através de via oral como rota efetiva (Boda et al, 2004).

Administrando-se em ratos, primeiramente, suramina 24 h antes da administração do megazol, conseguiu-se aumentar a velocidade de absorção ($T_{m\acute{a}x}$ 2h contra 4h), mas a quantidade absorvida foi menor. Os ratos tratados com suramina apresentaram um volume de distribuição maior (5,6 L/Kg) do que os não tratados com suramina (0,9 L/Kg). Também foi observado que a via intraperitoneal em ratos se mostrou menos biodisponível que a via oral (Enanga et al, 2000).

Com os dados obtidos até o momento pode-se afirmar que a absorção do megazol é influenciada pelo tempo de infecção, assim como a associação com suramina.

Os nitroaromáticos, em especial os nitroimidazóis (megazol) destacam-se como a classe de compostos mais ativa, no entanto os fatores que inviabiliza o seu uso são: a baixa hidrossolubilidade e a toxicidade.

Foi avaliada a ligação com outras moléculas para a formação de complexos de inclusão, com a finalidade de melhorar a solubilidade do fármaco em água. Desta forma complexou-se o megazol com ciclodextrina, e percebeu-se que o grupo nitro do megazol está dentro da cavidade da ciclodextrina e uma blindagem maior entre o H-3 e H-5 da ciclodextrina e megazol (Rebello et al, 2000).

2. OJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos:

- Otimização das etapas de alquilação e nitração da rota de síntese de megazol.
- Obtenção de sais de megazol.
- Avaliação da hidrosolubilidade dos sais de megazol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2. Otimização na síntese de megazol

3.1. Materiais

Os solventes utilizados para fins sintéticos foram: diclorometano PA; álcool metílico PA; acetona PA; acetonitrila PA; dimetilsulfóxido PA; secos e conservados com os dessecantes específicos.

Nas cromatografias de camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio de Kieselgel 60F, espessura de camada 0,2 mm (Merck) e a visualização das substâncias foi feita em lâmpada de UV (254-365 nm).

A remoção dos solventes foi realizada à pressão reduzida em evaporador rotatório.

Os reagentes utilizados foram: 1-metil-2-tioimidazol; tiosemicarbazida; ácido nítrico 69%; iodeto de etila; hidróxido de potássio 32%; ácido trifluoracético; bicarbonato de sódio; água oxigenada; cianeto de potássio.

As determinações dos pontos de fusão foram feitos em aparelho Büchi, sem correção.

A remoção parcial dos solventes foi realizada à pressão reduzida em evaporador rotatório. Em todos os casos a remoção completa dos solventes foi feita em sistema de alto vácuo, com pressão variando entre 10 a 0,1 mmHg. Todos os rendimentos foram calculados sobre os produtos puros.

Os dados de ressonância magnética nuclear unidimensional de hidrogênio (^1H RMN) e de carbono (^{13}C RMN) foram obtidos em

aparelho Bruker Advance DPX-300 (300MHz para hidrogênio e 75MHz para carbono) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

3.1.2.Métodos

O megazol pode ser obtido por diversos caminhos sintéticos, sendo que cada rota apresenta suas particularidades como: rendimento, tempo reacional, dificuldades de obtenção e utilização de diferentes reagentes.

Neste trabalho foi otimizada a rota de síntese proposta por Albuquerque em 1995 e otimizada por Moretto em 2001, sendo algumas etapas modificadas.

1º Etapa: Alquilação

1. Ativação do grupo tiol

Em um balão de fundo redondo de uma boca colocou-se 0,28 g (0,005 moles) de hidróxido de potássio que foi dissolvido em 2,5 mL de álcool metílico. Após completa solubilização do hidróxido de potássio, adicionou-se 0,57 g (0,005 moles) de 2-Mercapto-1-metilimidazol. Deixou-se por agitação por 2,5-3 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD).

Ao final, o tiol potássio foi concentrado com aquecimento (40°C) em placa aquecida. O produto intermediário é oleoso de cor vermelho cereja. Rendimento = 84%

RMN¹H (DMSO/80MHz) δ (ppm): 3,45 (s, 3H, NCH₃); 6,84-6,70 (d, 1H, H5, $j = 1,5$ Hz); 7,11-7,12 (d, 1H, H5, $j = 1,5$ Hz).

2. Alquilação do grupo tiólico

O tiol potássio produzido anteriormente foi solubilizado em pequena quantidade de álcool metílico, em seguida adicionou-se 0,8 mL (0,005 moles) de iodeto de etila. Após 3 a 5 minutos ocorre a formação de um complexo etilado com o iodeto de potássio foi indicada com um precipitado branco.

O precipitado produzido foi separado do meio por filtração. Para maior pureza lavou-o com álcool metílico. Rendimento = 59%

RMN¹H (DMSO/80MHz) δ (ppm): 1,13-1,08 (m, 2H, CH₂); 2,97-2,90 (m, 3H, CH₃); 3,70 (s, 3H, NCH₃); 7,32-7,31 (d, 1H, H₄, $j = 1,5$ Hz); 7,35-7,34 (d, 1H, H₅, $j = 1,5$ Hz).

3. Nitração do alquilado

Preparou-se uma solução de acetona de ácido nítrico 1 M em um balão de fundo redondo, e adicionou-se a solução acetona na proporção equimolar para reagir com o sal produzido anteriormente. O sal foi adicionado lentamente a solução de acetona. Um precipitado branco foi formado e a solução tornou-se amarela. Rendimento = 37,2%

A solução acetona foi filtrada e separado o precipitado.

2º Etapa: Nitração

Nitração do nitrado alquilado

O produto alquilado foi nitrado na posição 5 do anel, a temperatura de 80 a 90 °C, sob agitação, com a adição lenta de ácido nítrico 69%, deixando sob aquecimento por pelo menos 1 hora, rendimento muito baixo. (Novikov et al, 1970). A reação é esquematizada abaixo:

3º Etapa: Oxidação

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 0,5 g do produto obtido na nitração, 5 mL de ácido trifluoracético e 3 mL de H₂O₂, a solução ficou avermelhada e colocada sob agitação durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após foram adicionados mais 3 mL de H₂O₂ e colocado sob agitação e aquecimento em aproximadamente 50°C por um período de 1:30h. Obteve-se uma solução de cor amarela no final do aquecimento que logo após foi colocada em banho de gelo.

Em seguida foram realizadas três extrações com diclorometano. Acrescentou-se na fase orgânica uma solução saturada de bicarbonato de sódio. Após isso evaporou-se a fração orgânica a seco.

Foi obtido um rendimento de 42,0% (0,25g) de um sólido amarelo-claro, com ponto de fusão 92,0°C.

Análise espectroscópica:

RMN¹H (CDCl₃/80MHz) δ (ppm): 3,35 (s, 3H,SO₂CH₂CH₃); 4,29 (s, 3H, NCH₃); 7,93 (s, 1H,H4). RMN¹³C(CDCl₃/50MHz) δ (ppm): 24,38 (CH₂); 34,94 (CH₃);); 42,25 (NCH₃); 130,41 (C4); 146,43 (C2) e C5 ausente.

4º Etapa: Cianação

Em um balão de fundo redondo foram adicionadas 0,234g do produto obtido na oxidação, 0,1g de KCN e uma quantidade catalítica de éter coroa (crown 6). Em seguida foram adicionadas aproximadamente 20mL de DMSO (dimetilsulfóxido) e o meio reacional foi deixado por doze horas sob agitação, em temperatura ambiente. Após isso foi adicionada acetona. Forma-se um p.p.t.o. branco, o qual é filtrado e evaporado à seco. Em seguida adicionou-se água e foram realizadas 2 extrações com diclorometano. Então foi evaporada a solução orgânica.

Foi obtido um rendimento de mais de 100% (0,25g) de cristais em forma de agulha de cor amarelo-escuro, com ponto de fusão 74,6°C.

Análise espectroscópica:

RMN¹H (CDCl₃/80MHz) δ (ppm): 4,19 (s, 3H, NCH₃); 8,03 (s, 1H, H4). RMN¹³C(CDCl₃/50MHz) δ (ppm): 35,74 (NCH₃); 109,2 (CN); 125,0 (C2); 132,0 (C4) e C5 ausente.

5º Etapa: Ciclização

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 0,30g do 1-metil 2-ciano-5-nitroimidazol e 0,18g de tiosemicarbazida os quais foram dissolvidos em 4 mL de ácido trifluoracético. O meio reacional foi aquecido a 60 °C por aproximadamente doze horas sob refluxo. Terminado este período resfriou-se o meio em banho de gelo e realizou-se o acerto de pH para 7-8 com a adição de hidróxido de amônio. Neste momento ocorreu a precipitação de 0,27 g (rendimento de 60%) de um sólido amarelo que foi lavado com água e filtrado a vácuo, com ponto de fusão de 270°C.

Análise espectroscópica:

RMN1H (DMSO/300MHz) δ (ppm): 4,35 (s, 3H, NCH₃); 7,8 (b, 2H, NH₂); 8,2 (s, 1H, H₄).

RMN13C(DMSO/75MHz) δ (ppm): 35,0 (NCH₃); 133,1 (C₄); 140,1 (C₅); 141,4 (C₂); 148,2 (C₂^{*}); 169,9 (C₅^{*}).

3.2. Solubilidade do fármaco:**3.2.1. Obtenção dos sais do megazol:**

Em um tubo de ensaio colocou-se 5,0 mg de megazol previamente pesado. Adicionou 3,0mL de tetrahidrofurano para solubilizar o megazol, em seguida adicionou o ácido orgânico (oxálico, maléico, tartárico, cítrico, ftálico) previamente pesado. Na quantidade equimolar calculada o meio foi lentamente a 40°C para facilitar a reação. Permaneceu em repouso por alguns minutos para a evaporação do solvente e com isso facilitar a precipitação do sal. O tubo de ensaio foi resfriado e deixado durante uma noite para favorecer a precipitação do sal. O solvente foi evaporado a temperatura ambiente e se observou visualmente se houve a formação de cristais.

3.2.2. Procedimento dos ensaios de solubilidade:

A solubilidade indicada não deve ser tomada no sentido estrito de constante física, mas como simples informação. As indicações sobre solubilidade referem-se às determinações feitas à temperatura de 25 C. A não ser que a monografia especifique diferente, a expressão solvente refere-se à água.

A expressão partes refere-se à dissolução de 1 g de um sólido ou 1 ml de um líquido no número de mililitros do solvente estabelecido no número de partes.

As solubilidades aproximadas constantes nas monografias são designadas por termo descritivo (tabela 1) (Farmacopéia Brasileira, 4ª Ed, 1988).

Tabela 1: Cálculos das quantidades de reagentes empregados para obtenção dos sais de megazol.

Reagente	Peso Molecular (g/moles)	Massa utilizada (mg)	Número de moles
Megazol	226	5	$2,21 \cdot 10^{-5}$
Ácido maleíco	116	2,6	$2,21 \cdot 10^{-5}$
Ácido oxálico diidratado	96	2,1	$2,21 \cdot 10^{-5}$
Ácido tartárico	150	3,32	$2,21 \cdot 10^{-5}$
Ácido cítrico	192	4,24	$2,21 \cdot 10^{-5}$
Ácido ftálico	167	3,70	$2,21 \cdot 10^{-5}$

Tabela 2: Classificação do perfil de solubilidade de um composto (Farmacopéia Brasileira, 4ª ed, 1988).

Observação	Resultado
Muito solúvel	menos de 1 parte
Facilmente solúvel	de 1 a 10 partes
Solúvel	de 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	de 30 a 100 partes
Pouco solúvel	de 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	de 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	mais de 10000 partes

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização das etapas de síntese do megazol:

A rota de síntese para obtenção do Megazol foi estudada por Albuquerque e sua formulação inicial está embasada na literatura específica para reações de anéis imidazólicos. (Kister et al, Lucchesse et al, Twein et al, 1973; Miller et al, 1970; Parina et al 1977; Marckwald, 1892)

4.1.1 Tautômeria do anel imidazólico

Na primeira etapa da síntese foi utilizada como matéria-prima o (2-Mercapto-1-metilimidazol) que é submetido a um processo de ativação com a remoção do próton como mostrado na figura 18. O (2-Mercapto-1-metilimidazol) tem a característica de formar uma mistura tautomérica a temperaturas elevadas (140°C), quando sofre um rearranjo que favorece a hidrólise levando a sua degradação (Jacky et al, 2000). A tautômeria não favorece as reações nucleofílicas, pois o par de elétrons do enxofre não se encontra disponível como no grupo sulfidrílico. Este fato é importante para a definição das condições operacionais da alquilação, pois a alquilação direta com iodetos de alquila ocorre a altas temperaturas.

Figura 18: Tautômeria do composto 2-Mercapto-1-metilimidazol

A tautomeria pode ser observada no RMN H^1 do 2-Mercapto-1-metilimidazol, no anexo, e observa (explicação do RMN), e com isto comprovou que a matéria-prima de partida estava pura.

4.1.2 Ativação do grupo tiol

Para contornar a tautômeria partiu-se para a remoção do próton do grupo sulfidríla. Dessa forma seria impedido o rearranjo do próton que causa o efeito de tautomeria

A ativação do grupo tiólico foi realizada pela adição de solução metanólica de potassa. Esta fez com que a tautômeria fosse interrompida conforme mostra a figura 19.

Figura 19: Reação de ativação do (2-Mercapto-1-metilimidazol)

Para a remoção do próton do grupo sulfidríla pode-se utilizar uma solução metanólica de potassa ou uma solução metanólica de soda, que atuará como catalisador, mas o uso de substâncias catalisadoras é opcional uma vez que, na literatura, encontram-se reações a

temperaturas elevadas onde não se utiliza catalisador (Jacky et al, 2000).

Há uma preferência pelo uso de solução metanólica de potassa ao invés de soda uma vez que os sais de potássio são geralmente menos solúveis do que os sais de sódio. O catalisador tem a função básica de remover o hidrogênio ácido do tiol, deixando dessa forma a molécula mais reativa, isto é, reage mais facilmente com uma molécula eletrofílica.

A ativação do grupo tiol com a solução metanólica de potassa produziu um líquido de cor lilás para vermelho cereja altamente viscoso. O RMN é mostrado no anexo.

Optou-se por utilizar o álcool metílico, como solvente, por solubilizar em pequena quantidade o hidróxido de potássio e o tiol, e por ter um baixo ponto de ebulição sendo facilmente removido. Os sais inorgânicos têm menor solubilidade no álcool etílico, além de ter um ponto de ebulição maior, e o álcool isopropílico é o que possibilita menor solubilidade dos sais inorgânicos e tem o maior ponto de ebulição. Vale lembrar que a quantidade de catalisador utilizado precisa ser equimolar com aquela de tiol, uma vez que o excesso poderá interferir na próxima etapa, como explicado adiante.

Bases mais fracas, como o bicarbonato de sódio e o carbonato de sódio, não tiveram um resultado satisfatório como dos hidróxidos de sódio e potássio para a remoção do próton.

A reação a temperatura reduzida (entre 0 e 5°C) ocorre melhor uma vez, que é uma reação ácido/base e é exotérmica. Porém, observou-se que a temperatura ambiente a reação também ocorre, precisando um tempo maior.

Após a ativação do tiol com o hidróxido de potássio formando o tiol potássio, este foi solubilizado em pequena quantidade de álcool metílico, pois foi constatado que o tiol potássio é insolúvel em iodeto de etila, formando uma mistura bifásica. Por isso utilizou-se um álcool de polaridade intermediária para a homogeneização da mistura, formando uma solução.

4.1.3 Alquilação do grupo tiólico

A reação de alquilação do 2-mercaptoimidazol com um haleto de alquila é uma reação conhecida na síntese de anéis imidazólicos (Kister et al, Lucchesse et al, Twein et al, 1973; Miller et al, 1970; Parina et al 1977; Marckwald, 1892). A diferença entre eles está nas condições experimentais, sendo os métodos mais antigos por aquecimento e os mais atuais por resfriamento.

A alquilação do grupo tiólico ocorre com um agente alquilante de halogênio, como iodeto de metila, iodeto de etila, brometo de metila, brometo de etila. Pela disponibilidade de reagente optou-se pelo iodeto de etila. As reações de alquilação sem a ativação do grupo tiol ocorrem a temperaturas elevadas, são mais longas (6 a 8 horas). Porém alguns autores descrevem a mesma reação em condições exotérmicas à baixa temperatura (gelo) com tempo da reação de 10 a 30 minutos, havendo vantagem de evitar a formação da tautomeria. Porém não se conseguiu reproduzir essa reação em laboratório. O grupo tiol ativado é muito reativo ao grupo alquila, sendo que a reação ocorre em menos de 5 minutos, com uma rápida formação de precipitado branco.

Vale lembrar que o tiol potássio formado é polar e imiscível no iodeto de etila, sendo necessário à utilização de um solvente. O solvente novamente escolhido foi o metanol pelas mesmas características apontadas anteriormente. A reação deu-se em cerca de 10 segundos, com iniciou da formação do precipitado.

A reação de alquilação é descrita na figura 20.

Figura 20: Reação de alquilação.

Há vantagens na ativação do grupo tiol principalmente quanto ao tempo de reação, pois na alquilação com aquecimento, com reação direta do iodeto de alquila com o 2-Mercapto-1-metilimidazol, a reação chega a durar 18 horas, conforme mostrado na figura 21.

Figura 21: Reação de alquilação sem catalisador.

Já na reação com a ativação do grupo tiol acompanhada da alquilação constatou-se um tempo máximo de 3 horas. Além do tempo há o fator que não é necessário aquecer o meio reacional a temperaturas de 60 a 90°C.

O solvente geralmente utilizado na alquilação a quente é o álcool isopropílico, que é difícil de ser removido, pois se espera a formação do complexo de iodo que irá precipitar, porém essa precipitação é parcial, o que dificulta a obtenção de rendimento. Além de oferecer dificuldade para a precipitação do produto, o álcool isopropílico possui um alto ponto de ebulição e baixa pressão de vapor o que dificulta a evaporação, mesmo a pressão reduzida.

O metanol apresentou uma grande vantagem sobre o álcool isopropílico porque possui um baixo ponto de ebulição (64,7°C), o que promoveu a sua fácil remoção e a completa obtenção do precipitado, que teve uma parte perdida no solvente como no caso do álcool isopropílico.

Um fator interessante é a padronização do uso de um único solvente para as duas etapas (ativação e alquilação), já que é necessário um solvente com polaridade intermediária para misturar o tiol potássio com o haleto de alquila, ou seja, em escala industrial após a ativação do tiol basta apenas adicionar o haleto de alquila e filtrar o precipitado. Pode-se também aumentar o rendimento da reação com a remoção e recuperação do solvente, por aquecimento, que poderá ser utilizado em outras reações.

Observou-se, com a ativação do tiol, a eliminação das reações paralelas, como a alquilação no nitrogênio 1. Na literatura (Baker, 1958) observou que o anel imidazólico pode ser alquilado tanto na

posição do enxofre como do nitrogênio. Em reações a altas temperaturas há maior probabilidade de ocorrer além da alquilação no enxofre, também a alquilação no nitrogênio, com isso ter-se-á a formação de isômeros.

As reações de ativação e alquilação precisam ocorrer separadas, porque os hidróxidos de sódio ou potássio em contato com o haleto de alquila reagem direto com este formando o sal de iodeto (NaI ou KI) e o correspondente álcool (metílico, etílico ou propílico). No caso do bicarbonato de sódio, por ser uma base mais fraca não reagiu com o haleto de alquila, porém também não apresenta força suficiente para a remoção do hidrogênio ácido do grupo tiol. Outro catalisador que se tentou utilizar foi o hidróxido de amônio. O hidróxido de amônio foi adicionado lentamente à solução, em acetonitrila de tiol e iodeto de etila, e formou um precipitado amarelo claro que corresponde ao etilado de amônio, como pode ser observado no espectro RMN H^1 no anexo.

O alquilado puro foi sintetizado à temperatura elevada (80-90°C) fazendo uma adaptação da Catálise por Transferência de Fase, ao final foi realizado o RMN H^1 que se encontra no anexo 2.

O método de Parina (Parina et al, 1977) foi utilizado com aquecimento a 60°C por seis horas ou mais, dando um rendimento de 96 %. Nesta reação ocorre sem a presença de catalisador, porém pode levar até 18 horas ou mais.

Vale lembrar que o anel imidazólico tem a característica de se complexar com vários elementos entre os quais os halogênios. O motivo pelo qual o alquilado deve-se encontrar na forma de sal, após o término da reação, e não de uma base livre. Por estar na forma de

sal é altamente solúvel em solventes polares (álcool, água). E é este o motivo que se encontram artigos que utilizam a Catálise de Transferência de Fase (CTF) como opção para evitar que o íon halogênio se complexe no anel imidazólico como é mostrado na Figura 22.

Figura 22: Mecanismo de reação interfacial de Makosza para CTF-LL em presença de hidróxido (Lucchese et al, 2000).

Observa-se na CTF que na interface há a ativação do R-H com adição de um catalisador (NaOH), em seguida a molécula é transferida para a fase orgânica onde é alquilada (QR). O proposto foi realizar as duas etapas em seqüência, uma vez que a CTF não apresenta ser viável em *scale-up*, pois ocorre apenas na superfície de interface. O mecanismo sugerido é realizar a reação da interface numa primeira etapa e a reação da fase orgânica numa segunda etapa. Sendo o processo o seguinte.

A primeira etapa para a síntese do Megazol ocorre com a alquilação do grupo sulfidril do anel imidazólico com um haleto de alquila (iodeto de metila, iodeto de etila brometo de etila), à temperatura elevada (80 a 90°C) ou à baixa temperatura (0 a -10°C). A reação de

alquilação processa-se à baixa temperatura, sob agitação, com a adição de hidróxido de potássio (David et al, 1967).

A alquilação é descrita pela catálise por transferência de fase, onde se tem uma solução de hidróxido quaternário em uma fase e na solução orgânica o agente alquilante. No final da reação a fase orgânica contém o produto alquilado, que é separado por rotaevaporação ou evaporação à temperatura ambiente. Na catalise por transferência de fase se utiliza geralmente um sistema bifásico o brometo de tetrabutilamônio à concentração de 4% de mol por mol de substrato. CTF há a formação de ânions $N-C-O^-$ e $N-C-S^-$. A catálise de transferência de fase é um método utilizado para provocar ou acelerar a reação entre substâncias que estão dissolvidas em ou que constituem fases diferentes, pela ação de um agente transferidor (Lucchesse et al, 2000). Este agente ou catalisador forma um par iônico com a espécie química da fase aquosa ou sólida, que dessa forma é extraída para a fase orgânica, reagindo com o substrato ali presente.

O mecanismo de CTF para ácidos fracos foi sugerido para Makosza, que propôs um mecanismo interfacial. Neste caso, a desprotonação da molécula da fase orgânica pela hidroxila ocorreria próxima a interface, e a função principal do catalisador seria a de transferir o carbânion formado da região interfacial para o meio orgânico.

A utilização da piridina para complexar com o iodo levou a complexação do iodo com o anel imidazólico, o que não apresentou vantagem tecnológica, pois não foi possível romper o complexo piridina-iodo-anel imidazólico.

4.1.4 Pré-Nitração do alquilado

Após a alquilação o anel imidazólico apresentou-se complexado com o halogênio, foi removido com a adição de uma solução acetona e ácido nítrico 1M. O alquilado foi solubilizado em acetona. Observou-se com a adição da solução de acetona que houve a rápida turvação amarelo claro do meio acompanhada da formação de um precipitado branco. O iodeto de potássio permaneceu no meio, enquanto o alquilado nitrado precipitou. (Figura 23)

Figura 23: Nitração do alquilado

4.1.5 Nitração do nitrado alquilado

Para realização da sequência de processos a rota de síntese do megazol, antes de ensaiarmos os experimentos foi utilizado um programa de computador para modelagem molecular (Spartan), visando avaliar qual seria a distribuição eletrônica da molécula e se a nitração, na posição 5 do anel imidazólico, seria favorecida ou não.

Pelos cálculos realizados no Spartan, constatou-se uma maior facilidade da nitração ocorrer na posição 5, por esta possuir o menor valor de carga em toda a molécula (-0.285566). Com a saturação na

posição 5, o íon nitrônio reagirá na posição 4. Por essa característica a reação precisa ser controlada para não ter um produto dinitrado ao final, como constatado nos trabalhos de Novikov sobre nitração de imidazóis.

O produto nitrado tem a característica de ser de difícil extração, por ser insolúvel, tanto em solventes orgânicos como inorgânicos, por isso a solução é rotaevaporada, separa-se a camada de óleo formada e lava-se esta com água gelada e clorofórmio (Figura 24).

Figura 24: Nitração do nitrado alquilado

4.1.6 Oxidação do 1-metil2-etila-5-nitroimidazol

Este processo não foi modificado, sendo as condições experimentais já estudadas em outro trabalho (Moretto, 2001). Como agente de oxidação empregou-se o peróxido de hidrogênio 30%, com um rendimento de 42%.

4.1.7 Cianação a partir da substituição do sulfona

Este processo foi semelhante aos já apresentados em outros trabalhos do grupo. Utilizou-se cianeto de potássio em presença de éter coroa em DMSO, com um rendimento de 100%.

4.1.8 Ciclização

Este processo de ciclização é bastante clássico e já foi definido em trabalhos anteriores: A partir do anel aromático nitrado com um grupamento ciano na posição 2, processa-se a ciclização pela ação da tiosemicarbazina em presença de ácido trifluoracético, sendo o rendimento em torno de 60%.

4.2. Solubilidade dos sais de megazol

Foram escolhidos alguns ácidos orgânicos empregados para facilitar a solubilidade de fármacos. A seguir descrevem-se os resultados preliminares obtidos.

4.2.1 Obtenção dos sais

Ácido maleíco: houve a formação de uma leve turvação ao contato com a solução. A precipitação aumentou com o resfriamento por uma noite que a solução passou no freezer. Após a evaporação do solvente houve o depósito de um cristal pastoso amarelo canário com pontos escuros, depois de seco o precipitado foi amarelo-bege. Rendimento = traços.

Ácido cítrico: em contato com a solução iniciou-se a formação de pontos de cristais lentamente. Apenas depois de refrigerado por uma noite, observou-se nitidamente a formação do precipitado. Depois de evaporado o solvente percebeu-se a formação de cristais na forma de agulha. Rendimento = traços.

Ácido oxálico: ao ser adicionada a solução formou uma turvação imediata no meio e posterior precipitação, sendo amorfo o precipitado. Após evaporação do solvente houve depósito de pequenos pontos de sal na parede do tubo. O precipitado final era um pó branco. Rendimento = traços.

Ácido tartárico: ao ser adicionado à solução, formou-se turvação no meio com posterior precipitação de material amorfo. Após a evaporação do solvente houve a formação de um cristal filamentosos de cor amarela escuro. Rendimento = traços.

Ácido ftálico: ao ser adicionado à solução não se observou nenhuma alteração no meio. Depois de resfriado não houve formação de precipitado. Somente durante a evaporação do solvente percebeu-se a formação de minúsculos cristais na solução. O precipitado final foi um pó branco com filamentos amarelos. Rendimento = traços.

Para análise da obtenção dos referidos sais foi realizada a cromatografia em camada delgada com placa de sílica, empregando acetato de etila como eluente, o megazol foi utilizado como referência do material de partida.

Como as quantidades dos sais foram muito pequenas não foi possível realizar a caracterização espectroscópica necessária nem a caracterização da solubilidade destes frente ao ensaio farmacopéico.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foi possível definir novas e melhores condições operacionais para as etapas de alquilação e nitração do processo de síntese do megazol. Sendo importante tanto uma ativação do grupo tiol, pelo uso de uma base forte, bem como uma pré-nitração do produto alquilado, antes da nitração. Estas condições asseguram não só um aumento do rendimento deste processo, como definem operações simples para um posterior estudo de scale-up. A reação de nitração precisa ser mais bem avaliada através da variação dos parâmetros reacionais (tempo, temperatura, solvente, concentração de ácido nítrico), sendo que as próximas etapas não foram modificadas, pois já apresentam rendimentos e condições operacionais satisfatórias.

Com relação à obtenção e ao estudo da solubilidade dos sais de megazol, podemos indicar a facilidade no processo de obtenção destes, pois a metodologia empregada é bastante simples. No entanto, como a matéria prima para obtê-los é o megazol só tivemos quantidade suficiente deste para realizar testes iniciais. Logo, os rendimentos obtidos não foram suficientes para uma identificação espectroscópica nem para os ensaios farmacopéicos de solubilidade.

Em estudos posteriores será ampliada a quantidade de megazol através dos processos otimizados e a partir deste serão obtidos os sais para uma análise mais eficiente. Ressaltamos a importância da obtenção de sais mais hidrossolúveis de megazol para facilitar uma posterior formulação deste fármaco e estudo de sua biodisponibilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, C.N. de, PERIE, J.J. Nova rota de síntese do megazol (1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazol)-5-nitroimidazol), um antiparasitário ativo contra o *Trypanosoma cruzi* **Rev. RBCF.** Janeiro/junho, p.57-63, 1999.
- ALBUQUERQUE, C.N. **Synthèse et études physico-chimiques d'analogues du megazol, anti-parasitaire du type nitroimidazole; étude de leur mode d'action.** Toulouse, 1995. 207p. Thèse de Doctorat – Université Paul Sabatier.
- ALBRIGHT, J.D. SHEPHERD, R.G. Reactions of 1,2-dimethyl-5-nitroimidazole, novel methods of conversion of the 2-methyl group to a nitrile. **J. Heterocycl. Chem.** Provo, v.10, p.899-907, 1973.
- AMARO, C.R.S. **Proposição de nova rota de síntese do Megazol.** São Paulo, 2003. 57p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- ASATO, G.; BERKELHAMMER, G. Nitroheterocyclic antimicrobial agents: 1-methyl-2-nitro-5-imidazolyl derivatives. **J. Méd. Chem.,** Columbus, v.15, n.10, p.1086-1088, 1972.
- BERKELHAMMER, G.; ASATO, G. 2-amino-5(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole: a new antimicrobial agent. **Science,** Washington, v.162, p. 1146-1968.
- BAKER, J.A. The Mechanism of N-Acylation of 2-Mercaptoglyoxalines. p.2387, 1958.
- BLUMENSTIEL, K., SCHONECK, R., YARDLEY, V., CROFT, S.L., KRAUTH-SIEGEL, R.L. **Biochem. Pharmacol.** v.58, p.1791-1799, 1999.
- BODA, C., ENANGA, B., DUMET, H., CHAUVIERE, G., LABROUSSE, F., CONQUET, C., SALVIN, S., HOUDIN, G., PERIE, J., DUMAS, M., BOUTELLIE, B. Plasma Kinetics and efficacy of oral megazol treatment in *Trypanosoma brucei brucei*-infected sheep. **Vet Parasitol.** v.121 (3-4): p.213-23, 2004.
- CENAS, N., BIRONAITÉ, D., DICKANCAITE, E., ANUSEVICIUS, Z., SARLAUSKAS, J., BLANCHARD, J.S. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.204, p.224-229, 1994.

- CLARK, D., ALBRECHT, M., AREVALO, J. Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.66, p.143-145, 1994.
- DORMEYER, M., RECKENFELDERBAUMER, N., LUDEMANN, H., RAUTH-SIEGEL, R.L. Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. **J. Biol. Chem.** v.276, p.10602-10606, 2001.
- ENANGA, B., BOUDRA, H., CHAUVIERE, G., LABAT, C., BOUTEILLE, B., DUMAS, M., HOUIN, G. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol, a new potent trypanocidal drug in animals. **Arzneim-Forsch.** v.49, p. 441-447, 1999.
- ENANGA, B., NDOMA, J.M., BOUDRA, H., DEBRAUWER, L., DOBREUIL, G., BOUTELLIE, B., CHAUVIERE, G., LABAT, C., DUMAS, M., PERIE, J. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol in a *Trypanosoma brucei* gambiense primate model of human African trypanosomiasis. Preliminary study. **Arzneimittelforschung.** V.50 (2), p. 158-62, 2000.
- FAIRLAMB, A.H., BLACHBURN, P., ULRICH, P., CHAIT, B.T., CERAMI, A. **Science.** v.227, p.1485-1487, 1984.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA, QUARTA EDIÇÃO, 1988.
- FRASER-L'HOSTIS, C., DEFRISE-QUERTAIN, F., CORAL, D., DESHUSSES, J. Regulation of the intracellular pH in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*. **Biol. Chem.** v.378, p.1039-1046, 1997.
- GILBERT, H.F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. Adv. Enzymol. Relat. Areas. **Mol. Biol.** v.63, p.69-172, 1990.
- HENDERSON, G.B. ULRICH, P., FAIRLAMB, A.H., ROSENBERG, I., PEREIRA, M., SELA, M., CERAMI, A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA:** v.85, p.5374-5378, 1988.
- IRSCH, T., KRAUTH-SIEGEL, R., L. **J. Biol. Chem.** v.279, p.22209-22217, 2004.
- JOCKERS- SCHERUBL, M.C., SCHIRMER, R.H., KRAUTH-SIEGEL, R.L. **Eur. J. Biochem.** v.180, p.267-272, 1989.

- KISTER, J., ASSEF, G., MILLE, G., METZGER, J.. Synthese et etude du rearrangement $SR \leftrightarrow NR$ des diazoles – 1,3: alkyl-1 alkylthio-2 (allylthio, arylthio, cycloalkylthio) imidazoles. Partie I. Synthese et etudes physicochimiques. *Can. J. Chem.*. v.57, p.813-821, 1979.
- LEGARE, D., PAPADOPOULOU, B., ROY, G., MUKHOPADHYAY, R., HAIMEUR, A., DEY, S., GRONDIN, K., BROCHU, C., ROSEN, B.P., OUELLETTE, M. Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite-resistant leishmania. **Exp. Parasitol.** v.87, p.275-282, 1997
- LEGROS, D., OLLIVIER, G., GASTELLU-ETCHEGORRY, M., PAQUET, C., BURRI, C., JANNIN, J., BUSCHER, P. Treatment of human African trypanosomiasis – present situation and needs for research and development. **The Lancet.** Infectious Diseses. v. 2, 2002
- LUCCHESI, A. M., MARZORATI, L. Catálise de transferência de fase. **Química Nova**, v.23(5) (2000), p 641-652.
- LUISE, R.H.S., MEIERING, S.K., SCHMIDT, H. The Parasite-Specific Trypanothione Metabolism of Trypanosoma and Leishmania. **Biol. Chem.**, v.384, p.539-549, 2003.
- MARCKWALD. **BER.**, v.25, p.2354, 1892.
- MAX W. MILLER, HAROLD L. HOWES, JR., ROBERT V. KASUBICK, AND ARTHUR R. Alkylation of 2-Methyl-5-nitroimidazole. Some Potent Antiprotozoal Agents. **Journal of Medicinal Chemistry.** v.13, n5, 849, 1970.
- MORETTO, S. A. G. **Otimização da rota de síntese do megazol, potencial anti-chagásico.** São Paulo, 2001. 86p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- NOGOCEKE, E., GOMMEL, D. U., KIEB, M., KALISZ, H. M., FLOHÉ, L. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. **Biol. Chem.** v.378, p.817-836, 1997.
- NOVAES, K.T.F. **Síntese de derivados do megazol, com potencial atividade tripanosomicida.** São Paulo, 2005. 73p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

- NOVIKOV, S. S.; KHMEL'NITSKII, L. I.; LEBEDEV, O. V.; SEVOSTYANOVA, V. V.; EPISHINA, L. V. Nitration of imidazoles by various nitrating agents. *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii*, v. 4, p. 503-7, 1970
- QUELLETTE, M., HETTEMA, E., WUST, D., FASE-FOWLER, F., BORST, P. Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant leishmania. **EMBO J.** v.10, p.1009-1016, 1991.
- PARINA HASSANALY, HENRI J. M. DOU, JACQUES METZGER. S-Alkylation of 2-Thioxo-2,3-dihydroimidazole and its 1-methyl derivative under Phase-Transfer Conditions. **Synthesis**. p253-254, 1977.
- REBELLO, F.R., SILVA, E.F. DA, Investigação por DSC, RMN 1 H e IV da formação de complexos de inclusão entre o modelo de megazol e a beta-ciclodextrina.
- REMERS, W.A.; GIBBS, G. J.; WEISS, M. J. Preparation of halomethyl-1,3,4-thiadiazole, conversion to 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4- thiadiazole, an important antimicrobial agent. **J. Heterocycl. Chem.**, Provo, v.6, p.835-40, 1969.
- ROBERT C. TWEIT, E. M. KREIDER, AND R. D. MUIR. Synthesis of Antimicrobial Nitroimidazolyl 2-Sulfides,-Sulfoxides, and -Sulfonas. **Journal of Medicinal Chemistry**. Vol 16, n10, pag 1161, 1973.
- SALMON-CHEMIN, L., BUISINE, E., YARDLEY, V., KOHLER, S., DEBREU, M.A., LANDRY, V., SERGHERAERT, C., CROFT, S.L., KRAUTH-SIEGEL, R.L., DAVIOUD-CHARVET, E. **J. Med. Chem.** v.44, p.548-565, 2001.
- SCHMIDT, H., KRAUTH-SIEGEL, R.L. **J. Biol. Chem.** v.278, p.46329-46336, 2003.
- SHAHI, S. K., KRAUTH-SIEGEL, R.L., CLAYTON, C.E. Over-expression of the putative thiol conjugate transporter TbMR-PA causes melarsoprol resistance in Trypanosoma brucei. **Mol. Microbiol.** v.43, p. 1129-1138, 2002.
- STEENKAMP, D. J., WELDRICK, D. P., SPIES, H. S. C. Studies on the biosynthesis of ovothiol A. Identification of 4-mercaptohistidine as an intermediate. **Eur. J. Biochem.** v.242, p.557-566, 1996.

THOMAS, G. "QUÍMICA MEDICINAL UMA INTRODUÇÃO". GUANABARA KOOGAN, RIO DE JANEIRO, 2003, 413 P.

THOMSON, L., DENICOLA, A., RADI, R., **Arch. Biochem. Biophys.** v.412, p.55-64, 2003

TRUJILLO, M., BUDDE, H., PINEYRO, M.D., STEHR, M., ROBELLO, C., FLOHÉ, L., RADI, R. **J. Biol. Chem.** v.279, p.34175-34182, 2004.

WILKINSON, S. R., MEYER, D. J., TAYLOR, M. C., BROMLEY, E. V., MILES, M. A., KELLY, J.M. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **J. Biol. Chem.** v.277, p.17062-17071, 2002.

WILKINSON, S.R., TAYLOR, M. C., TOUITHA, S., MAURICIO, I. L., MEYER, D. J., KELLY, J.M. TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxidases, is localized to the endoplasmic reticulum. **Biochem. J.** v.364, p.787-794, 2002.