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

Síntese de derivados do megazol, com potencial atividade
tripanosomicida

Karla Teixeira Farias de Novaes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Cristina N. de Albuquerque

São Paulo
2005

18.295

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011265

Ficha Catalográfica

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

Novaes, Karla Teixeira Farias de
N935s Síntese de derivados do megazol, com potencial atividade
 tripanosomicida / Karla Teixeira Farias de Novaes. -- São
 Paulo, 2005.
 73p.

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

1. Fármaco : Síntese : Química farmacêutica 2. Doença
de chagas I. T. II. Albuquerque, Cristina Northfleet de,
orientador.

615.19015 CDD

Karla Teixeira Farias de Novaes

Síntese de derivados do megazol, com potencial atividade
tripanosomicida

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque
orientadora/presidente

Bronislaw Polakiewicz

Claudete Justina Valduga

São Paulo, 17 de Outubro de 2005.

Dedico esta tese aos meus pais *Almir e Cedivan*, alicerce da minha vida, que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos meus irmãos *Almir e Dayane*, por serem meus companheiros na caminhada da vida e morarem no meu coração.

E a *Deus* por ser tão generoso comigo, me brindando com essas pessoas maravilhosas e com oportunidades valiosas, sempre iluminando o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Prof^a. Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque**, por me admitir em seu laboratório e ter contribuído por tornar possível a realização de um sonho, colaborando para o meu amadurecimento científico e intelectual, além de sua importante orientação na conclusão desta tese.

Ao **Prof^o. Dr. Renato Arruda Mortara** do Laboratório de Parasitologia da Escola Paulista de Medicina que gentilmente me acolheu em seu laboratório para a realização dos ensaios biológicos enriquecendo o meu projeto.

À **Solange da Silva Hernandes** do Laboratório de Parasitologia da Escola Paulista de Medicina por todos os experimentos realizados e pela orientação dos ensaios biológicos.

À **Carla Aparecida Pedriali** minha querida amiga, o qual agradeço muito pela convivência agradável e ajuda incondicional no desenvolvimento desta tese e principalmente pela sua amizade.

Aos amigos **Renata P. Borges e André Luis da S. Novaes**, que contribuíram com esta tese, não só no aspecto prático, mas também com gestos de carinho, palavras de incentivo nos momentos difíceis e com a amizade verdadeira.

Ao **Prof^o. Dr. Bronislaw Polakiewicz**, pelas vezes que utilizei as instalações do laboratório pelo qual é responsável, além das valiosas sugestões dadas na banca de qualificação.

À *Profª. Dra. Veni Maria A. Felli* do Departamento de Farmácia da USP, pela participação na banca de qualificação.

Ao *Profº. Dr. Orlando Zancanaro Junior*, pela colaboração na aquisição dos reagentes.

Agradeço ao nosso grupo de trabalho: *Hélio, Fabrício, Marcelo e Paula* pela amizade e prosseguimento das pesquisas científicas do laboratório.

Agradeço também ao amigo *José Paulo* do laboratório de Engenharia Química da USP pela colaboração na confecção dos gráficos.

À secretaria do Departamento *Miriam, Elza, Juarez, Jorge, Elaine e Majô* pela paciência e boa vontade com que tratam os alunos e fornecem as informações necessárias.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp)*, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Finalmente, a todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram neste trabalho.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida
passar;
é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se
fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em
casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade
viver...”

Martin Luther King

“O único modo de evitar erros, é adquirindo experiência; mas a única maneira de
adquirir experiência é cometendo erros.”

Autor desconhecido

RESUMO

NOVAES, K.T.F. **Síntese de derivados do megazol, com potencial atividade tripanosomicida**. 2005. 73f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

Este projeto visa à obtenção do megazol e de seus derivados, que possam ser comparados quanto a sua atividade biológica, no intuito de produzir um análogo mais potente e menos tóxico. O megazol, estrutura de interesse do trabalho proposto, foi sintetizado inicialmente em 1968 por Asato e Berkelhammer utilizando o 5-nitroimidazol como material de partida. Nos anos 80, pesquisadores brasileiros da Fundação Instituto Oswaldo Cruz e do Centro René Rachou, devido a grande incidência da doença de Chagas no Brasil, relacionaram um grande número de substâncias químicas até então indicadas como ativas contra o *Trypanosoma cruzi*. Dentre estas substâncias, o megazol foi o que apresentou um grande interesse, pois em testes “*in vivo*” em ratos mostrou um efeito curativo significativo, em dose única. A partir daí, estudos desta molécula e análogos tornaram-se imprescindíveis, no intuito de determinar o mecanismo de ação desta estrutura e seus potenciais efeitos tóxicos. A rota de síntese utilizada como enfoque foi a descrita por Albuquerque em 1995 e otimizada por Moretto em 2001. No presente trabalho, obtiveram-se seis derivados do megazol a partir da modificação da função amina ligada ao anel 1,3,4 tiadiazólico. Uma destas modificações foi realizada pela sua reação com cloretos ou anidridos de ácidos, outra foi a partir da diazotação e substituição pelo átomo de cloro, e a substituição do cloro pelo metoxi. Os derivados obtidos foram testados em culturas de células Vero infectadas com *Trypanosoma cruzi* e analisados em relação ao índice de infecção do parasita. Até o presente momento três compostos mostraram-se tão ativos quanto ao megazol. Os dados obtidos serão empregados para ampliar não só o estudo de novos fármacos anti-chagásicos, mas também para uma melhor compreensão dos processos químicos envolvidos na síntese de intermediários do tipo 5-nitroimidazóis.

Palavras-chave: megazol, 5-nitroimidazol, rota de síntese, atividade biológica.

ABSTRACT

NOVAES, K.T.F. **Synthesis of megazol derivatives, with potential trypanocidal activity.** 2005. 73f. Dissertação of mestrado - College of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo. 2005.

This project aims the synthesis of megazol and some derivatives, with more powerful and better biological activity. Megazol, the chemical structure of interest in this work, was synthesized initially in 1968 for Asato and Berkelhammer using 5-nitroimidazol as a starting material. In years 80, Brazilian researchers of the Oswaldo Cruz Institute Foundation and René Rachou Center, had related a great number of chemical substances active against the *Trypanosoma cruzi*, illness very common in Brazil. One of these substances, the megazol, presented a great interest, as the tests "*in vivo*" in rats showed significant curative effect, in only one dose. As a result of this biological test, more accurate studies of the analogous molecules had become essential, in intention to determine the mechanism of action of this structure and its potential toxic effect. The synthesis route was that described by Albuquerque in 1995, and optimized by Moretto in 2001. In the present work, six derivatives of megazol resulted from the chemical modification from the amine of 1,3,4 thiadiazolic ring. One of these modifications was made by the reaction with anhydrides, chlorides or acids; another one was from the diazotation and substitution by the chlorine atom, and the substitution of chlorine by the methoxy group. The gotten derivatives had been tested in cultures of Vero cells infected with *Trypanosoma cruzi* and analyzed in relation to the parasite infection index. Until now three compounds presented a higher activity than megazol. The gotten data will be used not only for extend the study of new drugs against the *Trypanosoma cruzi*, but also for better understanding of the involved chemical processes in the 5-nitroimidazoles intermediate synthesis.

Key-words: megazol, 5-nitroimidazol, route of synthesis, biological activity.

Tabela I	Resumo das modificações dos processos unitários na rota de síntese do megazol	27
Tabela II	Rendimento dos derivados do megazol com transformação da amina	34
Tabela III	Rendimento dos derivados do megazol com substituição da amina	35
Tabela IV	Valores dos Índices Fagocíticos frente aos compostos analisados após 48 h de infecção da cultura de células Vero	37
Tabela V	Contagem de formas tripomastigotas no sobrenadante após 48 h de infecção da cultura de células Vero	38

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Principais formas sob as quais podem apresentar-se os flagelados da família Trypanosomatidae	06
Fig. 2	<i>Triatoma infestans</i>	07
Fig. 3	Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	08
Fig. 4	Fármacos anti-chagásicos: benznidazol; nifurtimox	18
Fig. 5	Estrutura do megazol	19
Fig. 6	Esquema geral de reações para obtenção do megazol	24
Fig. 7	Esquema reacional sem modificações: Alquilação	25
Fig. 8	Esquema reacional modificado: Alquilação	25
Fig. 9	Esquema reacional com o grupo etila: Nitração	25
Fig. 10	Esquema reacional sem modificações: Oxidação	26
Fig. 11	Esquema reacional modificado: Oxidação	26
Fig. 12	Esquema reacional: Cianação	26
Fig. 13	Esquema reacional: Ciclização	27
Fig. 14	Nova rota de síntese do megazol após otimização	29
Fig. 15	Estruturas dos derivados 5-acetamidomegazol (2); 5-nonanolilmegazol (3) e 5-miristatilmegazol (4)	32
Fig. 16	Estruturas dos derivados 5-acetamidomegazol (4); 5-propilamidomegazol (5); 5-trifluormetilamidomegazol (6); 5-succinilamidomegazol (7); 5-metoximegazol (8) e 5-cloromegazol (9)	32
Fig. 17	Transformação da amina	33
Fig. 18	Substituição da amina	34
Fig. 19	Gráfico indicativo do Índice fagocítico da cultura de células Vero infectada com formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> para os compostos em teste	37
Fig. 20	Gráfico indicativo da contagem de formas tripomastigotas no sobrenadante após 48 h de infecção da cultura de células Vero	39

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia de Camada Delgada
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
FDA	Food and Drugs Administration
I.f.	Índice fagocítico
I.V.	Infra-vermelho
LIT	Liver Infusion Tryptose
MCPBA	Ácido metacloroperbenzóico
OPS	Organização Panamericana de Saúde
PBS	Solução salina em tampão fosfato 0,01 M pH 7,2
RPMI	Meio de cultura de células desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
U.V	Ultra-violeta
s	singleto
d	duplete
m	multiplete
sl	Sinal largo
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1. A doença de Chagas.....	03
1.1.1.Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	06
1.2. Diagnóstico da doença.....	12
1.3. Questões sócio-econômicas da doença de Chagas.....	14
1.4. Terapêutica.....	15
1.5. Fármacos anti-chagásicos.....	18
1.5.1. Megazol.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. CAPÍTULO I – OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DO MEGAZOL.....	24
3.1.Introdução.....	24
3.2.Resultados e Discussão.....	25
3.3.Conclusões parciais.....	28
4. CAPÍTULO II – OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO MEGAZOL.....	30
4.1.Introdução.....	30
4.2.Determinação do melhor grupamento a ser modificado na estrutura do megazol.....	30
4.3.Resultados e Discussão.....	33
4.3.1. Ensaio químicos.....	33
4.3.2. Ensaio biológicos.....	35
4.4. Conclusões parciais.....	41
5. CONCLUSÕES FINAIS.....	43
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	46
6.1.Materiais.....	46
6.2.Metodologias.....	47
6.2.1. Ensaio químicos.....	47
6.2.1.1. Metodologias empregadas na otimização do megazol.....	47
6.2.1.2. Metodologias empregadas na obtenção de derivados do megazol.....	53
6.3.Ensaio biológicos.....	58
6.3.1. Células Vero.....	58
6.3.2. Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
6.3.3. Ensaio de infectividade.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS.....	67

1. INTRODUÇÃO

Este projeto está relacionado ao estudo de moléculas obtidas por via sintética com potencial atividade tripanosomicida.

Para melhor descrever o objetivo a ser atingido, o projeto está dividido em duas partes:

- a primeira parte consta da síntese do megazol, estrutura de interesse do trabalho proposto, a partir da quarta rota e sua otimização;
- a segunda parte descreve as rotas de síntese para obtenção de derivados do megazol, bem como testes de atividade biológica destes compostos.

A partir de pesquisas anteriormente desenvolvidas no Instituto de Química de Toulouse, França e continuados no Laboratório de Síntese e Otimização de Fármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP, Brasil, iniciaram-se pesquisas objetivando a otimização da rota de síntese do megazol, no intuito de ampliar o estudo de novos fármacos anti-chagásicos.

Esta dissertação discorrerá sobre um breve histórico do megazol, metodologias empregadas na otimização dos processos químicos e síntese de seus derivados na função amina. Esses derivados são, então, comparados quanto sua atividade biológica ao megazol e ao benznidazol, no intuito de produzir um análogo mais potente e menos tóxico.

1.1. A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, ou tripanosomíase americana, afeta cerca de 17 milhões de indivíduos, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (GOLDENBERG; KRIEGER, 1997). No Brasil, estimam-se cerca de 6 milhões de pessoas infectadas, com uma população de risco em torno de 20 milhões de habitantes. Esta doença tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado e representa um grave problema de saúde pública (DIAS; JATENE, 1992). A associação do *T. cruzi* com a doença, bem como o ciclo do parasita na natureza, foi primeiramente descrita graças ao trabalho de Carlos Chagas no início do século.

Classicamente a Doença de Chagas era considerada uma doença rural, entretanto, devido às grandes correntes migratórias passou a atingir centros urbanos onde a transfusão sangüínea passou a ser uma via importante no surgimento de novos casos (DIAS; JATENE, 1992). A doença permanece um problema de saúde pública prioritário porque necessita de uma supervisão e controle nas áreas endêmicas onde o inseto vetor pode invadir as residências. Este quadro se agrava diante dos elevados custos médicos e sociais que envolvem cuidados com as pessoas infectadas e pela ausência de uma terapia eficiente e com poucos efeitos colaterais, especialmente na fase crônica da doença (MOREL; LAZDINS, 2003).

Embora mais rara, a transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* costuma resultar em manifestações da doença de Chagas agudas e de alta virulência (DIAS, 2001). A maior virulência seria resultado, sobretudo, da quantidade de parasita que invade o organismo, muito maior por via oral, do que a que penetra no corpo através de uma picada de barbeiro, tradicional vetor da doença (MATEOS, 2005).

Outra explicação seria as cepas do parasita: em geral na transmissão oral prevalecem tripanosomas das cepas do biotipo tipo III, encontrados com mais frequência em animais silvestres (MATEOS, 2005).

A partir da década de 90, registraram-se vários pequenos surtos na Amazônia, também atribuídos à transmissão oral. Famílias inteiras desenvolveram a doença de Chagas, sem que existissem barbeiros em suas casas. Aqui a explicação seria o equipamento usado para fazer suco de açaí. A máquina fica normalmente fora da casa, os barbeiros seriam atraídos pela luz e acabariam triturados junto com a fruta (MATEOS, 2005).

No recente surto ocorrido em Santa Catarina, em fevereiro do ano de 2005, 31 casos foram confirmados de pessoas contaminadas pela ingestão do *T. cruzi* em caldo-de cana, com cinco óbitos, além de outros 75 suspeitos de contaminação (MATEOS, 2005).

É importante salientar que a transmissão da doença ocorre principalmente pelo vetor (80 a 90%), transfusão de sangue (5 a 20%) e via congênita (0,5 a 8%) (DIAS, 2000).

Nos hospedeiros vertebrados são encontradas intracelularmente as formas amastigotas, as formas epimastigotas e as formas extracelulares presentes no sangue circulante. As formas amastigotas e tripomastigotas são infectantes para células “*in vitro*” (VERONESI; ROTBERG, 1982).

Quando adota a forma amastigota, o parasita apresenta-se como um organismo de pequenas dimensões e contorno aproximadamente circular, ovóide ou fusiforme. Seu corpo é

achatado, com pouco citoplasma e com núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico. O cinetoplasto, que constitui uma mitocôndria rica em DNA, de forma discóide é bem visível, porém o flagelo, curtíssimo e incluído em uma invaginação da membrana chamado bolso flagelar, geralmente não é reconhecível nas preparações coradas e examinadas à microscopia óptica. Por não haver a parte externa do flagelo, o amastigota é praticamente imóvel (REY, 1992).

O epimastigota caracteriza-se porque tem forma alongada (fusiforme) e o cinetoplasto discóide fica nas proximidades do núcleo e, também, porque o bolso flagelar, sempre estreito, abre-se lateralmente. O flagelo emerge, portanto, longe da extremidade anterior, mas mantém-se colado à membrana celular por uma prega da bainha flagelar denominada membrana ondulante, em vista de acompanhar os movimentos flagelares. Só depois de ultrapassar o pólo anterior da célula é que o flagelo se torna livre (REY, 1992).

A forma tripomastigota tem o corpo celular longo e achatado, como nos epimastigotas, porém apresenta o bolso flagelar e o cinetoplasto deslocados para a região entre o núcleo e a extremidade posterior, não raro muito próximo desta. O cinetoplasto tem contorno arredondado e o flagelo percorre externamente toda a extensão da célula, aderida por sua longa membrana ondulante (REY, 1992).

Fig.1. Principais formas sob as quais podem apresentar-se os flagelados da família Trypanosomatidae (REY, L., 1992).

No hospedeiro invertebrado, são encontradas inicialmente formas arredondadas circundando o corpo, denominado esferomastigotas presentes no estômago e intestino do triatomíneo; formas epimastigotas presentes em todo o intestino e tripomastigotas presentes no reto. O tripomastigota metacíclico constitui a forma mais natural de infecção para o hospedeiro vertebrado (REY, 1992).

1.1.1. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo do *Trypanosoma cruzi* na natureza envolve dois hospedeiros, um inseto triatomíneo (vulgarmente chamado de barbeiro ou chupão) e um mamífero.

Fig.2. *Triatoma infestans* - barbeiro (www.sucen.sp.gov.br)

Quando o triatomíneo, um inseto hematófago, alimenta-se com o sangue de um mamífero (que pode inclusive ser o homem) infectado pelo *T. cruzi*, o mesmo ingere parasitas na forma tripomastigota, que é a forma que circula no sangue. Estes tripomastigotas transformam-se em epimastigotas na porção anterior do intestino do inseto. Diferentemente dos tripomastigotas que são formas infectivas e não-replicativas, os epimastigotas são capazes de se multiplicar e não são infectivos. Após vários ciclos de replicação, os epimastigotas migram através do intestino do inseto vetor e, nas porções terminais, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são formas infectivas (GOLDENBERG; KRIEGER, 1997).

Durante o repasto de sangue do inseto no hospedeiro vertebrado, ocorre a dilatação do abdômen do triatomíneo e as formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas nas fezes e urina do inseto, penetrando no interior do hospedeiro vertebrado através da pele (no local do ferimento provocado pela picada) ou através de mucosa. Uma vez na circulação, os tripomastigotas metacíclicos interiorizam-se em células, seja através da fagocitose promovida pelos macrófagos, seja através da penetração ativa em células não-fagocíticas, como células musculares (GOLDENBERG; KRIEGER, 1997). No interior das células do mamífero, os tripomastigotas metacíclicos transformam-se nas formas amastigotas que são capazes de se replicar intracelularmente. Após vários ciclos de replicação, quando a célula do mamífero já

está repleta de amastigotas, ocorre a transformação destas formas em tripomastigotas que são liberados na corrente sanguínea após a lise celular. Estas formas tripomastigotas são capazes de infectar novas células ou podem ser ingeridas, através da picada, por triatomíneos durante o repasto de sangue, e o ciclo recomeça (GOLDENBERG; KRIEGER, 1997).

Fig. 3. Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (EXPERT REVIEWS IN MOLECULAR MEDICINE, 2002).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere tripomastigotas sanguíneos (h) que, posteriormente, no lúmen do tubo digestivo, se transformam em epimastigotas, as formas proliferativas não infectivas. Após um período de 2 a 3 semanas, os epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são liberados com as fezes do inseto vetor e penetram no vertebrado através do local da picada (a). Os tripomastigotas metacíclicos invadem as células do hospedeiro vertebrado (b), escapam do vacúolo parasitóforo e transformam-se em formas amastigotas (c). Estes se multiplicam no citoplasma, diferenciam-se novamente em tripomastigotas que são liberados pela lise da célula (d) e podem infectar outras células adjacentes (e) ou entram na circulação (f). Da circulação os tripomastigotas (denominados sanguíneos) podem propagar a infecção por todo o corpo (g) ou serem ingeridos pelos hemípteros durante o repasto sanguíneo e iniciar a infecção no hospedeiro invertebrado (h). Um sub-ciclo alternativo pode ocorrer no vertebrado onde amastigotas, derivados da lise prematura das células infectadas ou pela diferenciação extracelular de tripomastigotas, são capazes de invadir macrófagos e células não fagocíticas, onde podem sobreviver e completar o ciclo intracelular (i).

Experiências “*in vitro*” demonstram que o mecanismo de interação entre o parasita e células do hospedeiro vertebrado denomina-se “fagocitose induzida” ou “endocitose”, no qual participam ativamente a célula e o parasita. Componentes de membrana de ambos, alguns com composição e peso moleculares já conhecidos, interagem entre si (NEVES, 1995).

A interação entre o parasita e a célula hospedeira ocorre em três fases sucessivas:

Adesão celular: quando ambos se reconhecem e o contato membrana-membrana ocorre;

Interiorização: quando ocorre a formação de pseudópodos e a conseqüente formação do vacúolo fagocitário;

Fenômenos intracelulares: quando as formas epimastigotas são destruídas dentro do vacúolo fagocitário (após sua fusão com o lisossoma e formação do fagolisossoma) ou os tripomastigotas escapam do vacúolo fagocitário desenvolvendo-se livremente no citoplasma da célula, onde se transformam em amastigotas (três horas após a interiorização).

Duas diferentes fases são consideradas na doença de Chagas: a aguda e a crônica. Uma das propriedades da doença de Chagas é que, muitas vezes, não existem manifestações clínicas, ou elas são moderadas. Por esta razão, o diagnóstico clínico deveria ser sempre considerado em um contexto epidemiológico e confirmada também a presença de anticorpos contra o parasita, ou o próprio parasita (NEVES, 1995).

No início da infecção do vertebrado (fase aguda), a parasitemia é mais elevada, podendo ocorrer morte do hospedeiro. Esta fase é caracterizada pela transitoriedade dos sintomas e sinais e por quadro agudo e febril. O período inicial da doença é mais facilmente detectado em indivíduos jovens, em especial nos primeiros cinco anos de vida (COURA; CASTRO, 2002).

Na prática, a fase aguda geralmente passa despercebida, entre outras coisas, por falta de sensibilidade de diagnóstico do médico, advindo confusão com outras entidades agudas e febris (COURA; CASTRO, 2002).

Quando o hospedeiro desenvolve resposta imune eficaz, diminui a parasitemia e a infecção tende a se cronificar. Na fase crônica, o número de parasitas é pequeno na circulação, só sendo detectados por métodos especiais (xenodiagnóstico, hemocultura e inoculação em camundongos). Trata-se de um período clinicamente silencioso e sem manifestação detectáveis, podendo assim permanecer indefinidamente (30% a 50% dos casos). Outro grupo de pacientes evolui lentamente (de 10 a 20 anos) para uma forma clínica definida, apresentando apenas uma pequena minoria continuidade imediata e agravamento de lesões da fase aguda, especialmente cardiopatias (CHAGAS, 1909).

Por razões desconhecidas, certo número de pacientes chagásicos nunca desenvolverá manifestações clínicas da doença (BRENER; ANDRADE; BARRAL NETO, 2000).

Os sinais da doença se produzem no próprio lugar onde se deu a contaminação pelas fezes do inseto. Esses sinais surgem mais ou menos de 4 a 6 dias após o contato do barbeiro com a sua vítima. Os tripanosomas eliminados pelo barbeiro introduzem-se nos tecidos da região, determinando uma inflamação que marca a “porta de entrada” da doença, que é caracterizada por um inchaço unilateral na região dos olhos, descrito como sinal de Romaña. Quanto ao nível da pele (geralmente nos braços, pernas ou rosto), a lesão inicial pode assemelhar-se a um furúnculo ou uma mancha avermelhada quase sempre dolorosa, mas que

não vem a purgar. Essa lesão inicial quase sempre vem acompanhada de “ínguas” (que são aumento dos gânglios linfáticos) nas regiões próximas ao local da contaminação. A febre é um dos sintomas mais freqüentes nessa fase da doença, às vezes o único. Trata-se de febre baixa e continua, com duração prolongada (semanas). Mal estar, falta de apetite, aceleração dos batimentos do coração, o freqüente aumento do fígado e do baço, inchaço da face e do corpo inteiro, vão surgindo alguns dias após a penetração dos parasitas e complementa, em seu conjunto, o quadro que indica sua disseminação pelo organismo. Na ausência de tratamento específico, os sintomas persistem por cerca de dois meses, com um grau de mortalidade de 2 a 8%, especialmente entre crianças (BRENER; ANDRADE; BARRAL NETO, 2000).

Na fase crônica estabelece-se um equilíbrio dinâmico entre o parasita e as defesas do hospedeiro, ficando aquele mais confinado aos nichos intracelulares. A parasitemia é baixa e persistente. Tal fato fundamenta o diagnóstico laboratorial da fase crônica, que se mostra muito mais voltado para os processos imunológicos do que para a busca do parasita (COURA; CASTRO, 2002).

O coração é, sem dúvida, o órgão mais lesado, devido a fatal preferência do tripanosoma por suas fibras musculares, aos poucos o órgão vai dilatando e crescendo. Atingindo amiúde dimensões enormes, que é designado “coração bovino”. Isto produz grave desorganização na maneira do órgão contrair-se para bombear sangue, ficando extremamente irregulares as batidas do coração. De repente pode parar de bater e o indivíduo morre inesperadamente (BRENER; ANDRADE; BARRAL NETO, 2000).

Felizmente, grande parte dos chagásicos, mais da metade, não chega a desenvolver formas graves da doença no coração. São pessoas que poderão passar uma vida praticamente normal, pois seu organismo foi capaz de entrar em equilíbrio com o *Trypanosoma cruzi* (BRENER; ANDRADE; BARRAL NETO, 2000).

A patogenia da doença de Chagas, ainda não é completamente definida e compreendida, com duas lesões inflamatórias básicas, uma focal e outra difusa. A lesão focal é associada com o parasita, e ocorre quando as células parasitadas são rompidas. As lesões difusas estão fora de proporção em relação à presença do parasita. Durante a infecção aguda há lesões difusas no coração e lesões focais em vários outros órgãos (COURA; CASTRO, 2002).

Dois mecanismos são propostos para a patogenia crônica da infecção de Chagas: a persistência do parasita resulta em reação inflamatória crônica e ela induz uma resposta imune no próprio tecido (COURA; CASTRO, 2002).

1.2. DIAGNÓSTICO DA DOENÇA

Para se ter certeza que uma pessoa é chagásica, exames especiais são necessários, de acordo com a fase da doença.

Os métodos de diagnóstico podem basear-se na detecção direta do parasita ou na detecção da resposta do hospedeiro à invasão do parasita. No primeiro grupo, o método mais comumente utilizado é o de xenodiagnóstico, ou seja, coloca-se o paciente em contato com o inseto vetor e após algumas semanas busca-se o parasita nas fezes e urina do inseto. O

xenodiagnóstico apresenta sensibilidade de 95% nos casos agudos, variando de 20% a 60% entre os pacientes crônicos, segundo vários autores. A propósito, tem-se verificado que, entre pacientes crônicos, há os que sempre apresentam xenos positivos enquanto outros são reiteradamente negativos ao exame, necessitando de dezenas de xenos repetidos para que algum consiga demonstrar o parasita (GOLDENBERG; KRIEGER, 1997).

Alternativamente, a amostra de sangue do paciente é colocada em meio de cultura apropriada e busca-se, após algum tempo, a detecção do parasita; esta técnica é denominada de hemocultura. Estas, técnicas, embora não deixem dúvidas quando se apresentam positivas, além de demoradas, originam muitos resultados falso- negativos, sem mencionarmos reações alérgicas adversas que alguns indivíduos podem apresentar à picada do triatomíneo. Mais recentemente, foram descritas metodologias que utilizam a técnica de PCR e que deverão melhorar as técnicas de detecção direta do parasita (GOLDENBERG; KRIEGER, 1997).

O outro grupo de técnicas de diagnóstico baseia-se na detecção de uma resposta imune do hospedeiro vertebrado ao parasita. São estas as técnicas de hemoaglutinação, fixação de complemento, imunofluorescência, “western blot” e ELISA. Estas técnicas permitem resultados de diagnóstico em menor espaço de tempo e em alguns casos automação, por exemplo a técnica de ELISA (GOLDENBERG; KRIEGER, 1997).

1.3. QUESTÕES SOCIO-ECONÔMICAS DA DOENÇA DE CHAGAS

Por causa da falta de medicamentos ou da inexistência de tratamento adequado, todo ano 14 milhões de pessoas morrem no mundo vítimas de doenças infecciosas. Segundo o documento “Desequilíbrio Fatal”, nos últimos cinco anos, nenhuma das 20 empresas de maior faturamento dos Estados Unidos, da Europa e do Japão lançou no mercado novos fármacos para doenças consideradas extremamente negligenciadas (COURA, 1997).

Nos últimos 25 anos, surgiram apenas 15 novos fármacos para tratar doenças tropicais e tuberculose, que afetam as populações pobres e correspondem a 12% do total de doenças. No mesmo período, 179 novos medicamentos foram criados para combater problemas cardiovasculares, que representam 11% do total de enfermidades. Das 1.393 novas moléculas aprovadas entre 1975 e 1999, apenas 1% era indicada para doenças tropicais (COURA, 1997).

Sabe-se que 80% da população mundial consome 20% dos medicamentos vendidos e que só 10% das pesquisas em saúde são dedicadas às doenças negligenciadas, que correspondem a 90% da carga global de enfermidades (COURA, 1997).

Para mudar essa situação, propõe-se que os governos, por meio de um tratado global, obriguem as empresas farmacêuticas a investir parcelas das vendas em pesquisas sobre doenças negligenciadas. Sugere-se ainda que as substâncias ativas para essas doenças sejam consideradas bens públicos globais, passíveis de terem a patente quebrada em benefício da humanidade (COURA, 1997).

O problema é importante, face aos mais de 16 milhões de infectados existentes, com uma proporção entre 10 e 30% de cardiopatas (DIAS, COURA, 1997; WHO, 1991). O

chagásico não aparece na maioria das contabilidades oficiais; pobre, excluído, sem peso político, analfabeto e rural, vive geralmente marginalizado no processo social, portanto requerendo a proteção do Estado (COURA, 1997).

No entanto, a luta contra a enfermidade vale a pena, especialmente na sua prevenção, ainda que o argumento se restrinja ao mero aspecto econômico: o investimento governamental em controle químico racional do vetor, por exemplo, irá propiciar uma taxa de retorno não menor que 19%, em poupança de custos diretos de atenção médica e previdenciária (SCHOFIELD; DIAS, 1991). O Brasil investiu, de 1983 a 1996, cerca de US\$ 400 milhões em seu programa de controle, com isto poupando, no mesmo período, US\$ 900 milhões apenas no âmbito da sobrevida. Sob outro ângulo, o mercado de insumos pertinentes à endemia chagásica elevou-se substancialmente a partir dos anos 80, em especial nos tópicos de inseticidas e de reagentes para o diagnóstico sorológico, incentivando o interesse de grandes multinacionais e obrigando os países e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPS) a grandes exercícios de competência para comprá-los em condições dignas, sem superfaturamento (DIAS, 1995).

1.4. TERAPÊUTICA

Desde a descoberta da doença pelo médico sanitário Carlos Chagas, em 1909, até os dias atuais, foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento, sem obter, entretanto, um medicamento totalmente eficaz. Muitas substâncias naturais e sintéticas apresentaram atividade tripanosomicida (CROFT et al., 2003), mas estão longe de tornarem-se um fármaco aprovado em todos os testes clínicos. Além disso, extratos e frações de produtos naturais também apresentaram-se ativos sugerindo futura investigação de seus componentes

(FREITAS et al., 2002). Apesar disso, nenhum fármaco tornou-se disponível para o tratamento da doença desde 1970 quando foram introduzidos os dois fármacos atuais no mercado (CROFT, 1999; COURA ; CASTRO, 2002).

Murta e colaboradores (1998), sugerem que a resistência natural do *Trypanosoma cruzi* a derivados nitroeterocíclicos pode ser um fator importante para explicar a baixa taxa de cura em pacientes chagásicos. O aparecimento de resistência torna imprescindível a descoberta de novos protótipos de origem natural, semi-sintética ou sintética, além da viabilização do uso da biologia molecular para caracterizar a susceptibilidade das cepas infectantes às substâncias em questão (MURTA et al., 1998).

Para o tratamento de alguns casos de doença de Chagas têm sido utilizados fármacos antifúngicos da classe dos azóis, entre eles cetoconazol, miconazol, econazol e itraconazol (STOPPANI, 1999; URBINA, 1999).

O desenvolvimento de fármacos mais efetivos e menos tóxicos requer o total conhecimento do ciclo de vida e metabolismo do *T. cruzi* (ELIAS, 2003).

A extensa distribuição da forma intracelular amastigota de *T. cruzi* nos tecido e células, durante a fase aguda e crônica da doença de Chagas, é a mais difícil etapa para uns fármacos específicos, comparados com a Leishmaniose onde as formas amastigotas estão restritas aos macrófagos (CROFT, 1999).

Cumprе assinalar, que até 1960 a metodologia empregada em ensaios terapêuticos deixava a desejar, pois os mesmos careciam de critérios norteadores, principalmente no

tocante aos esquemas posológicos e à avaliação dos esquemas terapêuticos. Na maior parte das investigações o tempo de duração de tratamento se afigurava irrisório, freqüentemente não ultrapassando mais de alguns dias, assinalando-se quanto aos resultados, tão-somente a redução da parasitemia, o encurtamento de duração da fase aguda e a diminuição do índice de mortalidade de animais inoculados (ELIAS, 2003).

Era consenso geral que os medicamentos, embora fossem ativos contra o *T. cruzi*, não eram capazes de curar a infecção, pois a ação antiparasitária fazia-se apenas sobre as formas tripomastigotas, deixando indenes as formas amastigotas (COURA ; CASTRO, 2002).

Segundo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde, o fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas deve cumprir os seguintes requisitos:

- cura parasitológica dos casos agudos e crônicos;
- eficaz em dose única e pequena;
- acessível para paciente em Países de baixa renda;
- sem efeitos colaterais ou teratogênicos;
- sem precisar de hospitalização para o tratamento;
- sem indução de resistência.

Baseando-se nestes tópicos, várias substâncias obtidas sintética ou extrativamente, têm sido testadas frente a culturas de *T. cruzi*.

1.5. FÁRMACOS ANTI-CHAGÁSICOS

Desde o final dos anos 60 e início dos anos 70, dois fármacos foram utilizados para o tratamento da doença de Chagas: benznidazol (Rochagan[®]) e o nifurtimox (Lampit[®]) (COURA; CASTRO, 2002).

Fig. 4. Fármacos anti-chagásico: benznidazol e nifurtimox.

O nifurtimox (5-nitrofurano) foi o composto mais ativo estudado experimentalmente e o benznidazol (2-nitroimidazol), mostrou uma alta atividade “*in vitro*” e “*in vivo*” contra o *T. cruzi*.

Entretanto, há controvérsias sobre o uso em casos crônicos da doença, além disto, ambos necessitam de uma utilização prolongada, produzindo uma série de efeitos adversos, incluindo mutagenicidade, toxicidade e o surgimento de novas cepas resistentes, o que indica uma terapêutica ineficaz. Por isso, têm-se as suas comercializações descontinuadas, reforçando assim a necessidade de encontrar substâncias com mais eficácia e menos toxicidade (AMATO NETO, 1999).

1.5.1. MEGAZOL

O megazol (1), um dos produtos sintetizados através de estudos da American Cyanamid sobre 5-nitroimidazóis em 1968 (BERKELHAMMER; ASATO, 1968), demonstrou largo espectro de atividade biológica frente a diversos microorganismos, porém não possuía estudos toxicológicos referentes ao grupamento nitro presente na molécula (BURDEN et al., 1968; NAGARAJAN et al., 1983; WINKELMANN, 1977).

Fig. 5. Estrutura do megazol

Esta molécula demonstrou um largo espectro de atividade biológica frente a diversos microorganismos Gram+ e Gram-, bem como fungos e protozoários. Este estudo não foi levado a termo devido às potencialidades tóxicas do grupamento nitro, presente nesta molécula, e que restringia o registro de novas moléculas pela FDA (ALBUQUERQUE; PERIE, 1999).

Nos anos 80, pesquisadores brasileiros da Fundação Instituto Oswaldo Cruz do Rio e do Centro René Rachou de Belo Horizonte, devido a grande incidência da doença de Chagas no Brasil, relacionaram um grande número de substâncias até então indicadas como ativas contra o *T. cruzi*. Dentre estas, o megazol (1) foi o que apresentou um grande interesse, pois testes “*in vivo*”, com ratos, mostrou um efeito curativo significativo, em dose única, provocando uma redução brusca do parasita, não só pela eliminação das formas amastigotas

bem como das tripomastigotas, talvez estas últimas desapareçam devido a um estímulo da ação destruidora pelos macrófagos (NEVES, 1995). A partir daí o interesse sobre um estudo desta molécula e análogos tornou-se imprescindível, no intuito de buscar uma terapia alternativa e determinar o mecanismo de ação destas estruturas (ALBUQUERQUE; PERIE, 1999).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Neste projeto temos dois objetivos principais:

- a otimização dos processos envolvidos na rota de síntese do megazol (1) desenvolvida por Albuquerque em 1995 e otimizados por Moretto em 2001, modificando condições operacionais e reagentes.
- obtenção de novos derivados do megazol (1) a partir da modificação da função amina ligada ao anel 1,3,4-tiadiazólico.

CAPÍTULO I – OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DO MEGAZOL

3. CAPÍTULO I – OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DO MEGAZOL

3.1. INTRODUÇÃO

Com o intuito de otimizar os processos unitários envolvidos na síntese do megazol (1), determinaram-se às condições experimentais que poderiam influenciar no rendimento do processo, tais como; tempo, temperatura, agente principal da reação. Esses estudos foram necessários visto que a matéria prima para obtenção dos derivados é o próprio megazol (1).

Para sua obtenção foi escolhida a rota proposta por Albuquerque em 1995 e que já tinha sido foco de um estudo de otimização realizado por Moretto em 2001. Devido a alguns problemas operacionais constatados foram modificadas algumas condições operacionais e substituídos alguns reagentes e solventes. A rota em questão é mostrada abaixo:

Fig. 6. Esquema geral de reações para obtenção do megazol (1).

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa da reação, tendo como processo unitário a alquilação, houve a substituição do agente metilante dimetilsulfato por iodeto de etila. Esta alteração influenciou o rendimento médio passando de 42% para 88%. A substituição do grupamento metila por etila também se mostrou favorável às reações posteriores.

Fig. 7. Esquema reacional sem modificações -Alquilação

Fig. 8. Esquema reacional modificado - Alquilação

Na segunda etapa onde ocorre um ataque eletrofílico por um grupo nitrônio sobre o anel imidazólico, o aumento da cadeia carbônica lateral, de uma metila para uma etila, aumentou o rendimento da nitração, já que o grupo etila estabiliza com maior intensidade a carga negativa do anel.

Fig. 9. Esquema reacional com o grupo etila – Nitração.

Na terceira etapa, onde ocorre a oxidação do grupo tio-éter, o agente oxidante foi substituído de ácido metacloroperbenzóico (MCPBA) para a mistura água oxigenada / ácido trifluoroacético, houve um acréscimo de rendimento no processo nas etapas subsequentes, visto não apresentar produtos secundários à reação. Passando-se a utilizar o produto desta reação para as etapas seguintes.

Fig. 10. Esquema reacional sem modificações - Oxidação

Fig. 11. Esquema reacional modificado – Oxidação

Na quarta etapa onde se tem a substituição da sulfona pelo grupamento ciano, constatou-se reprodutibilidade de rendimento, com a troca do solvente DMSO por dioxano, entretanto resultou em uma melhor operacionalidade e purificação da reação.

Fig. 12. Esquema reacional – Cianação

Na etapa final com a obtenção do anel tiadiazólico houve um aumento do rendimento com provável aceleração da reação, em virtude do aumento da temperatura reacional.

Fig. 13. Esquema reacional - Ciclização

Na tabela I estão resumidas as condições experimentais modificadas e os rendimentos obtidos.

TABELA I - Resumo das modificações dos processos unitários envolvidos na rota de síntese do megazol (1).

Etapa	Tipo de reação	Agente	Tempo	Temperatura	Rendimento
1	Alquilação	Dimetilsulfato	6 horas	40° C	42%
1	Alquilação	Iodeto de etila	3 horas	75° C	88%
2	Nitração	HNO ₃ 69% H ₂ SO ₄	2 horas	80°C	22%
2	Nitração	HNO ₃ 69%	1 hora	110°C	48%
3	Oxidação	MCPBA	17 horas	0°C	70%
3	Oxidação	MCPBA	17 horas	1.5°C	84%
3	Oxidação	H ₂ O ₂ 30%	2 horas	50°C	81%
4	Cianação	KCN/DMSO	13 horas	25°C	75%
4	Cianação	KCN/Dioxano	12 horas	25°C	75%
5	Ciclização	Ác. Trifluoracético	12 horas	40°C	45%
5	Ciclização	Ác. Trifluoracético	12 horas	60°C	68%

De acordo com os resultados da Tabela I calculou-se o rendimento global da rota de síntese otimizada em comparação com a rota utilizada como padrão, conforme fórmula abaixo:

$$RG = \frac{(\sum \text{rendimentos parciais } \%)^n}{(\text{número de etapas} \times 100)}$$

n = número de etapas

Rota 1 (Fig. 6): $RG = (42+22+84+75+45) / 5 \times 100 = (0,536)^5 = 0,0442 = 4,42\%$

Rota 2 (Fig. 14): $RG = (88+48+81+75+68) / 5 \times 100 = (0,72)^5 = 0,1934 = 19,34\%$

3.3. CONCLUSÕES PARCIAIS

Pode-se concluir que o processo está otimizado para as condições empregadas, pois de acordo com o cálculo de rendimento global, houve um aumento de rendimento em torno de 4 vezes da rota 2 em relação a rota 1 e os rendimentos obtidos são aceitáveis para a síntese do megazol (1), propiciando a ampliação de estudos de novos fármacos anti-chagásicos a partir da síntese de seus derivados.

Após estes estudos passou-se a obter o megazol (1) pela seguinte rota:

Fig. 14. Nova rota de síntese do megazol após otimização

CAPÍTULO II – OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO MEGAZOL

4. CAPÍTULO II – OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO MEGAZOL

4.1. INTRODUÇÃO

Como segunda etapa do presente projeto serão descritas as obtenções de derivados do megazol (1) e as análises relacionadas. Para a realização dessa etapa foram definidas três partes distintas:

- síntese e identificação de derivados estruturais do megazol (1);
- determinação da atividade biológica destes compostos;
- avaliação dos resultados, formulação de hipóteses e proposição de novos objetivos para a sequência das pesquisas.

4.2. DETERMINAÇÃO DO MELHOR GRUPAMENTO A SER MODIFICADO NA ESTRUTURA DO MEGAZOL (1)

Como estratégia inicial do estudo de derivados do megazol (1), foi analisada a estrutura global, bem como os grupamentos ligados a essa molécula e suas influências, subdividindo-a em quatro partes, como comentadas a seguir, e proposto à introdução de substituintes promissores. Após isto foram definidas rotas de síntese para a obtenção dos compostos e as metodologias a serem empregadas.

1: Grupamento nitro

A partir de dados preliminares (ALBUQUERQUE, 1995), foi determinado que a presença do grupamento nitro é indispensável para a atividade biológica, e também que a posição deste grupo no anel imidazólico, produz uma influência significativa.

2: Posição 4 do anel imidazólico

No intuito de determinar a influência desta posição no potencial redox do grupo nitro vizinho, foram obtidos dois análogos com diferentes substituintes (CH_3 e Br) que demonstraram a importância desta posição e principalmente que a presença de qualquer outro átomo, diferente do hidrogênio, faz com que ocorra uma perda significativa da atividade biológica (ALBUQUERQUE, 1995).

3: Modificação dos heterocíclicos

Foram obtidos anteriormente compostos com modificações dos dois anéis existentes na estrutura do megazol (1) para avaliar a importância destes na atividade biológica. A análise “*in vitro*” não apresentou resultado positivo em termos de inibição do parasita.

4: Grupamento amina

Obtenção dos derivados 1-metil-2-(5-nonanoilamido)-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol (2); 1-metil-2-(5-miristamido-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol (3) e 1-metil-2-(5-acetamido)-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol (4)

Em trabalho anterior (ALBUQUERQUE, 1995) foram obtidos três derivados onde a amina ligada ao anel 1,3,4-tiadiazol foi transformada em amida. Através dos resultados de testes biológicos “*in vitro*” foi determinado que cadeias curtas ligadas à função amina (4) produzem um efeito inibitório do crescimento do *Trypanosoma cruzi*, bastante significativo, em comparação ao megazol; enquanto cadeias maiores produzem um efeito negativo (2) e (3) (figura 15). Isto levou a proposição da síntese de outros derivados que poderiam ser bastante promissores.

Fig. 15. Estruturas dos derivados 5-nonanilmegazol (2), 5-miristatilmegazol (3) e 5-acetamidomegazol (4).

Foram escolhidos os seguintes substituintes: acetila (4); propila (5) ; trifluormetila (6); succinila (7) ; cloro (8) e metoxila (9) (figura 16).

Fig. 16. Estruturas dos derivados 5-acetamidomegazol (4), 5-propilamidomegazol (5), 5-trifluormetilamidomegazol (6), 5-succinilamidomegazol (7), 5-cloromegazol (8) e 5-metoxilmegazol (9)

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. ENSAIOS QUÍMICOS

Nesta etapa do projeto, foram obtidos seis derivados do megazol (1) a partir da modificação da função amina ligada ao anel 1,3,4 tiadiazólico. Uma destas modificações foi realizada pela sua reação com cloretos ou anidridos de ácidos, outra foi a partir da diazotação e substituição pelo átomo de cloro, e a substituição do cloro pelo metoxi, conforme o esquema abaixo:

Fig. 17. Transformação da amina

A reação de aminas com cloretos ou anidridos de ácidos é clássica na síntese orgânica e tem como função, em alguns casos, de modificar a solubilidade desta, tornando-a mais lipossolúvel ou protegê-la, em alguns processos orgânicos dentro de uma rota de síntese definida. No presente caso, utilizamos este processo químico para ampliar o número de derivados necessários à análise da atividade tripanosomicida, visto que em trabalhos anteriores foram obtidos resultados interessantes.

Os compostos foram obtidos a partir da reação do megazol (1) com o cloreto ou anidrido do ácido correspondente. Os rendimentos estão indicados na tabela abaixo:

Tabela II – Rendimentos dos derivados com transformação da amina.

Compostos	Rendimento
5-acetamidomegazol(4)	77%
5-propilamidomegazol(5)	60%
5-succinilamidomegazol(6)	1,69%
5-trifluormetil megazol(7)	70%

A modificação total da função amina, com sua substituição por grupamentos eletronegativos, foi introduzida neste trabalho para analisar a importância da própria amina e do átomo de nitrogênio. Foram obtidos dois compostos 5-cloromegazol (8) e o 5-metoximegazol (9), o primeiro através de uma reação de diazotação utilizando cobre e nitrito de sódio em solução ácida de megazol (1); e o segundo através da substituição do cloro, na posição 5, pelo radical metoxila (figura 18).

Fig.18. Substituição da amina

Os rendimentos obtidos estão assinalados na tabela III.

Tabela III – Rendimentos dos derivados com substituição da amina.

Compostos	Rendimento
5-cloromegazol (8)	7,51%
5-metoximegazol (9)	50%

4.3.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos visam comparar a atividade das moléculas sintetizadas em relação à inibição do crescimento das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. Estes testes foram realizados no laboratório de Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, sob a orientação do Prof. Dr. Renato Arruda Mortara e Solange da Silva Hernandez e são de importância crucial para a avaliação e desenvolvimento de novas estruturas, assim como para o conhecimento de diferentes mecanismos de ação.

A atividade dos compostos químicos foi avaliada em células Vero infectadas com formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Essas células, derivadas de fibroblastos de rim de macaco verde da África, foram inicialmente infectadas com formas tripomastigotas de cultura de tecido que deram origem a formas amastigotas (formas intracelulares). As culturas dessas células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Os compostos químicos foram dissolvidos em DMSO puro e para determinação da atividade desses compostos foram utilizadas diferentes concentrações finais nas células

infectadas (1, 5, 10 e 25 M). Em todos os ensaios realizados foram empregados os seguintes controles:

- células Vero na presença de DMSO na concentração final de 0,25%, sem infecção;
- células Vero infectadas e não tratadas (ausência dos compostos);
- células Vero infectadas com a presença dos compostos químicos.

A determinação do Índice fagocítico foi realizada através da contagem de 200 células/lamínula, em duplicata, com subsequente aplicação da fórmula apresentada abaixo. A atividade dos compostos químicos também foi avaliada determinando-se o número de formas tripomastigotas no sobrenadante das culturas de células Vero infectadas. A análise dos dados obtidos será comentada adiante.

$$\text{Índice fagocítico (I.f.)} = \frac{\text{nº. de parasitas intracelulares} \times \% \text{ de células infectadas}}{\text{número de células infectadas}}$$

A seguir são indicados tabelas e gráficos com os valores comparativos do estudo em questão.

Tabela IV - Valores dos Índices fagocíticos, frente aos compostos analisados após 48 h de infecção das células Vero (Teste 1).

Fármaco	Concentrações	1 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M
benznidazol		31,5	17,5	14	10,5
megazol (1)		18,5	10	0	0
5-acetilamidomegazol (4)		30,5	12	6,5	2
5-propilamidomegazol (5)		31	18	13,5	5,5
5-succinilamidomegazol (6)		16,5	15,5	9	5
5-trifluórmetilamidomegazol (7)		38,5	15	23,5	20
5-cloromegazol (8)		22,5	26,5	24,5	10
5-metoximegazol (9)		21	30	20,5	11

Fig. 19: Gráfico indicativo do Índice fagocítico de cultura de células Vero infectada com formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* para os compostos em teste.

Tabela V – Contagem de formas tripomastigotas no sobrenadante após 48 h de infecção da cultura de células Vero (parasita/mL) (Teste 2).

Fármaco	Concentrações				controle
	1 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	
benznidazol	123,0 x 10 ⁵	96,0 x 10 ⁵	26,4 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁵	-
megazol (1)	240,0 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	0,1 x 10 ⁵	-
5-acetilamidomegazol (4)	96,0 x 10 ⁵	6,6 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁵	0,6 x 10 ⁵	-
5-propilamidomegazol (5)	76,4 x 10 ⁵	7,3 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	0,1 x 10 ⁵	-
5-succinilamidomegazol (6)	132,0 x 10 ⁵	100,0x10 ⁵	84,0 x 10 ⁵	45,6 x 10 ⁵	-
5-trifluórmetilamidomegazol (7)	96,0 x 10 ⁵	12,0 x 10 ⁵	0,7 x 10 ⁵	0,0	-
5-cloromegazol (8)	134,0 x 10 ⁵	132,0x10 ⁵	100,0x10 ⁵	92,0 x 10 ⁵	-
5-metoximegazol (9)	168,0 x 10 ⁵	84,8 x 10 ⁵	12,7 x 10 ⁵	52,0 x 10 ⁵	-
Vero + parasita sem compostos	-	-	-	-	115,0 x 10 ⁵

Fig. 20: Gráfico indicativo da contagem de formas tripomastigotas no sobrenadante após 48 h de infecção da cultura de células Vero.

As tabelas IV e V e os gráficos 19 e 20 demonstram claramente o efeito inibitório significativo sobre o desenvolvimento intracelular do parasita do megazol (1) e dos análogos 5-acetilamidomegazol (4), 5-propilamidomegazol (5) e 5-succinilamidomegazol (6) comparados ao benznidazol empregado como padrão. Observa-se que, para a maioria dos compostos, a concentração de 25µM mostrou-se eficaz em relação às demais doses.

Dentre os derivados testados, àqueles que demonstraram resultados promissores se comparados com o benznidazol foram o 5-triflúormetilamidomegazol (7), 5-cloromegazol (8), e 5-metoximegazol (9) que em todas as concentrações estudadas apresentaram um Índice fagocítico menor que este fármaco, no entanto maiores que o megazol (1).

O teste de contagem de formas tripomastigotas no sobrenadante, reproduziram os resultados dos testes de contagem de formas amastigotas em células Vero, com exceção do composto 5-triflúoramidomegazol (7) que demonstrou um excelente resultado no teste 2 em relação ao teste 1, ressalta-se que nas doses de 1 μ M não se tem um efeito de controle da infecção em todos os compostos.

Estes resultados talvez estejam relacionados a uma provável proteção da molécula pela transformação da função amina, que estaria relacionada ao processo de eliminação do fármaco e sua decomposição. Estariam, então, estes derivados servindo como pró-fármacos, que liberariam o megazol (1), no local da ação.

Para confirmar esta hipótese são necessários estudos complementares e a comparação dos resultados com outros derivados similares.

4.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo foram realizados dois tipos principais de atividades: a síntese de produtos e intermediários e os testes de atividade tripanosomicida. No que tange a síntese de produtos e intermediários, efetuou-se as referidas rotas propostas nos objetivos, segundo expostas anteriormente. Foram obtidos seis compostos análogos ao megazol (1), com estruturas inéditas, sendo avaliados com relação à atividade tripanosomicida.

Pode-se destacar os derivados obtidos através da transformação da função amina ligado ao anel 1,3,4-tiadiazólico. Estes derivados apresentaram uma significativa ação inibidora do crescimento do *Trypanosoma cruzi* tanto quanto ao benznidazol como ao megazol (1). Estes resultados indicam uma importante via para outros análogos de cadeia curta.

Outro fato importante é a necessidade de um estudo complementar para determinação do potencial redox destas estruturas, característica esta muito ligada à atividade tripanosomicida e que até o presente não foi totalmente esclarecida.

Salienta-se, também a necessidade e intenção de ampliar os resultados até aqui obtidos, formulando outros projetos, visando uma sequência e complementação destes resultados, bem como outras moléculas ainda não sintetizadas e com estruturas análogas que poderão ampliar ainda mais este estudo.

CONCLUSÕES FINAIS

5. CONCLUSÕES FINAIS

Conforme exposto, este trabalho foi dividido em duas partes principais:

- 1- síntese do megazol (1), considerado como matéria-prima e
- 2- obtenção dos derivados e análise de sua atividade tripanosomicida.

Quanto à primeira parte pode-se assinalar que os experimentos realizados indicam um esquema reacional simples e de fácil execução e adaptação. Pode-se afirmar também que a otimização dos processos unitários para a obtenção do megazol (1) é bastante viável, já que proporcionou uma redução do tempo de reação com aumento de rendimento em comparação com a rota utilizada como padrão.

Com relação à segunda parte observa-se que a produção dos análogos estruturais foi levada a termo com a obtenção de seis novas estruturas e suas avaliações frente a células infectadas com o *T. cruzi*.

Três destes compostos, (4), (5) e (6), demonstraram uma atividade inibidora do crescimento do parasita significativa tanto com relação ao megazol (1) como com o benznidazol. Os outros três, (7), (8) e (9) demonstraram ser menos ativos que o megazol (1), no entanto, mais ativos que o benznidazol. Estes resultados indicam que todos os compostos obtidos devem ser analisados com frente a outros testes, principalmente “*in vivo*”.

Freqüentemente esta patologia é tratada com agentes nitro-heterocíclicos, assim como o nifurtimox e benznidazol. Esse último cura 100% dos casos das crianças menores que dois anos e 60 a 70% de pacientes adultos infectados na fase aguda. A falha do tratamento em 30 a

40% dos casos podem ser relatados a uma resistência do parasita ao benznidazol, a intensidade da parasitemia e outras razões desconhecidas. Entretanto, estes dois fármacos são efetivos contra a forma circulante do parasita (tripomastigotas) durante a fase aguda da doença, mas não durante o estágio crônico. Já o megazol (1) e seus derivados, mostraram-se efetivos também contra as formas amastigotas intracelulares. Ainda é escassa a informação sobre o modo de ação, talvez metabólitos possam impedir a biossíntese de proteínas pela interação com o DNA do parasita. Outra sugestão seria a ação na célula hospedeira pela estimulação da fagocitose e produção de citocinas.

PARTE EXPERIMENTAL

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Materiais

Os espectros na região do infravermelho (I.V.) foram obtidos em espectrofotômetros Perkin-Elmer, de feixe simples modelo 1610 I.R. usando pastilhas de brometo de potássio anidro. Os valores para as absorções são referidos em número de onda, utilizando como unidade o centímetro recíproco (cm^{-1}).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN^1H -300MHz) foram obtidos em aparelho do tipo Bruker, modelo Advance DPX-300, sendo o solvente deuterado utilizado indicado em cada caso. Os valores de deslocamento químico são referidos em δ e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). A área dos picos foi obtida por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: **s** – singleto; **d** – duplete; **m** – multiplete; **sl** – sinal largo.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN^{13}C -75MHz) foram obtidos em aparelho do tipo Bruker DPX-75 sendo o solvente deuterado utilizado indicado em cada caso.

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

A determinação dos pontos de fusão foi feita em aparelho Marconi, sem correção.

Os solventes utilizados para fins sintéticos, tais como: acetato de etila PA; dicloro metano PA; éter etílico PA; acetona PA; acetonitrila PA; dioxano PA; dimetilsulfóxido PA; tetrahidrofurano PA; metanol PA e foram previamente destilados, secos e conservados com os dessecantes específicos.

A remoção parcial dos solventes foi realizada à pressão reduzida em evaporador rotatório. Todos os rendimentos foram calculados sobre os produtos puros.

Os reagentes utilizados foram: 1-metil-2- tioimidazol; tiosemicarbazida; ácido nítrico 69%; hidróxido de amônio 32%; ácido trifluoracético; bicarbonato de sódio; ácido clorídrico; anidrido acético; ácido acético glacial, anidrido do ácido trifluoracético; anidrido succínico; anidrido do ácido propiônico; nitrito de sódio; cobre em pó; metóxido de sódio anidro, piridina.

6.2. Metodologias

6.2.1. Ensaios químicos

6.2.1.1. Metodologias empregadas na otimização do megazol

1ª Etapa: Alquilação

Em um balão de fundo redondo de 500mL adicionaram-se 5g (0,017mols) de 1-metil-2-tioimidazol e 200mL de acetonitrila, agitando até a completa dissolução. Acrescentaram-se,

então, 25mL de uma solução de bicarbonato de sódio 80g/L e posteriormente 8,4 mL de dimetilsulfato . O meio reacional foi mantido em refluxo (aquecimento por volta de 60° C) e agitação por seis horas. Terminada a reação, rotoevaporaram-se o solvente (acetonitrila) e colocou-se o balão em um banho de gelo. Para realizar o acerto de pH para aproximadamente 8 foram acrescentados cerca de 5 mL de água destilada e 4 mL de hidróxido de sódio 1M. Feito isso realizou-se três extrações com a fase orgânica restante, acrescentou-se sulfato de magnésio anidro (dessecante), filtrou-se e rotoevaporou-se o solvente (diclorometano). Obtiveram-se 2 mL (42%) de um líquido viscoso amarelo-claro.

A fim de aumentar o rendimento e reduzir o tempo de reação, nesta etapa, foi substituído o agente alquilante dimetilsulfato pelo iodeto de etila.

Foram utilizados 4 mL de iodeto de etila e o meio reacional deixado sob refluxo (aquecimento por volta de 75° C) e agitação por três horas. Estas foram as mudanças no procedimento, permanecendo as outras etapas inalteradas. Obtiveram-se 5 mL (88%) de um líquido viscoso amarelo-claro com ponto de ebulição 63,0°C e dados de espectroscopia : RMN¹H (CDCl₃/300MHz) δ (ppm): 2,41 (m, 5H,CH₂CH₃); 3,53 (s, 3H, NCH₃); 6,84 (d, 1H, H5, j= 1,5 Hz); 6,98 (d, 1H, H4,j = 1,5Hz). RMN¹³C(CDCl₃/75MHz) δ (ppm): 12,51 (CH₃); 16,09 (SCH₂); 32,85 - (NCH₃); 121,99 - (C5); 128,67 -(C4); 142- (C2).

2ª Etapa: Nitração

Em um balão de três bocas adicionaram-se 5 mL de ácido nítrico aquecido em um banho de óleo, até 80° C. Atingida a temperatura mencionada, iniciou-se a adição do 1-metil-2-tioetilimidazol (1,7 ml) lenta e progressivamente com o intermédio de uma seringa. Nesta fase a temperatura foi controlada de 80 a 90°C. Terminada a adição, elevou-se à temperatura até aproximadamente 110°C e deixou-se por uma hora sob refluxo e agitação. Após, o meio reacional foi resfriado num banho de gelo e adicionaram-se 5 mL de água destilada e cerca de 3 mL hidróxido de amônio até atingir pH 7-8. Nesta etapa formou-se 1,09 g (48%) de um precipitado amarelo, com ponto de fusão 82,5°C e dados de espectroscopia : RMN¹H (CDCl₃/300MHz) δ (ppm) : 2,51 (m, 5H, CH₂CH₃); 3,85 (s, 3H, NCH₃); 7,97 (s, 1H, H4). RMN¹³C(CDCl₃/75MHz) δ (ppm) : 12,51 (CH₂); 14,38 (CH₃); 33,64 (NCH₃); 133,57 (C4); C2 e C5 ausentes.

3ª Etapa: Oxidação

Dissolveram-se 0,52g do produto nitrado (1-metil-5-nitro-2-tioetilimidazol) em 15mL de diclorometano, em um balão de fundo redondo. Em um Becker, a parte, dissolveu-se 1,27g de ácido metacloroperbenzóico (MCPBA) em 7 mL de éter etílico. O composto nitrado em solução foi colocado em um banho de gelo e adicionou-se a solução de MCPBA também previamente resfriada. Após, o meio reacional foi deixado sob agitação por três horas a 0° C, e posteriormente, em uma hora à temperatura ambiente. Para dar continuidade ao procedimento a reação prosseguiu sob refluxo e agitação. Somente após doze horas o meio foi lavado três vezes com uma solução saturada de bicarbonato de sódio, onde se desprezou a fase aquosa e adicionou-se mais diclorometano. Desidratou-se a fase orgânica restante com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se a seco. Obtiveram-se 0,5220 g (84%) de um sólido amarelo pálido.

Constatou-se que o produto obtido apresentava uma parcela do ácido MCPBA que não reagiu, interferindo na etapa seguinte da síntese.

Visando obter melhores resultados e diminuição no tempo de reação, realizou-se outro processo de oxidação, o qual é descrito abaixo:

Em um balão de fundo redondo, dissolveram-se 1,1g do 1-metil-5-nitro-2-tioetilimidazol em 10 ml de ácido trifluoracético à temperatura ambiente. Neste momento, adicionaram-se 3ml de água oxigenada 30%, deixando sob agitação por trinta minutos. Após

este período, acrescentaram-se mais 3ml de água oxigenada 30%, deixando sob agitação e aquecimento, por volta de 50 °C, por mais uma hora e trinta minutos. Feito isso, adicionou-se gelo picado e realizaram-se três extrações com diclorometano. Acrescentou-se na fase orgânica restante uma solução saturada de bicarbonato de sódio. Por fim, evaporou-se a fração orgânica a seco. Obtiveram-se 0,4748 g (81%) de um sólido amarelo pálido com ponto de fusão 92,0°C e dados de espectroscopia : RMN¹H (CDCl₃/300MHz) δ (ppm): 3,35 (s, 3H,SO₂CH₂CH₃); 4,29 (s, 3H, NCH₃); 7,93 (s, 1H,H4). RMN¹³C(CDCl₃/75MHz) δ (ppm): 24,38 (CH₂); 34,94 (CH₃); 42,25 (NCH₃); 130,41 (C4); 146,43 (C2) e C5 ausente.

4ª Etapa: Cianação

Colocaram-se 0,234g de 2-etilsulfona-1-metil-5-nitroimidazol com 0,1g de cianeto de potássio e uma quantidade catalítica de éter coroa (crown 6) em um balão de fundo redondo. Adicionaram-se então aproximadamente 5ml de 1,4-dioxano, até a completa dissolução. O meio reacional foi deixado sob agitação por doze horas. Feito isto, evaporou-se o solvente (1,4-dioxano), acrescentou-se água e realizaram-se três extrações com diclorometano. Por fim a solução orgânica foi evaporada. Obtiveram-se 0,2473 g (75%) de um sólido em forma de agulhas cor marrom com ponto de fusão 74,6°C e dados de espectroscopia: RMN¹H (CDCl₃/300MHz) δ (ppm): 4,19 (s, 3H, NCH₃); 8,03 (s, 1H, H4). RMN¹³C(CDCl₃/75MHz) δ (ppm): 35,74 (NCH₃); 109,2 (CN); 125,0 (C2); 132,0 (C4) e C5 ausente.

Nesta etapa o solvente utilizado na reação original foi substituído de dimetilsulfóxido (DMSO) para 1,4-dioxano, resultando em melhores condições operacionais.

5ª Etapa: Ciclização

Em um balão de fundo redondo adicionaram-se 0,27g 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 0,226 g (68%) de um sólido amarelo intenso que foi filtrado a vácuo, apresentando ponto de fusão 270°C e dados de espectroscopia: RMN^1H (DMSO/300MHz) δ (ppm): 4,35 (s, 3H, NCH_3); 7,8 (b, 2H, NH_2); 8,2 (s, 1H, H4). RMN^{13}C (DMSO/75MHz) δ (ppm): 35,0 (NCH_3); 133,1 (C4); 140,1 (C5); 141,4 (C2); 148,2 (C2*); 169,9 (C5*). IR (KBr / ν cm^{-1}) = 3400-3081 (NH e NH_2); 2950 (NCH_3); 1500; 1450; 1390; 920 (anel imidazólico e grupamento nitro). Massa EI (m/z) (%) = 227 (M+H) (80%). Microanálise = calculado : C = 31,83 ; H = 2,67 ; N = 37,15; encontrado : C = 31,64 ; H = 2,62 ; N = 36,41.

6.2.1.2. Metodologias empregadas na obtenção de derivados do megazol

1ºDerivado: Obtenção do 1-metil-2-il-(1,3,4-tiadiazolil-5-aminoacetil)-5-nitroimidazol

Em um balão do fundo redondo colocaram-se 0,08g (0,35mM) de megazol, solubilizado em 20mL de tetrahydrofurano e adicionaram-se 0,07mL (1,06mM) de anidrido do ácido acético, gota a gota. Após 2h a temperatura ambiente ocorre a precipitação do produto desejado, filtrou-se, analisou-se por cromatografia em camada delgada, recristalizou-se em uma mistura etanol:acetona (2:1). Foram obtidos 0,08g (0,27mM) de produto. Rend.: 77% cujos dados de espectroscopia são: RMN¹H (DMSO/300MHz) δ (ppm) = 2,24(s,3H,COCH₃); 4,39(s,3H,CH₃); 8,25 (s,1H,C4). RMN¹³C (DMSO/75MHz) δ (ppm) = 22,3(CH₃CO); 35,2(NCH₃); 133,1(C4); 140,6(C2); 141,0(C5); 153,9(CONH); 159,7(C2*); 169,2(C5*). IR (KBr/v cm⁻¹ = 3123(NH); 2917(CH); 1698(CONH); 1561, 1525; 1460, 1364, 1314; 1270 (anel imidazol e grupamento nitro).

2ºDerivado: Obtenção do 1-metil-2-il-(1,3,4-tiadiazolil-5-aminopropionil)-5-nitroimidazol

Em um balão do fundo redondo colocaram-se 0,08g (0,35mM) de megazol, solubilizado em 20mL de tetrahydrofurano e adicionaram-se 0,05mL (1,1mM) de anidrido do

ácido propiônico, gota a gota. Após 2h a temperatura ambiente ocorre a precipitação do produto desejado, filtrou-se, analisou-se por cromatografia em camada delgada, recristalizou-se em acetona. Obtiveram-se 0,09g (0,2mM) de produto. Rend.: 60%, cujos dados de espectroscopia são: RMN¹H (DMSO/300MHz) δ (ppm) = 1,5(s,2H,CH₂); 2,2(s,3H,CH₃); 4,34(s,3H,CH₃); 7,9 (b,1H,NH); 8,25 (s,1H,C4). RMN¹³C (DMSO/75MHz) δ (ppm) = 28,2(CH₃); 30,7(CH₂); 35,1(NCH₃); 133,1(C4); 140,2(C5); 141,5(C2); 148,3(C2*); 162,7(CONH); 170,1(C5*). IR (KBr/v cm⁻¹) = 3128(NH); 2920(CH); 1698(CONH); 1568, 1505; 1400, 1354, 1300; 1270 (anel imidazol e grupamento nitro).

3ºDerivado: Obtenção do 1-metil-2-il-(1,3,4-tiadiazolil-5-aminotrifluoracetil)-5-nitroimidazol)

Em um balão do fundo redondo colocaram-se 0,08g (0,35mM) de megazol, solubilizado em 20mL de tetrahidrofurano, com duas gotas de piridina e adicionaram-se 0,1mL (1,6mM) de cloreto do ácido trifluoracético, gota a gota. Após 2h a temperatura ambiente ocorre a precipitação do produto desejado, filtrou-se, analisou-se por cromatografia em camada delgada, recristalizou-se em acetona. Obtiveram-se 0,05g (0,2mM) de produto. Rend.: 70%, cujos dados de espectroscopia são: RMN¹H (DMSO/300MHz) δ (ppm) = 4,45(s,3H,CH₃); 8,30 (s,1H,C4).RMN¹³C (DMSO/75MHz) δ (ppm) = 25,3(CF₃CO); 35,9(NCH₃); 133,7(C4); 140,7(C2); 141,8(C5); 154,9(CONH); 159,8(C2*); 169,5(C5*). IR

(KBr/ ν cm^{-1} = 3130(NH); 1768(CONH); 1568, 1466, 1365, 1214; 970 (aneis imidazol e tiadiazólico e grupamento nitro).

4ºDerivado: Obtenção do ácido (1-metil-2-il-(1,3,4-tiadiazolil-5-aminosuccinil)-5-nitroimidazol)

Em um balão de fundo redondo acrescentaram-se 0,226g (1mM) de megazol e acetona à quente até total dissolução. Posteriormente, adicionaram-se 0,13g (1,3mM) de anidrido succínico e deixou-se a reação sob refluxo por quatro horas. Terminado este período o sistema reacional foi colocado em um banho de gelo por vinte e quatro horas e filtrado. Obtiveram-se um sólido amarelo claro 0,0055 g de produto. Rend.1,69%, sendo analisado por cromatografia de camada delgada (com acetato de etila) e com ponto de fusão de 122°C, cujos dados de espectroscopia são: RMN¹H (DMSO/300MHz) δ (ppm) = 2,58(t,2H,H_a); 2,75 (t,2H,H_b); 4,39(s, 3H, CH₃); 8,27 (s, 1H,H₄). IR (KBr/ ν cm^{-1} = 3462(NH e NHCO); 3135(COOH); 2880(CH e CH₃) 1693(CONH); 1568(CONH); 1523, 1345, 1214; 852 (aneis imidazol e tiadiazólico e grupamento nitro).

5º Derivado: Obtenção 1-metil-2-il-(1,3,4-tiadiazolil-5-cloro)-5-nitroimidazol

Em um balão de fundo redondo colocaram-se 20mL de ácido clorídrico concentrado, 80mL de ácido acético glacial e 0,226g (1mmol) de megazol. Posteriormente, adicionaram-se 0,01g de cobre em pó sob agitação e em banho de gelo, e lentamente 10 mL de uma solução 5M de NaNO₂. Nesta etapa é evidenciado um escurecimento do meio reacional. A reação é mantida sob agitação por aproximadamente trinta minutos sob aquecimento e depois por doze horas a temperatura ambiente. Terminado este período, adicionou-se água para efetuar a extração com diclorometano. A fase orgânica obtida foi neutralizada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e evaporada a seco. Neste momento, observa-se um sólido vermelho escuro caracterizando o produto final cujo PF é de 102°C. Peso 0,0184 g. Rend. 7,51%, cujos dados de espectroscopia são: RMN¹H (DMSO/300MHz) δ (ppm) = 4,40(s,3H,CH₃); 8,30 (s,1H,C4). RMN¹³C (DMSO/75MHz) δ (ppm) = 35,3(NCH₃); 133,0(C4); 139,3(C5); 140,9(C2); 155,8(C2*); 162,5(C5*). IR (KBr/v cm⁻¹) = 2921(NCH₃); 1518, 1464, 1376, 1360, 1262 1088; 820 (aneis imidazol e tiadiazólico e grupamento nitro).

6º Derivado - Obtenção 1-metil-2-il-(1,3,4-tiadiazolil-5-metoxi)-5-nitroimidazol

Em um balão de fundo redondo colocaram-se 0,25g (0,1 mmol) do 5-cloro megazol dissolvido em metanol e adicionou-se uma solução metanólica com 0,4 mmol de metóxido de sódio em metanol anidro. Manteve-se a mistura sob agitação e temperatura ambiente por 2h, evaporou-se o solvente e obteve-se um precipitado rosa creme, cujo peso é de 0,12 g. Rend. 50%, cujos dados de espectroscopia são: RMN^1H (DMSO/300MHz) δ (ppm) = 4,25(s,3H, CH_3); 4,48 (OCH_3); 8,00 (s,1H, C_4). RMN^{13}C (DMSO/75MHz) δ (ppm) = 35,56(NCH_3); 133,0(C_4); 135,8(C_2); 140,9(C_5); 154,6(C_2^*); 177,13(C_5^*); 60,32(OCH_3). IR ($\text{KBr}/\nu \text{ cm}^{-1}$ = 2957 (OCH_3); 29245(NCH_3); 1521, 1504, 1361, 1262, 1218, 1091, 1026, 850 (aneis imidazol e tiadiazólico e grupamento nitro).

6.3. Ensaios biológicos

6.3.1. Células Vero

A linhagem de células Vero, derivada de fibroblastos de rim de macaco verde da África, foi obtida no banco de células do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, sendo utilizadas para manutenção do ciclo do *Trypanosoma cruzi* “*in vitro*”.

Estas células foram cultivadas em RPMI-1640 (GIBCO BRL, São Paulo, SP) suplementado com 10 % de soro fetal bovino [R10] (GIBCO BRL, São Paulo, SP); penicilina (200 U/mL; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA); estreptomicina (2,5 µg/mL, Sigma); gentamicina (44 µg/mL; Schering-Plough, São Paulo, SP); bicarbonato de sódio (NaHCO₃; 2 g/L); ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfônico-HEPES 2,38 g/L) e mantidas em atmosfera úmida com 5 % de CO₂ a 37 °C. Quando as células atingiam a confluência eram lavadas com PBS e incubadas com solução de ATV [tripsina 0,2 % e ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 0,02 % (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP)] a 37 °C por 5 minutos, ressuspensas em RPMI com 10 % de SFB (denominado meio R10).

6.3.2. Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Para realizar o controle dos efeitos dos diferentes compostos utilizados nos experimentos, foram realizados ensaios de infecção com formas tripomastigotas de cultura de tecido das cepas G, originariamente isolados de gambá na Região Amazônica por Mena Barreto (Yoshida, 1983).

6.3.3. Ensaios de infectividade

Para os ensaios de infectividade as células foram transferidas para lamínulas de 13 mm em placas de 24 poços (well), infectadas com formas tripomastigotas de cultura de tecido sendo adicionados ao meio diferentes compostos e os respectivos controles. As culturas foram mantidas na presença ou ausência destes compostos por 48 horas e por fim fixadas e coradas com Giemsa para contagem de amastigotas intracelulares.

A determinação do Índice fagocítico foi realizada através da contagem de 200 células/lamínula, em duplicata, com subsequente aplicação da fórmula apresentada abaixo.

$$\text{Índice fagocítico (I.f.)} = \frac{\text{nº. de parasitas intracelulares} \times \% \text{ de células infectadas}}{\text{número de células infectadas}}$$

Em um segundo teste, a atividade dos compostos químicos foi avaliada determinando-se o número de formas tripomastigotas no sobrenadante das culturas de células Vero infectadas, através da contagem destas formas em câmara de New Bauer com um fator de correção (10^4 / mL), após 48 h da presença dos compostos químicos.

Os resultados foram representados em tabelas e gráficos já descritos anteriormente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- ALBUQUERQUE, C.N. **Synthyèse 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.
- ALBUQUERQUE, C.N.; PERIE, J.J. Nova rota de síntese do Megazol [1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-il)-5-nitroimidazol], um antiparasitário ativo contra o *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.35, n.1, p.57-64, 1999.
- AMATO NETO, V. Tratamento específico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Diagn. Trat.**, São Paulo, v.4, n.4, p.21-23, 1999.
- ASATO, G.; BERKELHAMMER, G. Nitroheterocyclic antimicrobial agents: 1-methyl-2-nitro-5-imidazolyl derivatives. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.15, n.10, p.1086-1088, 1972. [Note].
- BERGER, I.; BARRIENTOS, A.C.; CÁCERES, A.; HERNÁNDEZ, M.; RASTRELLI, L. PASSREITER, C.M.; KUBELKA, W. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacol.** V. 62, p. 107-115, 1998.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de chagas. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. p.10-11.
- BURDEN, E.J.; RACETTE, E. 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agente. IX. Action against hemoflagellate infections in laboratory animals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.7, p.545-547, 1968.
- CHAGAS, C.R.J. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.1, p.159-218, 1909.

- COURA, J.R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. p.469-486.
- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.1, p.3-24, 2002.
- CROFT, S.L. Pharmacological Approaches to Antitrypanosomal Chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 215-220, 1999.
- CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; DUCHÊNE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Mol. Chem. Parasitol.**, v. 126, p. 165-172, 2003.
- DE CASTRO, S.L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**, Amsterdam, v.53, n.2, p.83-98, 1993.
- DIAS, J.C.P., JATENE, A.D. Doença de Chagas no Brasil: situação atual e perspectivas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.25, supl.3, p.6-8, 1992.
- DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, A.Z.; BARRAL NETO, M., orgs. ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.48-74.
- DIAS, J.C.P. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, suppl., p.165-169, 2001.
- ELIAS, B.C. **Estudo químico e atividades biológicas de extratos obtidos de culturas de *Penicillium verrucosum* Dierck**. Ribeirão Preto, 2003. 190p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- FERNANDES, A.B. **Vias de sinalização envolvidas na invasão celular por formas amastigotas extracelulares de *T. cruzi* das duas principais linhagens filogenéticas**. São Paulo, 2005. 157p. Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo.

- FREITAS, T.P.S.; FURTADO, N.A. J.C.; BASTOS, J.K.; SAID, S. Active substances against tripomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and microorganisms are produced in sequence by *Talaromyces flavus*. **Microbiol. Res.**, v. 157, n.3, p.201-206, 2002.
- GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M.A. Doenças de Chagas: novas perspectivas no diagnóstico imunológico. **Biotechnol., Cienc. Desenvolv.**, Brasília, ano.1, n.3, p.26-27, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. **Doença de Chagas: textos de apoio**. Brasília: Ministério da Saúde/SUCAM, 1989. 52p. Disponível em: <http://www4.prossiga.br/chagas/doenca/sec/dc-cd-571/dc-cd-571-01.html>. Acesso em: 19 abr. 2005.
- MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J. Schematic representation of the life cycle of the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 2002. Cambridge University Press. Disponível em: <http://www.wormm.cbcu.cam.ac.uk/0200412Xh.htm>. Acesso em: 01 jun. 2005.
- MATEOS, S. Brasil já registrou surto de transmissão oral do mal de Chagas. **Pesq. FAPESP**, São Paulo. v. 112, 2005. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br>. Acesso em: 01 jun. 2005.
- MOREL, C.M.; LAZDINS, J. Chagas disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, Basingstoke, v. 1, p. 14-15, 2003.
- 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.
- MURTA, S.M.F.; GAZZINELLI, R.T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 93, p. 203-214, 1998.

- NAIR, M.D.; NAGARAJAN, K. Nitroimidazoles as chemotherapeutic agent. **Prog. Drug Res.**, Basel, v.27, p.163-252, 1983.
- NEIRA, I.; FERREIRA, A.T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **Int. J. Parasitol.**, Amsterdam, v.32, p.404-414, 2002.
- NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M., eds. **Parasitologia humana**. 9.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1995. p.82-114. (Biblioteca biomédica).
- REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p.25-37.
- SÃO PAULO (Estado). Superintendência de Controle de Endemias. Doenças e vetores. Doença de Chagas: Profissionais da saúde. **Doença de Chagas**. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/>. Acesso em: 15 jul. 2005.
- SCHOFIELD, C.J.; DIAS, J.C.P. A cost-benefit analysis of Chagas disease control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 285-295, 1991.
- STOPPANI, A. O. M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 59, Supl. II, p. 147-165, 1999.
- URBINA, J. A. Chemoterapy of Chagas'Disease: the how and the why. **J. Mol. Med.** V. 77, p. 332-338, 1999.
- VERONESI, R.; ROTBERG, A., eds. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p.703-705.
- WENDEL, S.; BRENER, Z. **Doença de Chagas**: seu impacto na medicina clínica. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/>. Acesso em: 26 maio 2004.

WHITTEN, J.P.; MATTHEWS, D.P. ; MACCARTHY, J.R. [2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl (SEM) as a novel and effective imidazole and fused aromatic imidazole protecting group. **J. Org. Chem.**, Columbus, v.51, n.10, p.1891-1892, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF CHAGAS DISEASE. **Control of Chagas disease**: report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 1991. 95p. (WHO Technical Report Series 811).

WINKELMANN, E.; RAETHER, W.; GREBERT, V.; SINHARAY, A. Chemotherapeutically active nitro compounds. 5-nitroimidazoles (Part I). **Arzneim. Forsch.**, Aulendorf, v.27, n.12, p.2251-2263, 1977.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro. 2002.

ANEXOS

ANEXO A – Célula Vero infectada por *T. cruzi* G (100X) sem tratamento.

As setas indicam formas amastigotas do *T. cruzi* intracelularmente em célula Vero sem tratamento.

ANEXO B – Célula Vero normal sem infecção (100X)

As setas indicam células Vero sem infecção.

ANEXO C – Célula Vero infectada tratada com megazol (100X)

As setas pretas indicam um campo de células com ausência de formas amastigotas caracterizando o tratamento com o megazol e a seta vermelha indica uma célula ainda infectada, entretanto em número muito menor se comparado ao Anexo A de células infectadas sem tratamento.

ANEXO D - Célula Vero infectada tratada com benznidazol (40X)

Neste campo foi evidenciada uma célula tratada com benznidazol, embora em pequeno número, ainda há a presença de amastigotas.

ANEXO E - Célula Vero infectada tratada com 5-propilamidomegazol (40X)

Tratamento da célula realizado com um dos derivados do megazol.

ANEXO F – Espectro de RMN¹H do 5-cloromegazol, DMSO (d₆). ANEXO G – Espectro de RMN¹³C do 5-cloromegazol, em DMSO (d₆).

MEGA ZOL COCH3

PPM

12.88

1.21511

1.21211

1.21011

1.20811

1.20611

1.20411

1.20211

1.20011

1.19811

1.19611

1.19411

1.19211

1.19011

1.18811

1.18611

1.18411

1.18211

1.18011

1.17811

1.17611

1.17411

1.17211

1.17011

1.16811

1.16611

1.16411

1.16211

1.16011

1.15811

1.15611

1.15411

1.15211

1.15011

1.14811

1.14611

1.14411

1.14211

1.14011

1.13811

1.13611

1.13411

1.13211

1.13011

1.12811

1.12611

1.12411

1.12211

1.12011

1.11811

1.11611

1.11411

1.11211

1.11011

1.10811

1.10611

1.10411

1.10211

1.10011

1.09811

1.09611

1.09411

1.09211

1.09011

1.08811

1.08611

1.08411

1.08211

1.08011

1.07811

1.07611

1.07411

1.07211

1.07011

1.06811

1.06611

1.06411

1.06211

1.06011

1.05811

1.05611

1.05411

1.05211

1.05011

1.04811

1.04611

1.04411

1.04211

1.04011

1.03811

1.03611

1.03411

1.03211

1.03011

1.02811

1.02611

1.02411

1.02211

1.02011

1.01811

1.01611

1.01411

1.01211

1.01011

1.00811

1.00611

1.00411

1.00211

1.00011

0.99811

0.99611

0.99411

0.99211

0.99011

0.98811

0.98611

0.98411

0.98211

0.98011

0.97811

0.97611

0.97411

0.97211

0.97011

0.96811

0.96611

0.96411

0.96211

0.96011

0.95811

0.95611

0.95411

0.95211

0.95011

0.94811

0.94611

0.94411

0.94211

0.94011

0.93811

0.93611

0.93411

0.93211

0.93011

0.92811

0.92611

0.92411

0.92211

0.92011

0.91811

0.91611

0.91411

0.91211

0.91011

0.90811

0.90611

0.90411

0.90211

0.90011

0.89811

0.89611

0.89411

0.89211

0.89011

0.88811

0.88611

0.88411

0.88211

0.88011

0.87811

0.87611

0.87411

0.87211

0.87011

0.86811

0.86611

0.86411

0.86211

0.86011

0.85811

0.85611

0.85411

0.85211

0.85011

0.84811

0.84611

0.84411

0.84211

0.84011

0.83811

0.83611

0.83411

0.83211

0.83011

0.82811

0.82611

0.82411

0.82211

0.82011

0.81811

0.81611

0.81411

0.81211

0.81011

0.80811

0.80611

0.80411

0.80211

0.80011

0.79811

0.79611

0.79411

0.79211

0.79011

0.78811

0.78611

0.78411

0.78211

0.78011

0.77811

0.77611

0.77411

0.77211

0.77011

0.76811

0.76611

0.76411

0.76211

0.76011

0.75811

0.75611

0.75411

0.75211

0.75011

0.74811

0.74611

0.74411

0.74211

0.74011

0.73811

0.73611

0.73411

0.73211

0.73011

0.72811

0.72611

0.72411

0.72211

0.72011

0.71811

0.71611

0.71411

0.71211

0.71011

0.70811

0.70611

0.70411

0.70211

0.70011

0.69811

0.69611

0.69411

0.69211

0.69011

0.68811

0.68611

0.68411

0.68211

0.68011

0.67811

0.67611

0.67411

0.67211

0.67011

0.66811

0.66611

0.66411

0.66211

0.66011

0.65811

0.65611

0.65411

0.65211

0.65011

0.64811

0.64611

0.64411

0.64211

0.64011

0.63811

0.63611

0.63411

0.63211

0.63011

0.62811

0.62611

0.62411

0.62211

0.62011

0.61811

0.61611

0.61411

0.61211

0.61011

0.60811

0.60611

0.60411

0.60211

0.60011

0.59811

0.59611

0.59411

0.59211

0.59011

0.58811

0.58611

0.58411

0.58211

0.58011

0.57811

0.57611

0.57411

0.57211

0.57011

0.56811

0.56611

0.56411

0.56211

0.56011

0.55811

0.55611

0.55411

0.55211

0.55011

0.54811

0.54611

0.54411

0.54211

0.54011

0.53811

PPM

162.156
159.741
151.911
141.816
139.609
133.885

CRISTINA 2/DMSO

22.325

OXUR

HAZSOF.110
AU PROG:
V02 AU
DATE 27-3-96

SF 50.324
TD 32768
SW 14285.714

PW 3.8
RG 840
NS 14000

CX 24.00
F1 180.0009P
F2 822P
HZ/CM 377.081
PPM/CM 7.408
SR -3417.50

160 140 120 100 80 60 40 20

PPM

ANEXO J – Espectro de RMN¹H do 5-propilamidomegazol, DMSO (d₆). ANEXO K – Espectro de RMN¹³C do 5-propilamidomegazol, em DMSO (d₆).