UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: ESTUDOS SOBRE A
SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS RECÍPROCOS DE
BIOISÓSTEROS DO HIDROXIMETILNITROFURAL E DE
LIBERADOR DE ÓXIDO NÍTRICO

Ricardo Augusto Massarico Serafim

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2011

Ricardo Augusto Massarico Serafim

ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: ESTUDOS SOBRE A
SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS RECÍPROCOS DE
BIOISÓSTEROS DO HIDROXIMETILNITROFURAL E DE
LIBERADOR DE ÓXIDO NÍTRICO

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou
construir um castelo...”*

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, primeiramente, a Deus, pois, tenho certeza que está presente em todos os momentos da minha vida.

À minha família (meu pai Nicola, minha mãe Rosa Maria e minha irmã Cynthia), que são tudo para mim, por se dedicarem sempre ao máximo para a realização deste sonho. O meu AGRADECIMENTO ETERNO a vocês!

À minha avó Rosa, pelo grande exemplo de farmacêutica e dedicação profissional.

À minha namorada Marina Primi, pelo incentivo e companhia diária, tanto nos momentos bons quanto nos mais difíceis. Com certeza, há uma parcela sua em todas as minhas conquistas. PAIXÃO, OBRIGADO!

À minha orientadora Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira, por ter me aceitado como orientando, pela essencial orientação no decorrer do trabalho e pelos profundos ensinamentos em Química Farmacêutica.

À minha amiga Profa. Dra. Elisabeth Brossi, por suas brilhantes aulas de Bioquímica, por suas orientações e incentivos a seguir no fascinante e árduo mundo da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Gustavo Trossini, pelos auxílios na parte de modelagem molecular realizada neste trabalho.

Ao Dr. Márcio Zaim e ao Prof. Dr. Ronan Batista, pelos ensinamentos e contribuições na parte sintética.

À Dra. Kerly Pasqualoto, pelos fundamentais ensinamentos teórico e prático em modelagem molecular.

À Profa. Dra. Carlota Yagui e suas alunas Camila, Marcela e Juliana, pela disponibilização de vidrarias e equipamentos do seu laboratório sempre que foi necessário.

Aos colegas e ex-colegas do LAPEN: Jeanine, Vanessa, Bárbara, Soraya, Andressa, Fred, Hamilton e Kely.

Aos amigos Natan e Charles pelo agradável convívio no laboratório.

Ao meu orientador de iniciação científica, na Universidade Católica de Santos, Prof. Dr. Luiz Paulo Geraldo, por me ensinar muito sobre pesquisa e critério científico.

À Dra. Maria Inês, pela elaboração dos espectros de RMN presentes nessa dissertação.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP pelas bolsas concedidas no decorrer deste trabalho.

SERAFIM, R. A. M. **ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: ESTUDOS SOBRE A SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS RECÍPROCOS DE BIOISÓSTEROS DO HIDROXIMETILNITROFURAL E DE LIBERADOR DE ÓXIDO NÍTRICO.** 2011. 76p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.

RESUMO

A doença de Chagas é uma parasitose extremamente negligenciada, cujo agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Atualmente, 21 países da América Latina são considerados regiões endêmicas, onde 75-90 milhões de pessoas estão expostas à infecção, 15-16 milhões estão infectadas e mais de 41 mil novos casos surgem por ano, entretanto, apenas os fármacos nifurtimox e benznidazol estão disponíveis no mercado. Estes, além da baixa eficácia na fase crônica da parasitose, apresentam diversos efeitos colaterais, sendo que no Brasil apenas o benznidazol é utilizado. Essa carência no arsenal terapêutico contra a doença de Chagas conduz à importância de buscar quimioterápicos mais eficazes para o seu tratamento. Face ao exposto, o objetivo do trabalho foi a síntese de compostos com dupla atividade contra o *T. cruzi*, utilizando a metodologia da latenciação de fármacos, em que os derivados ativos são bioisósteros de compostos nitro-heterocíclicos, sintetizados em nosso grupo de pesquisa. Os derivados propostos são pró-fármacos recíprocos do nitrofural hidroximetilado (NFOH) e de seus bioisósteros, promissores com respeito à inibição da cruzaina, com o grupamento liberador de óxido nítrico. Podem, deste modo, atuar de forma dupla na inibição da enzima cruzaina e, também, em outras cisteíno-proteases através da ação do óxido nítrico liberado. Além disso, poderiam ser inibidores de tripanotona redutase, como ocorre com outros nitrocompostos. A síntese dos compostos intermediários foi realizada com êxito, com exceção do composto NFSOH, o qual não foi possível ser isolado. A metodologia *solvent-free* mostrou-se como alternativa para a síntese do NF e análogos contendo semicarbazona. Utilizaram-se diferentes métodos (direto e indireto) e diversas variações nas condições reacionais para a síntese dos ésteres nitratos correspondentes. No entanto, não se obtiveram os pró-fármacos propostos, provavelmente devido à baixa reatividade dos nitro-heterocíclicos hidroximetilados.

Em paralelo, efetuaram-se estudos de Modelagem Molecular para se avaliar a possível interação com o alvo molecular, a cruzaina. A análise dos Mapas de Potencial Eletrostático (MEP) sugeriu maior deficiência eletrônica nos compostos com tiossemicarbazona. Entretanto, estudos de *docking* mostraram possível preferência de ataque nucleofílico da Cys25 ao grupo éster nitrato em relação à carbonila/tiocarbonila, sugerindo inativação da cruzaina pela formação de S-nitrosotiol.

Palavras-Chaves: Doença de Chagas, Antichagásicos potenciais, Hidroximetilnitrofural, Liberadores de óxido nítrico, Latenciação, Bioisósteros.

SERAFIM, R. A. M. **POTENTIAL ANTICHAGASIC AGENTS: STUDIES ON MUTUAL PRODRUG SYNTHESSES OF HYDROXYMETHYLNITROFURAZONE BIOISOSTERES AND NITRIC OXIDE RELEASING GROUP.** 2011. 76p. Major's Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2011.

ABSTRACT

Chagas' disease is an extremely neglected disease, whose etiologic agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Nowadays, 21 countries in Latin America have been considered endemic area, in which 75-90 million people are exposed to infection, 15-16 million are infected and more than 41 thousands new cases are registered each year. However, nifurtimox and benznidazol are the only drugs available in the market. Besides, their low efficiency in the chronic phase of disease, they cause several side effects and in Brazil only benznidazol is applied. This scarce therapeutic armamentarium shows the importance of seeking for more effective drugs against Chagas' disease. For these reasons, this study aims the synthesis of compounds with dual activity against *T. cruzi*, using the prodrug design with the active bioisosters of nitro-heterocyclic, synthesized in our research group. The derivatives proposed are mutual prodrugs of hydroxymethylnitrofurazone (NFOH) and its bioisosters, promising with respect to cruzain inhibition, with NO-releasing group. Thus, they could act with a dual mechanism, in cruzain enzyme and also in other cysteine-proteases through the nitric oxide released action. Besides, they could be trypanothione reductase inhibitors, as stated to other nitro compounds. The synthesis of the intermediate compounds was carried out successfully, except for the NFSOH compound, which could not be isolated. The solvent-free methodology proved to be an alternative for synthesis of nitrofurazone and analogues containing semicarbazone. Different methods (direct and indirect) and several variations in reaction conditions were used for the synthesis of nitrate esters proposed. Nevertheless, the prodrugs were not obtained, probably due to the low reactivity of the hydroxymethyl nitro-heterocyclic employed. At the same time, molecular modeling studies to evaluate the possible interaction with the macromolecular target cruzain were performed. The analysis of electrostatic potential maps (MEP) suggests a greater electronic impairment in compounds containing thiosemicarbazone

function. Docking studies, however, showed a possible preference to the nucleophilic attack of Cys25 in the nitrate ester relatively to the carbonyl/thiocarbonyl group, suggesting cruzain inactivation by *S*-nitrosotiol formation.

Keywords: Chagas' disease, Potential antichagasic agents, Hidroxymethylnitrofurazone, Nitric oxide releasing, Prodrug design, Bioisosters.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 – <u>DOENÇA DE CHAGAS</u>	01
1.1.1 – HISTÓRICO	01
1.1.2 – EPIDEMIOLOGIA	02
1.1.3 – TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO	05
1.1.4 – SINTOMATOLOGIA	07
1.1.5 – DIAGNÓSTICO	09
1.1.6 – PREVENÇÃO	09
1.2 – <u>QUIMIOTERAPIA</u>	10
1.2.1 – QUIMIOTERÁPICOS DISPONÍVEIS	10
1.2.2 – QUIMIOTERÁPICOS EM ESTUDO	11
1.2.2.1 – Inibidores da cisteíno-protease	11
1.2.2.2 – Inibidores da tripanotiona redutase	13
1.2.2.3 – Inibidores da síntese de esteróis	15
1.2.2.4 – Compostos liberadores de óxido nítrico	17
1.2.2.5 – Compostos com mecanismos diferenciados	19
1.3 – <u>PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA MODIFICAÇÃO MOLECULAR</u>	20
1.3.1 – BIOISOSTERISMO	20
1.3.2 – LATENCIAÇÃO	23
1.3.2.1 – Pró-fármacos clássicos	24
1.3.2.2 – Bioprecursores	24
1.3.2.3 – Pró-fármacos mistos	25
1.3.2.4 – Pró-fármacos recíprocos	26
1.3.2.5 – Fármacos dirigidos	27
1.4 – <u>PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS E A MODELAGEM MOLECULAR</u>	28
1.4.1. - DOCKING	29
1.4.2 – AVALIAÇÃO TEÓRICA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA	30
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	33

3.1 – <u>REAGENTES E SOLVENTES</u>	33
3.2 – <u>EQUIPAMENTOS</u>	34
3.3 – <u>MÉTODOS DE ANÁLISE</u>	34
3.4 – <u>SÍNTESE (PRIMEIRA PARTE)</u>	34
3.4.1 – SÍNTESE TRADICIONAL DO NITROFURAL (NF) E DE SEUS BIOISÓSTEROS.....	34
3.4.2 – SÍNTESE <i>SOLVENT-FREE</i> DO NF E SEUS BIOISÓSTEROS.....	35
3.5 – <u>SÍNTESE (SEGUNDA PARTE)</u>	36
3.5.1 – SÍNTESE DO HIDROXIMETILNITROFURAL (NFOH) E DE SEUS BIOISÓSTEROS.....	36
3.6. – <u>SÍNTESE (TERCEIRA PARTE)</u>	38
3.6.1 – TENTATIVAS DE SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS RECÍPROCOS.....	38
3.6.1.1 – Método direto	38
3.6.1.2 – Método indireto	39
3.6.1.2.1 – <i>Experimento 1</i>	39
3.6.1.2.2 – <i>Experimento 2</i>	40
3.7 – <u>MODELAGEM MOLECULAR</u>	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 – <u>SÍNTESE (PRIMEIRA PARTE)</u>	41
4.1.1 – SÍNTESE TRADICIONAL DO NF E SEUS BIOISÓSTEROS.....	41
4.1.2 – COMPARAÇÃO ENTRE SÍNTESE TRADICIONAL E <i>SOLVENT-FREE</i> DO NF E SEUS BIOISÓSTEROS.....	49
4.2 – <u>SÍNTESE (SEGUNDA PARTE)</u>	50
4.3 – <u>SÍNTESE (TERCEIRA PARTE)</u>	57
4.3.1 – MÉTODO DIRETO	57
4.3.2 – MÉTODO INDIRETO	64
4.4 – <u>MODELAGEM MOLECULAR</u>	66
5. CONCLUSÕES	68
6. PERSPECTIVAS	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ANEXO – ATIVIDADES ACADÊMICAS.....	76
---	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE CHAGAS

1.1.1 - HISTÓRICO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma antropozoonose frequente na América Latina, sendo Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (*Figura 1*) o descobridor e cientista pioneiro nas pesquisas sobre essa parasitose (NEVES, 2003; ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010).

Entre os anos de 1907 e 1909, com o intuito de chefiar projetos no combate à malária em Minas Gerais, Carlos Chagas mudou-se para a cidade de Lassance. Ao analisar insetos comuns na região (“barbeiros”), deparou-se com um hemoflagelado inusitado, o qual apresentava cinetoplasto grande e intensa movimentação, concluindo, posteriormente, que se tratava de *Trypanosoma* de uma espécie a ser decifrada. Este fato fez com que Chagas procurasse este parasita no sangue de pessoas e animais que estavam em contato com o barbeiro (NEVES, 2003).

Em abril de 1909, Carlos Chagas concretizou sua busca, encontrando o parasita em menina de dois anos de idade, que havia sido picada por barbeiros. Após a descoberta, Chagas aprofundou suas pesquisas sobre as características biológicas e morfológicas do parasita, o qual foi denominado *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (NEVES, 2003).

Essa descoberta foi de alto impacto em nível nacional e internacional, todavia, mantinha-se rodeada de incertezas por parte da comunidade científica da época, em relação à sua relevância, epidemiologia e características clínicas. O médico Cecilio Romana descreveu, então, algumas peculiaridades clínicas, que facilitariam a identificação de casos agudos da doença de Chagas, levando, assim, ao diagnóstico de centenas de casos, pelo “sinal de Romana”. Em 1937, Evandro Chagas (filho de Carlos Chagas) fundou, no Instituto Oswaldo Cruz, o SEGE (Serviço de Estudos das Grandes Endemias) com a finalidade de encontrar novos casos da doença de Chagas a partir da divulgação do “sinal de Romana” entre os médicos da região (KROPF, 2005).

No ano do centenário de sua descoberta, realizaram-se eventos, nos quais cientistas de diversos países se reuniram para abordar e discutir temas a respeito da doença de Chagas. Entre eles, merece realce o Simpósio Internacional do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas, na cidade do Rio de Janeiro (VOELKER, 2009).

O grande feito de Carlos Chagas permanece até os dias de hoje, influenciando grupos de pesquisas em diversos países da América Latina, que atuam na busca ativa para a descoberta de novos quimioterápicos contra o *T. cruzi* (KROPF, 2000; DIAS *et al.*, 2009).

Figura 1: Foto de Carlos Chagas em seu laboratório no Instituto Oswaldo Cruz.

Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Carlos_chagas_2.jpg.

1.1.2 - EPIDEMIOLOGIA

A doença de Chagas tem sua maior incidência na América Central, do Sul, México e alguns casos foram relatados na fronteira com os Estados Unidos (*Figura 2*), Europa, Ásia e Oceania, representando grave risco de saúde pública e mantendo suas manifestações clínicas e características epidemiológicas distintas entre as diversas áreas endêmicas (WHO, 2007; COURA, DIAS, 2009; WHO, 2010; ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010).

Figura 2: Distribuição doença de Chagas na América Latina.
Fonte: COURA, DIAS (2009).

Desde o início dos anos 1990, inúmeros esforços por parte de instituições, como a OMS, Organização Mundial da Saúde, estão sendo direcionados em várias regiões das Américas para o controle da doença de Chagas. Estes incluem campanhas para a eliminação do vetor, análise das principais tendências de transmissão e caracterização clínica e epidemiológica da doença nas regiões incidentes, resultando na redução de 50% dos casos de pessoas infectadas, conforme *Tabela I*. Países como Brasil, Uruguai e Chile estão livres da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, considerado o principal vetor domiciliar nesses países (WHO, 2007; COURA, DIAS 2009; ANIS, ANIS, MARINETO, 2010).

Todavia, novos problemas epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos têm sido criados com a internacionalização da doença de Chagas devido à migração legal e ilegal de pessoas provenientes de países endêmicos da América Latina para países não-endêmicos (EUA, França, Suíça, Espanha, Austrália, Japão, entre

outros) (Figura 3). Essas migrações têm gerado novos problemas de saúde pública para esses países, os quais incluem riscos de transfusão sanguínea e transmissão congênita (WHO, 2007; COURA, DIAS, 2009; ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010).

Figura 3: Esquema do Fluxo Migratório na Doença de Chagas.
Fonte: WHO (2007).

Atualmente, nos 21 países considerados regiões endêmicas, estima-se que 75-90 milhões de pessoas estão expostas à infecção, 15-16 milhões estão infectadas e mais de 41 mil novos casos surgem por ano. Tal cenário enfatiza a importância da manutenção dos programas de controle para a eliminação do vetor domiciliar, melhoria nos métodos diagnósticos da doença e pesquisa de novos fármacos ativos contra o agente etiológico (WHO, 2007; COURA, DIAS, 2009; WHO, 2010; ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010).

Tabela I: Comparação dos parâmetros epidemiológicos da doença de Chagas entre os anos 1990, 2000 e 2006

Parâmetros Epidemiológicos	1990	2000	2006
Óbitos por Ano	> 45.000	21.000	12.500
Casos de Infecção Humana	30 milhões	18 milhões	15 milhões
Novos Casos	700.000	200.000	41.200
População em Risco	100 milhões	40 milhões	28 milhões
Distribuição	21 países	21 países	21 países

Fonte: WHO (2007).

1.1.3 - TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO

A transmissão da doença de Chagas ocorre através da introdução do agente etiológico (*T. cruzi* – *Figura 4*) no organismo humano, estando intimamente associada à pobreza e a insatisfatórias condições de salubridade, principalmente em ambientes rurais, provocando a busca dos infectados por melhores condições médicas nas áreas urbanas (WHO, 2007; ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010).

Figura 4: *Trypanosoma cruzi* na forma sanguínea tripomastigota.

Fonte:

http://www.fam.br/microrganismos/protozoologia_modos_de_motilidade.htm

A doença de Chagas frequentemente encontra-se em locais onde outras patologias coexistem, porém seus dados epidemiológicos são imensuráveis devido à subnotificação existente (WHO, 2007; ALVES *et al.*, 2009). Pode-se citar como os principais meios de transmissão:

Transmissão pelo triatomíneo: ocorre pela dejeção do vetor infectado (principalmente o *Triatoma infestans*) sobre a pele humana, sendo o mecanismo de eliminação da forma infectante tripomastigota metacíclica do *T. cruzi*. Essa forma infectante é introduzida na corrente sanguínea pelo orifício da picada, através do ato de coçar o local feito pelo indivíduo após a ação do vetor, como resposta alérgica à saliva do inseto. Outras espécies de triatomíneos também podem ser vetores da doença de Chagas em humanos, dentre elas o *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*. Atualmente, essa forma de transmissão ainda é responsável por 70% dos casos em países onde

não há sistemas para o controle do vetor (LENNOX *et al.*, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1990; DIAS, 1994; COURA, DIAS, 2009; WHO, 2010).

Transmissão por transfusão sanguínea: mais de 20% da transmissão da doença de Chagas ocorre pelo processo de transfusão sanguínea, principalmente em lugares onde não há controle nos bancos de sangue, como é o caso da Bolívia. O parasita permanece viável no sangue armazenado em geladeiras por cerca de mais de duas semanas, obrigando países a realizarem triagens sanguíneas antes de transfusões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1990; LENNOX *et al.*, 2007; CANADIAN MEDICAL ASSOCIATION JOURNAL, 2007; COURA, DIAS, 2009; WHO, 2010).

Transmissão congênita: ocorre durante a gravidez, quando a mãe transmite o *T. cruzi* para o feto. Tem característica assintomática e na maioria das vezes não é diagnosticada em recém-nascidos. Exibe variação de 0,5-10% na influência de transmissão, em países como Chile, Bolívia e Paraguai (LENNOX *et al.*, 2007; COURA, DIAS, 2009; WHO, 2010).

Transmissão por transplante de órgãos: casos de transmissão por transplante de órgãos ocorrem principalmente na América Latina, entretanto, nos EUA já foram relatados três casos de aquisição da doença através do transplante de órgãos, relacionados com imigrantes da América Central (LENNOX *et al.*, 2007; WHO, 2010).

Transmissão por via oral: alguns estudos demonstram a possibilidade de transmissão pela via digestiva, devido à ingestão de alimento contaminado. No Brasil, verificou-se a transmissão por caldo de cana e suco de açaí contaminado. Embora accidental, atualmente pode ser considerada endêmica na região do Amazonas (REY, 2001; COURA, DIAS, 2009; WHO, 2010).

Após a introdução da forma tripomastigota metacíclica na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (*Figura 5*), o *T. cruzi* interage com as células do sistema fagocítico mononuclear da pele ou mucosas, ocorrendo neste local a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, os quais se multiplicam por divisão binária simples (ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001).

Após 4 a 6 dias, as formas amastigotas se diferenciam em forma tripomastigota e, desta maneira, após lisarem as células hospedeiras (através do metabolismo parasitário), são liberadas para o interstício, infectando outras células vizinhas, ou caem na circulação sanguínea ou linfática, terminando por colonizar

outras regiões do organismo (ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001).

No sangue, os parasitas podem ter vida longa, mas somente nos períodos iniciais de infecção (fase aguda), pois quando sofrem processo de destruição parasitária por parte dos mecanismos imunológicos do hospedeiro, a parasitemia diminui repentinamente. Na fase crônica, a presença do parasita no sangue ocorre raramente, necessitando de diagnósticos especiais para sua demonstração (ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001).

As formas intracelulares (amastigotas) possuem tropismo por fibras musculares esqueléticas e cardíacas, sendo comuns patologias cardíacas relacionadas à doença de Chagas (ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001).

O *T. cruzi* na corrente sanguínea pode, também, ser ingerido por triatomíneos, fazendo o seu ciclo extracelular no interior dos insetos (NEVES, 2003; REY, 2001).

Figura 5: Esquema do Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>

1.1.4 - SINTOMATOLOGIA

A doença de Chagas é uma patologia em que as manifestações clínicas podem ser divididas em três fases: aguda, indeterminada e crônica (ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001).

Fase aguda: os sintomas podem aparecer entre 8 e 10 dias após a infecção e permanecer durante 8 a 10 semanas. Apenas 1 a 4% dos casos, principalmente

crianças, exibem clinicamente os sintomas, os quais podem ser inespecíficos, como: mal-estar, febre, vômitos, diarreias, anorexia, erupções cutâneas, taquicardia e irritação meníngea, fazendo com que os pacientes não recorram a auxílio médico, impedindo, assim, o diagnóstico precoce e facilitando a evolução da doença. Meningoencefalite e miocardite aguda podem contribuir em 5 a 10% dentre todos os casos sintomáticos. Todavia, os sinais mais relevantes na fase aguda são conhecidos como o “sinal de Romaña”, em que os olhos se incham devido ao ferimento provocado pela picada do vetor nesta região, ou “chagoma”, quando a picada ocorre na pele, originado nódulos ou furúnculos (ANIS, ANIS, MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001).

Aproximadamente 80% dos pacientes chagásicos sintomáticos desenvolvem “chagoma”. Os sintomas da fase aguda desaparecem espontaneamente em 90% dos infectados. Entretanto, caso não seja tratada, a fase aguda pode progredir para a fase indeterminada ou para a crônica. (LENNOX *et al.*, 2007; NEVES, 2003; CORBETT *et al.*, 2002).

Fase indeterminada: é a denominada fase silenciosa ou fase assintomática dessa patologia, podendo durar cerca de 10 a 30 anos. É capaz de persistir indefinidamente, fazendo com que nem todo indivíduo infectado progrida para a fase crônica. Durante essa fase o parasita migra por todo o corpo via circulação sanguínea e linfática, penetrando nas células hospedeiras e causando lise celular. O eletrocardiograma e os estudos radiográficos do coração, esôfago e cólon normalmente estão inalterados. Todavia, podem ser notadas leves anormalidades cardíacas na ecocardiografia e em testes de estresse (LENNOX *et al.*, 2007).

Fase crônica: manifesta-se mais frequentemente pelas complicações cardíacas e os sintomas desenvolvem-se em cerca de 10 a 30% dos indivíduos infectados, normalmente entre homens de 20 a 50 anos de idade. Manifestações cardíacas comuns incluem insuficiência cardíaca congestiva, tromboembolismo, cardiomegalia, aneurisma e arritmias geralmente associadas a inflamações viscerais e deservação parassimpática. As complicações cardíacas geram óbitos em aproximadamente 38% dos casos. Manifestações neuromusculares também são características nesta fase, devido ao fato de o parasita atingir músculos lisos, esqueléticos e o tecido nervoso (LENNOX *et al.*, 2007).

1.1.5 - DIAGNÓSTICO

O diagnóstico inicia-se com a avaliação clínica do paciente, identificando sinais característicos como o “chagoma”, denominado sinal de porta de entrada (REY, 2001; NEVES, 2003).

Em razão da alta parasitemia na fase aguda, utiliza-se o método direto de identificação do parasita através da visualização microscópica no sangue, podendo-se, também, utilizar métodos como a biópsia do linfonodo por punção, imunofluorescência indireta e hemaglutinação (REY, 2001; NEVES, 2003).

Já na fase crônica diagnosticam-se pouco mais de 50% dos casos, através de imunofluorescência, hemaglutinação, reação imunoenzimática (ELISA) e radioimunoensaio, sendo úteis também o xenodiagnóstico, a hemocultura e a inoculação em animais de ensaio. As alterações cardíacas identificadas pelos raios X e eletrocardiogramas são relevantes, porém, os testes laboratoriais são indispensáveis (REY, 2001; NEVES, 2003).

1.1.6 - PREVENÇÃO

A prevenção da doença de Chagas pode ser realizada através do uso de inseticidas de ação residual desde que se identifique a presença do inseto vetor domiciliado. Melhorias físicas nas habitações também são sugeridas, quando a infestação é geograficamente limitada ou peridomiciliar, entretanto, deve-se considerar como foco maior a promoção e a melhoria da qualidade de vida. Realização de triagem sorológica é de extrema importância para se evitar casos de transmissão transfusional, assegurando a exclusão de todo indivíduo chagásico nos bancos de sangue. Diversos programas para o controle da doença de Chagas, principalmente com foco na eliminação dos vetores, estão sendo realizados em diversos países, com resultados satisfatórios, enfatizando a importância da manutenção desse tipo de estratégia para maior diminuição nos números referentes a novos casos da parasitose (OPAS, 2001).

1.2 – QUIMIOTERAPIA

1.2.1 – QUIMIOTERÁPICOS DISPONÍVEIS

Apenas dois fármacos são atualmente aceitos no tratamento quimioterápico da doença de Chagas: nifurtimox e benznidazol (*Figura 6*). No Brasil, apenas o benznidazol é utilizado. O primeiro é um nitrofurano que age produzindo metabólitos oxigenados altamente reativos, como o peróxido de hidrogênio, uma vez que o *T. cruzi* tem mecanismos ineficientes para a destoxificação destes compostos. É, portanto, mais sensível ao estresse oxidativo em relação às células dos vertebrados. Já o segundo é um derivado nitroimidazólico, o qual parece atuar através do estresse redutivo envolvendo ligações covalentes em macromoléculas essenciais para a fisiologia do parasita (DIAS *et al.*, 2009; WILKINSON, KELLY, 2009; URBINA, DOCAMPO, 2003; URBINA, 2010).

Figura 6: Estrutura molecular dos fármacos atualmente utilizados no tratamento da doença de Chagas.

Ambos os fármacos são ativos na fase aguda da doença, com cura parasitológica acima de 80% em pacientes tratados. Entretanto, eles apresentam baixo índice de eficácia na fase crônica; mais de 80% dos pacientes tratados nesta fase não obtêm a cura parasitológica (DIAS *et al.*, 2009; WILKINSON, KELLY, 2009; URBINA, DOCAMPO, 2003; URBINA, 2010).

Fatores como a presença de diversos efeitos colaterais gerados pelo nifurtimox e benznidazol, como vômitos, anorexia, alergia (provavelmente devido a danos oxidativos e redutivos ocasionados no tecido do hospedeiro) e a diferença de suscetibilidade às diferentes cepas do *T. cruzi* também influenciam na adesão e

eficácia dos fármacos utilizados na quimioterapia atual (DIAS *et al.*, 2009; WILKINSON, KELLY, 2009; URBINA, DOCAMPO, 2003; URBINA, 2010).

1.2.2 – QUIMIOTERÁPICOS EM ESTUDO

1.2.2.1 - Inibidores da cisteíno-protease

A principal endoprotease do *T. cruzi* é denominada cruzipaína, também conhecida como cruzaína (enzima recombinante) ou gp51/57, capaz de digerir diversos tipos de proteínas (CAZZULO, 2005).

A cruzaína (*Figura 7*) é diferencialmente expressa em vários estágios biológicos do parasita, envolvendo-se em diversas etapas do ciclo de vida e sendo essencial para seu crescimento e sobrevivência. Em sua maior parte, é uma enzima lisossômica, podendo, também, existir isoformas associadas à membrana plasmática do parasita (CAZZULO, 2005; DURRANT *et al.*, 2010). Esta enzima pode estar envolvida na penetração da forma tripomastigota na célula mamífera e, também, no processo de escape do parasita do mecanismo imunológico do hospedeiro. Pelo fato de ela ser a principal protease lisossômica, espera-se que desempenhe papel importante na nutrição parasitária ou, pelo menos, nas formas em desenvolvimento presentes no inseto hematófago vetor (CAZZULO, 2005; URBINA, DOCAMPO, 2003; DURRANT *et al.*, 2010).

Figura 7: Estrutura cristalográfica da cruzaína.
Fonte: <http://www.pdb.org>

Inibidores da cruzaina atuam interferindo com a realização correta do ciclo biológico do parasita, sendo um alvo extremamente visado para a síntese de novos fármacos anti-*T. cruzi* (KERR *et al.*, 2009; CAZZULO, 2005; URBINA, DOCAMPO, 2005).

Dentre os compostos em estudos com essa atividade alguns podem ser citados (*Figuras 8-10*): *N*-metil-piperazina-uréia-Phe-homo-Phe-vinil-fenil-sulfona (A), morfolinouréia-Phe-homo-Phe-vinil-fenil-sulfona (B), tiossemicarbazonas (C), 1,2,3-triazol tetrafluorfenoximetilcetona (D) e o 1-(3-hidroxi-7-metoxi-2-naftilcarbonila)-2-(2-hidroxi-1-naftilmetileno)hidrazina (E) (KERR *et al.*, 2009; CAZZULO, 2005; URBINA, DOCAMPO, 2003; BRAK *et al.*, 2010).

Figura 8: Estrutura dos compostos *N*-metil-piperazina-uréia-Phe-homo-Phe-vinil-fenil-sulfona (A) e morfolinouréia-Phe-homo-Phe-vinil-fenil-sulfona.

Figura 9: Estrutura geral das tiossemicarbazonas lineares e cíclicas.

Figura 10: Estrutura da família das 1,2,3-triazol tetrafluorfenoximetilcetona e das *bis*-arilacil-hidrazidas.

1.2.2.2 - Inibidores da tripanotona redutase

A tripanotona redutase (TR – *Figura 11*) é um alvo molecular validado para o planejamento de inibidores de utilidade na doença de Chagas (OLIVEIRA *et al.*, 2008; RIVAROLA, PAGLINI-OLIVA, 2002; URBINA, DOCAMPO, 2003).

Esta enzima é dependente de NADPH e catalisa a redução da tripanotona dissulfeto em tripanotona ditiol, ocorrendo, assim, cascata de eventos responsáveis pela neutralização de radicais livres e espécies reativas de oxigênio emitidas pelo sistema imune do hospedeiro. Mantém, dessa forma, ambiente redutor no interior do parasita, auxiliando seu crescimento e seu desenvolvimento. Outra característica de extrema relevância é a diferença estrutural da TR em relação à glutathione redutase (enzima utilizada no sistema redox do homem), possibilitando, assim, a inibição seletiva apenas da TR (OLIVEIRA *et al.*, 2008; RIVAROLA, PAGLINI-OLIVA, 2002; PAGLINI-OLIVA, RIVAROLA, 2003; URBINA, DOCAMPO, 2003).

Figura 11: Estrutura cristalográfica da tripanotiona redutase com seus cofatores.
 Fonte: <http://www.pdb.org>

Fenotiazínicos são compostos com ação no sistema nervoso central, agindo, especificamente, no bloqueio dos receptores de dopamina. Estudos apontam alguns desses compostos como ativos na inibição da TR em ambos os estágios do *T. cruzi* (epimastigota e tripomastigota), destacando-se pela maior eficiência de ação a clorpromazina e a tioridazina (Figura 12). Tal fato mostra que estes compostos são tripanomicidas promissores (RIVAROLA, PAGLINI-OLIVA, 2002; PAGLINI-OLIVA, RIVAROLA, 2003).

Clorpromazina

Tioridazina

Figura 12: Fenotiazínicos utilizados como inibidores da tripanotiona redutase.

O composto 2,5-bis-(4-aminobenzil)furano (Figura 13), da classe dos arilfuranos, apresenta ação diferenciada no sítio ativo da enzima, mostrando maior afinidade por esta, além de propriedades farmacocinéticas adequadas, e é responsável por 63% de inibição da enzima (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Derivados nitrofurânicos apresentam inativação irreversível na enzima TR, como pode ser o caso do composto hidroximetilnitrofural - NFOH-121 (*Figura 13*), utilizado como um intermediário na síntese do pró-fármaco recíproco de nitrofural e primaquina, que mostrou elevada potência antichagásica *in vitro* contra as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, mutagenicidade diminuída e valor da DL₅₀ > 2g/Kg (CHUNG *et al.*, 2003, 2008; DAVIES *et al.*, 2010).

Figura 13: Derivado arilfurano com atividade anti-TR e derivado hidroximetilado do nitrofural, de potencial atividade inibidora dessa enzima.

1.2.2.3 - Inibidores da síntese dos esteróis

O *T. cruzi* necessita de determinados esteróis (lanosterol, ergosterol e análogos) para sua proliferação em todos os estágios durante a vida. Esses esteróis são suscetíveis a compostos que inibam enzimas essenciais à sua biossíntese, fazendo com que o sistema imune se encarregue de eliminar o parasita (URBINA, DOCAMPO, 2003; FERRAZ *et al.*, 2007; SOUZA, RODRIGUES, 2009; URBINA, 2010).

Alguns fármacos fungicidas (compostos azólicos) apresentam essa propriedade, sendo considerados os primeiros compostos descritos no tratamento de ambas as formas da parasitose, aguda e crônica (URBINA, DOCAMPO, 2003; SOUZA, RODRIGUES, 2009; FERRAZ *et al.* 2007; URBINA, 2009; URBINA, 2010).

O itraconazol e o cetoconazol atuam na enzima lanosterol C14 α -desmetilase (*Figura 14*), a qual é responsável pela biossíntese do ergosterol. Estudos apontam que a utilização de inibidores da oxidosqualeno sintase juntamente com inibidores de outro esterol têm ação sinérgica relevante. (BUCKNER *et al.*, 2001; URBINA, 2009).

O posaconazol (*Figura 15*), análogo estrutural do itraconazol, está atualmente entre os candidatos pioneiros para testes clínicos em pacientes com doença de Chagas (URBINA, DOCAMPO, 2003; URBINA, 2009; URBINA, 2010).

Figura 14: Estrutura cristalográfica da lanosterol C14 α -desmetilase com o ligante posaconazol.

Fonte: <http://www.pdb.org>

Figura 15: Estrutura molecular do posaconazol.

Deste modo, as enzimas correspondentes às rotas biossintéticas dos esteróis são alvos promissores para a síntese de fármacos tripanomicidas (URBINA, DOCAMPO, 2003; FERRAZ *et al.*, 2007; BUCKNER *et al.*, 2001).

1.2.2.4 - Compostos liberadores de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é considerado importante molécula com propriedades citotóxicas e citostáticas para diversos organismos parasitários. Terapias contra o *T. cruzi* através de compostos liberadores de NO apontam um interessante caminho alternativo para a síntese de novos agentes tripanomicidas (SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 1993; QUEIROZ, BATISTA, 1999; SILVA *et al.*, 2007; BRUNET, 2001).

Do ponto de vista fisiopatológico, a produção induzida de NO através dos macrófagos durante a fase aguda da doença de Chagas pode atuar lisando o agente etiológico. Estas células apresentam a forma induzida da NO sintase (iNO), cuja ativação ocorre por indução de citocinas (interferona- γ e TNF- α), as quais são liberadas por algumas células do sistema imunológico. Essa liberação é prolongada por diversas horas em concentrações altas para serem tóxicas às células bacterianas ou tumorais. Portanto, os macrófagos constituem-se em fonte de NO no organismo, fazendo com que suas funções sejam devidas à liberação desse composto. Entretanto, a liberação excessiva de NO pode causar consequências para as células hospedeiras, como colapso vascular, por exemplo (QUEIROZ, BATISTA, 1999; BRUNET, 2001).

Diversos estudos sugerem que as cisteíno-proteases são alvos macromoleculares do NO. Doadores de NO, como o nitroprusseto de sódio e o *S*-nitrosoacetilpenicilamina (SNAP), inibem a capacidade catalítica da cruzaina de *T. cruzi* através da formação de *S*-nitrosotiol no resíduo de Cys25 do sítio catalítico da enzima (*Figura 16*) (VENTURINI *et al.*, 1998; COLASANTI *et al.*, 2001).

Figura 16: Cys25 sofrendo *S*-nitrosilação mediada pelo NO
Fonte: COLASANTI *et al.*, 2001.

O uso de complexos metálicos para o tratamento e geração de novos compostos ativos na doença de Chagas ocorre há anos (SÀNCHEZ-DELGADO *et al.*, 1993). Especificamente os complexos de rutênio liberadores de NO (*Figura 17*) têm recentemente emergido como interessante alternativa no tratamento dessa patologia. Esses compostos apresentam baixa toxicidade e alta taxa de sobrevivência de ratos infectados com *T. cruzi* tratados com esses compostos, alcançando valores de 40% de cura parasitológica e acima de 80%, se utilizados em combinação com benznidazol (SILVA *et al.*, 2007; GUEDES *et al.*, 2010).

R = N-heterocíclico, H₂O, SO₃²⁻, P(OEt)₃

Figura 17: Estrutura geral do complexo de rutênioamina liberador de NO na primeira geração.
Fonte: SILVA *et al.*, 2010.

Estudos apontam a S-nitrosilação na Cys166 catalítica da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GADPH – *Figura 18*) por complexos de rutênio liberadores de NO, como importante evento para a inibição da via metabólica glicolítica do parasita, obtendo de 85 a 97% de inibição enzimática com 200 mM (SILVA *et al.*, 2010).

Figura 18: Estrutura da GADPH.

Fonte: <http://www.pdb.org>

Esses valiosos dados mostram o aspecto promissor dessa abordagem e justificam a busca de novos compostos anti-*T. cruzi* liberadores de NO (SILVA *et al.*, 2007, 2010; GUEDES *et al.*, 2010; COLASANTI *et al.*, 2001).

1.2.2.5 – Compostos com mecanismos diferenciados

O aumento no conhecimento da biologia básica do *T. cruzi* é de grande importância para a inovação nas abordagens do tratamento da doença de Chagas (GARZOLI *et al.*, 2004).

Derivados dos ácidos bifosfônicos (*Figura 19*) e pirofosfônicos podem ser úteis como nova via de ação para a eliminação desse hemoflagelado, uma vez que o parasita contém uma organela denominada acidocalcissoma, que, com a inibição da enzima difosfato de farnesila sintase por esses derivados, acumula minerais no interior do parasita, deixando-o inativo. Estudos também demonstram a eficácia de fármacos utilizados para regular distúrbios na reabsorção óssea, por exemplo, risidronato e alendronato, inibindo a enzima pirofosfato sintase (GARZONI *et al.*, 2004; SZAJNMAN *et al.*, 2008).

Figura 19: Derivados do ácido bifosfônico.

Outro alvo no tratamento é a enzima chave hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT), uma vez que o *T. cruzi* não realiza a biossíntese *de novo* das purinas. O alopurinol é um fármaco normalmente utilizado no tratamento da gota, que atua inibindo esta enzima, impedindo que o parasita incorpore as bases púricas ao seu DNA (URBINA, DOCAMPO, 2003).

É importante ressaltar o fato de as formas amastigotas do *T. cruzi* serem ATP-dependentes. Dessa forma, através da via glicolítica pode-se inativar a GADPH por meio de diversos compostos, entre eles, os derivados do ácido anacárdico (*Figura*

20), por exemplo, diminuindo o fornecimento de energia ao parasita (PEREIRA *et al.*, 2008).

Figura 20: Estrutura química do derivado reduzido do ácido anarcádico.

Além desses alvos, atualmente, a nanotecnologia também se constitui em importante ferramenta para otimizar propriedades farmacêuticas e farmacocinéticas de fármacos já existentes e de compostos ativos em estudos (ROMERO, MORILLA, 2010).

1.3 – PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA MODIFICAÇÃO MOLECULAR

A modificação molecular consiste em metodologia eficiente para a busca de novos compostos biologicamente ativos, facilitada pelo aprimoramento da síntese orgânica ao longo dos tempos (KOROLKOVAS, 1988; BARREIRO, FRAGA, 2008).

Neste processo, utiliza-se uma estrutura química com suas características físico-químicas e biológicas bem elucidadas como composto protótipo para a obtenção de entidades análogas, homólogas ou congêneres ao fármaco inicial, podendo ter acesso a produtos com características farmacodinâmicas e/ou farmacocinéticas mais qualificadas.

Dentre os processos de maior relevância utilizados na modificação molecular, a latenciação, o bioisosterismo e a hibridação molecular estão entre os mais utilizados (BARREIRO, FRAGA, 2008).

1.3.1 – **BIOISOSTERISMO**

A primeira definição de compostos isósteros foi expressa realizada por Langmuir, em 1919, e os considera como grupos de átomos ou moléculas orgânicas e inorgânicas os quais contêm o mesmo número e/ou arranjo eletrônico,

caracterizando-se por possuírem semelhanças em suas propriedades físicas (LIMA, BARREIRO, 2005; CIAPETTI, GIETHLEN, 2008).

Posteriormente, Erlenmeyer propôs um conceito mais abrangente, no qual ele definiu isósteros como sendo átomos, moléculas ou íons, os quais apresentam o mesmo número de elétrons na camada de valência (LIMA, BARREIRO, 2005). De maneira conceitual, atualmente pode-se definir como isósteros os grupamentos que apresentam semelhança nas camadas eletrônicas mais externas ou, mais amplamente, moléculas de tamanho e conformação semelhantes que contenham grupos com regiões de densidade eletrônica análogas (LIMA, BARREIRO, 2005). Isósteros são classificados em clássicos: apresentam igualdade na camada de valência, abrangidos pela definição de Erlenmeyer e pela regra de hidreto de Grimm; e não-clássicos: átomos, grupo de átomos ou compostos com disposição estérica e configuração eletrônica semelhantes àqueles dos quais se originam (LIMA, BARREIRO, 2005).

Exemplos de isósteros monovalentes clássicos são o fenol e a anilina (*Figura 21*), em que a simples substituição do grupamento fenólico por um grupamento amino confere expressiva alteração no pKa, sendo previstas, assim, reatividade e propriedades farmacocinéticas distintas para estes compostos isósteros (BARREIRO, FRAGA, 2008; CIAPETTI, GIETHLEN, 2008).

Figura 21: Estrutura de bioisósteros clássicos monovalentes.

O termo bioisótero foi introduzido por Friedman para denominar compostos que preenchem inteiramente o conceito de isosterismo e tenham o mesmo tipo de atividade biológica, sendo ela agonista ou antagônica (LIMA, BARREIRO, 2005; CIAPETTI, GIETHLEN, 2008).

A descoberta do dicloroisoproterenol (*Figura 22-F*) a partir do isoproterenol (*Figura 22-G*) foi de suma importância para o desenvolvimento do bioisosterismo na gênese de novos fármacos (LIMA, BARREIRO, 2005).

Figura 22: Compostos bioisostéricos dicloroisoproterenol (F) e isoproterenol (G).

A substituição do grupo catecóico pelos átomos de cloro fez com que o bioisótero dicloroisoproterenol, além de maior meia-vida, resultasse em propriedades antagônicas ao receptor β 1-adrenérgico. Evidenciou-se, assim, a importância do grupamento catecóico para a ação biológica agonista do isoproterenol. Essa foi, também, a base para a síntese do antagonista adrenérgico inespecífico, o propranolol (*Figura 23*), considerado, à época, inovação na terapêutica na área de anti-hipertensivos (LIMA, BARREIRO, 2005).

Figura 23: Estrutura química do propranolol.

Outro exemplo, este de bioisosterismo não-clássico, consiste no antagonista gonadotropínico. As moléculas a seguir (*Figura 24*) diferem apenas pela substituição do grupamento fenólico (*Figura 24-H*) pelo grupo metilsulfonamida (*Figura 24-I*), tendo este último atividade quatro vezes superior em relação ao seu bioisótero fenólico (BARREIRO, FRAGA, 2008).

Figura 24: Bioisosterismo não-clássico entre o derivado fenólico e o derivado sulfonamídico.

Os princípios de bioisosterismo são amplamente utilizados na estratégia de modificação molecular de compostos com atividades biológicas previamente bem estudadas, com o intuito de obter moléculas com maior potência e menos efeitos colaterais. Representa, deste modo, abordagem eficaz para o planejamento de novos fármacos (LIMA, BARREIRO, 2005; CIAPETTI, GIETHLEN, 2008).

1.3.2 – LATENCIAÇÃO

O termo “latenciação de fármacos” proposto por Harper, em 1959, é uma das mais eficientes ferramentas utilizadas no planejamento de fármacos, podendo ser definida como modificação molecular de um composto biologicamente ativo, cujo objetivo é originar uma nova estrutura isenta de atividade, que, após sofrer biotransformação metabólica *in vivo*, libera o composto inicial no seu respectivo sítio de interação ou próximo dele. Essa nova estrutura é denominada pró-fármaco, termo inicialmente introduzido por Albert, em 1958, com o intuito de caracterizar qualquer composto que, antes de exibir sua ação farmacológica, necessita sofrer ação enzimática e/ou química (WERMUTH, 2008; CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

A obtenção dos compostos latentes tem por objetivo solucionar inconvenientes relacionados aos fármacos, como por exemplo: baixa biodisponibilidade, elevada toxicidade, ausência de seletividade e instabilidade farmacotécnica, entre outros. Deste modo, a latenciação pode aperfeiçoar diversas propriedades físico-químicas dos fármacos, por meio da derivação biorreversível de grupos funcionais existentes em suas moléculas. Pode-se citar, como exemplo, a

conversão de álcoois em ésteres, os quais são clivados *in vivo*, retornando, posteriormente, à função orgânica de origem para interação com o receptor (WERMUTH, 2008; CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

As estruturas latentes foram classificadas por Wermuth, em 1984, em:

- Pró-fármacos, os quais são subdivididos em pró-fármacos clássicos, bioprecusores, mistos e recíprocos.
- Fármacos dirigidos.

1.3.2.1 - Pró-fármacos clássicos

Pró-fármacos clássicos são produtos da ligação entre molécula com atividade biológica e um composto transportador. A estrutura gerada é inativa em relação ao composto matriz, entretanto, quando essa ligação é clivada, por uma simples hidrólise, libera a molécula ativa no local desejado, estando disponível para promover sua ação farmacológica (WERMUTH, 2008).

Na *Figura 25* observa-se a utilização da cumarina, sensível à ação das esterases, atuando como estrutura transportadora, sendo um pró-fármaco que aumenta significativamente a biodisponibilidade do fármaco matriz (LIAO, WANG, 1999).

Figura 25: Molécula da cumarina utilizada como sistema transportador.

1.3.2.2 - Bioprecusores

Contrariamente aos pró-fármacos clássicos, os bioprecusores não utilizam transportadores, porém, são produtos de modificação molecular, que, após sofrer ataque por enzimas normalmente não-hidrolíticas, mas, em geral do sistema redox, transformam-se no fármaco inicial. Com a analogia à análise retrossintética da

química orgânica, o planejamento dos bioprecusores é realizado pelo estudo e planejamento retrometabólico, prevendo, assim, as rotas metabólicas que o fármaco latente irá percorrer antes de retornar à estrutura ativa (WERMUTH, 2008).

A lovastatina, fármaco inibidor da síntese da enzima HMG-CoA redutase, se torna potencialmente ativo após seu grupamento lactônico sofrer processo de biotransformação, conforme mostra a *Figura 26* (HARROLD, 2008).

Figura 26: Esquema de biotransformação da lovastatina.

1.3.2.3 - Pró-fármacos mistos

São estruturas latentes que possuem, ao mesmo tempo, propriedades de pró-fármacos clássicos e de bioprecusores. O sistema denominado CDS (*Chemical Delivery System*) faz parte desse tipo de pró-fármaco, pois necessita da metabolização do transportador para, posteriormente, ocorrer a liberação do fármaco no sítio ou órgão específico, conforme pode ser exemplificado na *Figura 27* para fármacos antivirais (BODOR, ABDELALIM, 1985; CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

Figura 27: Zidovudina sendo liberada predominantemente no sistema nervoso central (CNS), após biotransformação do transportador.

Fonte: LITTLE *et al.*, 1990.

1.3.2.4 - Pró-fármacos recíprocos

Normalmente os transportadores são isentos de atividade biológica, entretanto, nos pró-fármacos recíprocos tanto o fármaco matriz como o transportador apresentam atividade biológica, permitindo, assim, sinergismo de ação por dupla ou única atividade por mecanismos distintos. A *Figura 28* apresenta o pró-fármaco recíproco sulfassalazina (J), a qual após ação das azorredutases libera sulfapiridina (K) e ácido aminossalicílico (L), ambos com proeminente atividade terapêutica (SINGH, SHARMA, 1994). No entanto, a ação em colites se dá, preferencialmente, pelo efeito antiinflamatório do ácido aminossalicílico.

Figura 28: Sulfassalazina (J) pró-fármaco da sulfapiridina (K) e do ácido aminossalicílico (L).

1.3.2.5 - Fármacos dirigidos

Consistem em fármacos, ou moléculas bioativas, que estão acoplados a transportadores específicos para determinadas enzimas, receptores ou antígenos presentes na intimidade celular, local de ação do fármaco. Esses transportadores podem ser: anticorpos, albuminas, polímeros sintéticos, entre outros, geralmente ligados a grupos diretores, para interação com receptores específicos da célula. Essa metodologia é de grande valia, por possuir objetivo de aumentar a potência e a seletividade de ação, diminuindo, assim, os efeitos colaterais do fármaco (CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; BLAU, MENEGON, CHUNG, 2006).

O sistema ADEPT (*Antibody-directed Enzyme-Prodrug Therapy*), por exemplo, atua por meio de anticorpos monoclonais conjugados com enzimas, numa primeira fase, seguida da administração de pró-fármacos clássicos, liberados especificamente pela enzima conjugada ao anticorpo. Apresentam, assim, extrema seletividade de ação. Estudos demonstram a utilização do sistema ADEPT para o

tratamento da tripanossomíase africana, conforme mostra a *Figura 29* (BLAU, MENEGON, CHUNG, 2006; CHUNG *et al.*, 2008).

Figura 29: Sistema ADEPT para a terapia antitripanossomíase africana.
Fonte: PRATT *et al.*, 1986.

Outros sistemas de transporte seletivo são o GDEPT (*Genome-directed enzyme prodrug therapy*) e o VDEPT (*Virus-directed enzyme prodrug therapy*), que se baseiam em técnicas de biologia molecular (CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

1.4 – PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS E A MODELAGEM MOLECULAR

O planejamento racional de novos fármacos é uma área interdisciplinar de muita complexidade, constituindo-se, atualmente, em um dos campos de maior desafio e evolução na ciência. A modelagem molecular (MM) é a abordagem utilizada para a interpretação tridimensional "*in silico*" das moléculas e de suas propriedades físico-químicas, podendo ser aplicada em diferentes estágios no

desenvolvimento de fármacos. Basicamente, compreende estágios precoces, com o intuito de diminuir a quantidade de possíveis ligantes e, no final, na etapa de otimização dos compostos-líderes, reduzindo tempo e gastos com ensaios experimentais (TAFT, DA SILVA, DA SILVA, 2008; PATRICK, 2009; XIANG-QUN, 2008).

Diversos químicos farmacêuticos têm como foco melhorar protocolos computacionais, incluindo a inclusão de flexibilidade protéica no processo de *docking*; exploração da conformação ideal do ligante no sítio de ligação e refinamento na avaliação do complexo ligante-receptor (L-R), entre outros (TAFT, DA SILVA, DA SILVA, 2008; XIANG-QUN, 2008).

1.4.1 – ***DOCKING***

A técnica de *docking* (*Figura 30*) objetiva encontrar a conformação correta do ligante no interior do sítio ativo do receptor, gerando um *ranking* de conformações de acordo com a estabilidade formada pelo complexo L-R. Diversos fatores entálpicos e entrópicos estão envolvidos, influenciando diretamente na interação do ligante com o alvo, assim como a mobilidade dos mesmos e o ambiente de solvatação da proteína envolvida. Essa técnica tem sido usada durante décadas, tanto nas ciências básicas, quanto nas indústrias (ALONSO, BLIZNYUK, GREARY, 2006; MORGON, COUTINHO, 2007).

Os programas de *docking* mais utilizados são: DOCK, AutoDock, FexX, GOLD e GLIDE (ALONSO, BLIZNYUK, GREARY, 2006).

Figura 30: *Docking* de um derivado quinazolínico na enzima tripanotona redutase (TR)

Fonte: CAVALLI *et al.*, 2009.

1.4.2 - AVALIAÇÃO TEÓRICA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA

Uma proposta de mecanismo de ação para os pró-fármacos recíprocos do NFOH e seus bioisómeros é através do ataque nucleofílico do resíduo Cys25 da cruzaina na carbonila/tiocarbonila presente na estrutura molecular desta classe de compostos (TROSSINI, 2008). Essa proposta se baseia no trabalho de DU e colaboradores (2002). Outra via de inativação alternativa desta cisteíno-protease pode ocorrer através da formação de *S*-nitrosotiol, por meio de interação com grupamentos doadores de óxido nítrico (NO), como os ésteres nitratos (COLASANTI *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Como exposto anteriormente, a doença de Chagas é parasitose que acomete cerca de 15 milhões de pessoas e, ao menos, 28 milhões estão sob risco de adquirir a doença. Entretanto, mesmo com este cenário, apenas dois quimioterápicos (nifurtimox e benznidazol) estão disponíveis no mercado, sendo que, no Brasil, apenas o benznidazol é utilizado.

Este fato mostra a importância de se ampliar o número de fármacos disponíveis e propor quimioterapia mais eficaz para o tratamento da doença de Chagas. Face ao exposto, este projeto objetiva a síntese de compostos com dupla atividade contra o *T. cruzi*, utilizando a metodologia da latencição de fármacos, em que os derivados ativos são bioisósteros de derivados nitro-heterocíclicos, anteriormente sintetizados por Trossini, em 2008.

As moléculas propostas (*Figura 31*) são pró-fármacos recíprocos do hidroximetilnitrofural - NFOH (*Figura 13*) e de seus bioisósteros, juntamente com o grupamento liberador de óxido nítrico (éster nitrato), podendo, deste modo, atuar de forma dupla na inibição da enzima cruzaina e em outras cisteíno-proteases através da atividade do óxido nítrico liberado.

Figura 31: Bioisósteros propostos para a síntese.

Justifica-se a utilização do NFOH e seus bioisósteros como compostos protótipos neste presente trabalho por apresentarem valores relevantes na capacidade de inibição da cruzaina, conforme pode ser visualizado através da *Figura 32* pelos respectivos valores de IC₅₀ (TROSSINI, 2008; TROSSINI *et al.*, 2010a).

Figura 32: Inibição da cruzaina pelo NFOH e seus bioisómeros, determinada por meio de valores de IC_{50} . NFOH = **NFOH**; NTTSOH = **NSOH**; NFTSMOH = **NFSOH**; NTSMOH = **NSOOH**. Fonte: TROSSINI, 2008.

Com o auxílio da visualização dos mapas de potencial eletrostático (MEPs) e da metodologia de *docking*, serão realizados estudos teóricos para a avaliação do sítio preferencial do ataque nucleofílico pela Cys25 da cruzaina nas moléculas propostas (Figura 33).

Figura 33: Estrutura dos pró-fármacos recíprocos destacando-se os possíveis sítios de interação com a cruzaina.

Além disso, considerando-se que nitroderivados são inibidores da TR, é possível que estes compostos apresentem, adicionalmente, esse tipo de

mecanismo. É preciso ressaltar que fármacos com alvos múltiplos são especialmente importantes no caso de quimioterápicos com vistas a diminuir ou impedir o aparecimento de cepas resistentes de parasitas (NWAKA, HUDSON, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – REAGENTES E SOLVENTES

- Água desionizada
- Ácido acético p.a.
- Ácido nítrico (65%)
- Álcool etílico p.a.
- Anidrido acético p.a.
- Carbonato de potássio
- Cloreto de tionila
- Clorofórmio p.a.
- Dimetilsulfóxido
- Dimetilsulfóxido deuterado
- Iodo sublimado
- Metanol p.a.
- *N,N*-Dimetilformamida
- 5-Nitro-2-furaldeído
- 5-Nitrotiofeno-2-carboxialdeído
- Pentóxido de fósforo
- Piridina p.a.
- Semicarbazida
- Solução de formol a 37%
- Solução saturada de bicarbonato de sódio
- Solução saturada de cloreto de sódio
- Tetraidrofurano p.a.
- Tiosemicarbazida

- Tolueno p.a.

3.2 – **EQUIPAMENTOS**

- Agitadores Magnéticos
- Aparelho para ponto de fusão M-565 da Büchi
- Bomba de vácuo
- Lâmpada de luz ultravioleta
- Rotaevaporador R-3 acoplado a controlador V-850 e bomba V-700 de vácuo da Büchi

3.3 – **MÉTODOS DE ANÁLISE**

- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)
- Ressonância Magnética Nuclear de H^1 e de C^{13} , em espectrômetro de ressonância magnética nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advance DPX-300, disponível no Departamento de Farmácia, FCF, USP

3.4 – **SÍNTESE (PRIMEIRA PARTE)**

3.4.1 – **SÍNTESE TRADICIONAL DO NITROFURAL (NF) E DE SEUS BIOISÓSTEROS**

A síntese tradicional do nitrofural e seus bioisósteros está ilustrada a seguir (*Esquema 1*). Os compostos foram obtidos segundo a metodologia utilizada por Trossini (2008).

Esquema 1: Síntese geral do NF e seus bioisósteros.

Adicionaram-se 5 mmol do aldeído nitro-heterocíclico a etanol (100 mL para NS/NFS e 70 mL para NF/NSO). Após a solubilização do composto adicionaram-se cerca de 10 gotas de HCl concentrado e, na sequência, 5 mmol da respectiva carbazida (dissolvida em 30 mL de água para NF/NSO). Observou-se, após alguns minutos, a formação de precipitado e, em seguida, a reação permaneceu sob agitação por cerca de 2 h, sendo acompanhada por CCD, fazendo uso do sistema de fase móvel $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:CH}_3\text{COOH}$ (85:10:5). Posteriormente, o material obtido foi filtrado sob pressão reduzida e mantido durante, aproximadamente, 20 horas sob pressão reduzida em dessecador contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo, e, logo após, armazenado em cápsula de porcelana. As estruturas dos compostos obtidos foram analisadas por RMN ^1H e ^{13}C .

3.4.2 – SÍNTESE *SOLVENT-FREE* DO NF E SEUS BIOISÓSTEROS

A síntese *solvent-free* do NF e seus bioisósteros está ilustrada a seguir (*Esquema 2*). Os compostos foram obtidos de acordo com a metodologia utilizada por KIASAT (2005).

Esquema 2: Síntese *solvent-free* do NF e seus bioisósteros.

O aldeído foi adicionado com a respectiva carbazida e com o acetato de sódio catalítico (1:1,5:1,5) em um almofariz, juntamente com 0,5 g de sílica-gel. A mistura foi homogeneizada durante dez minutos, tempo suficiente para a reação ser completada. O produto foi lavado com metanol e filtrado. Em seguida, evaporou-se o solvente e o sólido resultante foi ressuspenso em água, filtrado sob pressão reduzida e, então, mantido durante, aproximadamente, 20 horas sob pressão reduzida em dessecador contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo onde foi armazenado em cápsula de porcelana. Os compostos obtidos foram analisados por RMN ^1H e ^{13}C .

3.5 – SÍNTESE (SEGUNDA PARTE)

3.5.1 – SÍNTESE DO HIDROXIMETILNITROFURAL (NFOH) E DE SEUS BIOISÓSTEROS

A síntese do NFOH e de seus bioisósteros foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por Trossini *et al.* (2010b) e Trossini(2008).

Esquema 3: Síntese geral do NFOH e bioisósteros.

Utilizaram-se os compostos não-hidroximetilados (NH) em meio alcalino de carbonato de potássio (1:1,5), com excesso de formaldeído em meio aquoso. Primeiramente, adicionaram-se 5 mmol do respectivo NH, 7,5 mmol de carbonato de potássio, 10 mL de água desionizada e a primeira metade (9 mL) da solução de formol a 37%. Formou-se suspensão e, após 3,5 horas de reação, adicionou-se a outra metade (9 mL) da solução de formol a 37%. A reação foi acompanhada por CCD, fazendo uso do sistema solvente $CHCl_3:MeOH:CH_3COOH$ (85:10:5). A reação se completou após 7 horas, para o NFOH, e 24 horas, para o NSOH e NSOOH. Com o composto NFSOH tentou-se realizar a síntese com e sem adição de água, e variando o tempo reacional entre 24 e 72 horas. As reações foram interrompidas e os materiais obtidos filtrados sob pressão reduzida, lavando-se os precipitados com metanol a frio, até a total remoção do formaldeído. Posteriormente, os produtos foram mantidos durante, aproximadamente, 20 horas sob pressão reduzida em dessecador contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo, onde foram armazenados em cápsula de porcelana. Os compostos obtidos foram analisados por RMN 1H e ^{13}C .

3.6 – SÍNTESE (TERCEIRA PARTE)

3.6.1 – TENTATIVAS DE SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS RECÍPROCOS

3.6.1.1 – Método direto

O primeiro método de síntese dos pró-fármacos recíprocos propostos foi efetuado segundo a metodologia de formação de ésteres nitrato descrita por Breschi *et al.* (2006).

Esquema 4: Síntese global dos pró-fármacos recíprocos.

Adicionaram-se 2 mmol do composto hidroximetilado em DMSO:DMF (1:1) até a total solubilização do composto. Em seguida, adicionou-se a solução do derivado à solução de ácido nítrico 65% e anidrido acético (0,57 mL:1,17 mL), previamente resfriada a -10 °C e 0 °C (**). A mistura foi mantida sob agitação, à temperatura de -10 °C e ambiente, em períodos de tempo diversos, dependendo dos compostos de partida (*Tabela II*). No meio reacional, adicionou-se água para forçar a precipitação dos materiais obtidos, os quais foram filtrados sob pressão reduzida. Em seguida, manteve-se os sólidos à pressão reduzida em dessecador contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo durante cerca de 20 horas e, logo após, armazenou-se o sólido em cápsula de porcelana. A estrutura dos materiais obtidos foram analisadas por RMN ¹H e CCD.

Tabela II: Condições reacionais da síntese dos ésteres nitrato

COMPOSTO DE PARTIDA	TEMPO DE REAÇÃO(h)	
	-10 °C	ta*
NFOH***	--	1**, 24**
NSOH	2	2, 6, 23, 24**
NSOOH	6	6, 40

* ta = temperatura ambiente

** Adição da solução de Ácido nítrico:Anidrido acético a 0 °C

*** Ácido nítrico:Anidrido acético (7 mL:16,5 mL)

3.6.1.2 – Método indireto

O método indireto correspondeu à inserção de um halogênio como intermediário para posteriormente formar o éster nitrato (utilizando, na sequência, nitrato de prata como agente nitrante). Essa metodologia (Esquema 5) foi adaptada de AGUIRRE e colaboradores (2005) e aplicada inicialmente, ao NSOOH.

W = O; Y = O → NFOH-Cl

W = S; Y = S → NSOH-Cl

W = S; Y = O → NSOOH-Cl

Esquema 5: Síntese geral dos intermediários clorados.

3.6.1.2.1 – Experimento 1

Adicionaram-se 3 mL de SOCl_2 a 1,2 mmol do NSOOH e a suspensão resultante foi mantida sob refluxo durante 5 horas. Em seguida, cuidadosamente, adicionou-se o meio reacional à água até a total liberação dos gases presentes. O precipitado formado foi filtrado e, na sequência, mantido sob pressão reduzida

durante cerca de 20 horas em dessecador contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo. O material obtido foi analisado por RMN ^1H .

3.6.1.2.2 – Experimento 2

Com o intuito de diminuir a acidez do meio reacional, por meio da utilização de piridina, e, aumentar a solubilidade do derivado hidroximetilado, realizou-se a síntese descrita a seguir, de acordo com a metodologia adaptada de PEREIRA *et al.* (2008).

Após a adição de 10 mL de tolueno e 0,1 mL de piridina em 1,2 mmol do NSOH, cuidadosamente gotejou-se 1mL (13,7 mmol) de SOCl_2 a 0°C , mantendo a agitação à temperatura ambiente durante 20 horas. Posteriormente, o material foi filtrado e a parte solúvel foi extraída com tolueno e lavada com solução de bicarbonato e cloreto de sódio saturadas. A fase orgânica foi, então, secada com sulfato de magnésio concentrando-a, posteriormente, sob pressão reduzida.

A reação acima foi repetida, utilizando SOCl_2 (9,1 mL, 133 mmol) como reagente e solvente da reação, na proporção equimolar com a piridina (10 mL, 133 mmol), durante 24 horas de agitação. Na sequência, adicionou-se água à reação e, após filtração, o sólido resultante passou por coluna cromatográfica utilizando inicialmente clorofórmio como fase móvel, a qual foi sendo polarizada continuamente com metanol, até a proporção 1:1.

Os precipitados formados, em ambas as reações, foram mantidos sob pressão reduzida durante cerca de 20 horas em dessecador contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo. Os sólidos obtidos foram enviados para análise de RMN ^1H .

3.7 – MODELAGEM MOLECULAR

Efetuaram-se os estudos de *docking* com o programa GOLD 3.1, utilizando a estrutura cristalográfica da cruzaína (cod. PDB 1ME4). As estruturas dos pró-fármacos foram previamente desenhadas no Chem Bio 3D e otimizadas nas bases de cálculos do Gaussian 03W (AM1 e Hartree-Fock $\rightarrow$ 3.21G e 6.31G) respectivamente.

Inicialmente, realizou-se a análise dos MEPs das moléculas propostas através do programa GaussView 3.09. A visualização e interpretação dos resultados dos *dockings* foram realizadas utilizando o programa PyMOL, através de inspeção visual das poses de melhor *score*, considerando as características químicas complementares entre os ligantes e os resíduos do sítio ativo da cruzaina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – SÍNTESE (PRIMEIRA PARTE)

4.1.1 – SÍNTESE TRADICIONAL DO NF E SEUS BIOISÓSTEROS

Os produtos obtidos em várias repetições da síntese foram sólidos de coloração amarelo intenso, com os seguintes rendimentos e valores de faixa de fusão:

- ✓ NS = 50%-70%; 230-233 °C
- ✓ NFS = 79%-84%; 203-206 °C
- ✓ NSO = 80%-85%; 220-223 °C

Houve necessidade, também, de sintetizar o material de partida, NF, obtido com 75%-80% de rendimento e faixa de fusão de 238-242 °C, de acordo com a literatura (The Merck Index).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C respectivos são mostrados a seguir (*Figuras 34 – 41*) juntamente com as respectivas atribuições dos sinais obtidos (*Tabelas III – X*). Estes bioisósteros foram obtidos sem problemas e as análises estão de acordo com os produtos obtidos por Trossini (2008).

Figura 34: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-D₆, δ ppm) do NF.

Tabela III: Atribuições de RMN ¹H do NF

RMN ¹ H (DMSO-d ₆), 300 MHz, δ = ppm
11,80 (s, 1H, H-d); 7,80 (s, 1H, H-c); 7,78 (s, 1H, H-a); 7,24 (d, 1H, J=3,9 Hz, H-b); 6,62 (s, 1H, H-e).

Figura 35: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NF.

Tabela IV: Atribuições de RMN ^{13}C do NF

RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 75 MHz, δ = ppm
155,90 (C-f); 153,14 (C-d); 151,25 (C-a); 127,37 (C-e); 115,27 (C-b); 112,17 (C-c).

Figura 36: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NS.

Tabela V: Atribuições de RMN ^1H do NS

RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ = ppm
11,79 (s, 1H, H-d); 8,42 (s, 1H, H-c); 8,18 (s, 2H, H-e); 8,06 (d, 1H, J=4,2 Hz, H-a); 7,52 (d, 1H, J=4,2 Hz, H-b).

Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NS.

Tabela VI: Atribuições de RMN ^{13}C do NS

RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 75 MHz, δ = ppm
178,67 (C-f); 151,21 (C-a); 147,20 (C-d); 135,73 (C-e); 130,87 (C-b); 129,65 (C-c).

Figura 38: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NFS.

Tabela VII: Atribuições de RMN ^1H do NFS

RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ = ppm
11,82 (s, 1H, H-d); 8,50 (s, 2H, H-e); 7,98 (s, 1H, H-c); 7,77 (d, 1H, J=3,8 Hz, H-a); 7,35 (d, 1H, J=3,8 Hz, H-b).

Figura 39: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NFS.

Tabela VIII: Atribuições de RMN ^{13}C do NFS

RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 75 MHz, δ = ppm
178,87 (C-f); 153,06 (C-d); 152,04 (C-a); 130,27 (C-e); 115,60 (C-b); 113,68 (C-c).

Figura 40: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do NSO.

Tabela IX: Atribuições de RMN ¹H do NSO

RMN ¹ H (DMSO-d ₆), 300 MHz, δ = ppm
10,76 (s, 1H, H-d); 8,08 (d, 1H, J=4,2 Hz, H-a); 8,02 (s, 1H, H-c); 7,43 (d, 1H, J=4,2 Hz, H-b); 6,60 (s, 2H, H-e).

Figura 41: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NSO.

Tabela X: Atribuições de RMN ^{13}C do NSO

RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 75 MHz, δ = ppm
156,40 (C-f); 150,33 (C-a); 148,15 (C-d); 133,22 (C-b) 131,03 (C-c); 128,03 (C-e).

4.1.2 – COMPARAÇÃO ENTRE SÍNTESE TRADICIONAL E SOLVENT-FREE DO NF E SEUS BIOISÓSTEROS

As análises de RMN dos compostos derivados de semicarbazona foram consistentes com a literatura, mostrando a eficácia dessa metodologia para a síntese desses compostos. Entretanto, os derivados da tiosemicarbazona não foram obtidos com sucesso (ou com desejável teor de pureza) por essa metodologia. Na *Tabela XI* comparam-se a síntese tradicional com a *solvent-free*, por meio dos respectivos rendimentos reacionais.

Tabela XI: Comparação entre síntese tradicional e *solvent-free*

RENDIMENTO (%)	NF	NS	NFS	NSF
SOLVENT-FREE	40	Impuro	Não reagiu	15
TRADICIONAL	80	70	80	85

Alguns prováveis motivos da ineficiência da metodologia *solvent-free* para os compostos contendo tiossemicarbazona podem ser o baixo tempo reacional, o suporte reacional inadequado ou, até mesmo, a baixa concentração do catalisador.

4.2 – SÍNTESE (SEGUNDA PARTE)

Os produtos obtidos em sínteses repetidas foram sólidos de coloração levemente amarelada, com os seguintes rendimentos e valores de faixas de fusão:

- ✓ NSOH = 50%-60%; 195-200 °C
- ✓ NFOH = 34%-55%; 150-155 °C
- ✓ NSOOH = 68%-75%; 197-203 °C

Os correspondentes espectros de RMN ^1H e ^{13}C são mostrados a seguir (*Figuras 42 – 47*) juntamente com as respectivas atribuições dos sinais (*Tabelas XII – XVII*). Estes foram obtidos sem problemas e as análises estão de acordo com os produtos sintetizados por Trossini (2008).

Figura 42: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NSOH.

Tabela XII: Atribuições de RMN ^1H do NSOH

RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ = ppm	
11,91 (s, 1H, H-d); 8,97 (s, 1H, H-c); 8,17 (s, 1H, H-e); 8,03 (d, 1H, J=4,3 Hz, H-a); 7,49 (d, 1H, J=4,3 Hz, H-b); 5,51 (t, 1H, J=6,7 Hz, H-g); 4,92 (t, 2H, J=6,7 Hz, H-f).

Figura 43: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NSOH.

Tabela XIII: Atribuições de RMN ^{13}C do NSOH

RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 75 MHz, δ = ppm
177,62 (C-f); 149,30 (C-a); 146,50 (C-d); 135,56 (C-e); 130,38 (C-b); 129,42 (C-c); 67,01 (C-g).

Figura 44: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NFOH.

Tabela XIV: Atribuições de RMN ^1H do NFOH

RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ = ppm
11,01 (s, 1H, H-d); 7,83 (s, 1H, H-c); 7,80 (d, 1H, J=3,6 Hz, H-a); 7,63 (t, 1H, J=6,3 Hz, H-e); 7,25 (d, 1H, J=3,6 Hz, H-b); 5,50 (t, 1H, J=6,3 Hz, H-g); 4,62 (t, 2H, J=6,3 Hz, H-f).

Figura 45: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NFOH.

Tabela XV: Atribuições de RMN ^{13}C do NFOH

RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 75 MHz, δ = PPM
155,80 (C-f); 153,92 (C-d); 152,52 (C-a); 129,26 (C-e); 116,28 (C-b); 113,90 (C-c); 64,39 (C-g).

Figura 46: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NSOOH.

Tabela XVI: Atribuições de RMN ^1H do NSOOH

RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ = ppm
10,90 (s, 1H, H-d); 8,06 (d, 1H, H-a); 8,04 (s, 1H, H-c); 7,67 (t, 1H, J=6,3 Hz, H-e); 7,43 (d, 1H, H-b); 5,41 (t, 1H, J=6,3 Hz, H-g); 4,59 (t, 2H, J=6,3 Hz, H-f).

Figura 47: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NSOOH.

Tabela XVII: Atribuições de RMN ^{13}C do NSOOH

RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 75 MHz, δ = ppm
154,56 (C-f); 150,01 (C-a); 147,43 (C-d); 133,21 (C-b); 130,49 (C-c); 127,80 (C-e); 63,21 (C-g).

A síntese do composto NFSOH não foi reprodutível através da metodologia de Trossini (2008). Mesmo com a aparição de uma fraca mancha, provavelmente do produto desejado, na CCD, após variações na concentração (através da retirada da adição de água) e no tempo da reacional 24, 48 e 72 horas, não foi possível o isolamento do produto, obtendo por RMN ^1H , em todas as tentativas, o composto não-hidroximetilado NFS. Tal fato indica a possível reversão do composto, durante a síntese, devido às condições reacionais, especialmente, considerando-se os tempos de reação.

4.3 – SÍNTESE (TERCEIRA PARTE)

4.3.1 – MÉTODO DIRETO

Devido à baixa solubilidade dos derivados hidroximetilados em diversos solventes e, após várias tentativas de reação (utilizando anidrido acético e tetraidrofurano), conseguiu-se solubilizar o material com DMSO:DMF (1:1) e, assim, realizar a reação com mais eficácia.

Mesmo após a resolução do problema de solubilidade dos derivados hidroximetilados, a formação dos ésteres nitrato mostrou-se bem complexa. Inicialmente, a síntese do NSOH-NO e NSOOH-NO realizada a -10 °C em 2 e 6 horas não provocou modificação no perfil de corrida nas placas de CCD dos produtos em relação aos compostos de partida, indicando que os produtos não foram obtidos, o que foi comprovado pela análise de RMN (*Figuras 48 e 49*), comparativamente aos respectivos derivados hidroximetilados. Observa-se que há muitos sinais devidos a impurezas, o que sugere a formação de derivados secundários, que ainda não foram pesquisados (talvez produtos de hidrólise do composto devido ao meio ácido). Ante esse fato, resolveu-se realizar as próximas tentativas em temperatura ambiente.

Figura 48: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto da reação de formação do éster nitrato com NSOH.

Figura 49: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto da reação de formação do éster nitrato com NSO $_3\text{H}$.

Após essa mudança na temperatura, existem fortes indícios da degradação do composto de partida NSOH, devido à formação de diversas manchas na placa de CCD, referentes ao próprio derivado hidroximetilado de partida e ao aldeído antecessor. Houve, também, a formação de uma pequena mancha, possivelmente do produto desejado. Placas preparativas foram realizadas, porém, sem êxito, para o isolamento do composto de interesse. O espectro de RMN ^1H (Figura 50) mostra diversos sinais presentes na região de aromáticos (entre 7 e 9 ppm), muito provavelmente de produtos indesejáveis. Esse espectro foi idêntico em todos os tempos reacionais utilizados (2, 6 e 23 horas) para esse composto.

Figura 50: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto da reação de formação do éster nitrato com NSOH.

Em seguida, adicionando o NSOH na solução de ácido nítrico e anidrido acético a 0 °C, após 24 horas de reação à temperatura ambiente, a CCD não apresentou mudança em relação à mancha do material de partida, do mesmo modo o espectro de RMN ^1H (*Figura 51*) não mostrou alteração no CH_2 do composto hidroximetilado. Esperava-se o deslocamento do sinal do grupo metilênico para campos mais baixos, em razão da ligação deste com grupo fortemente atraente de elétrons, como o NO_2 , caso tivesse formado o éster nitrato correspondente.

Figura 51: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto da reação de formação do éster nitrato com NSOH.

Com o NFOH, também fazendo sua adição na solução de ácido nítrico e anidrido acético a 0 °C, porém, com aumento da concentração do agente nitrante, a CCD aparentemente não apresentava mancha do material de partida, após 1 hora de reação. Porém, espectro de RMN ^1H (Figura 52) do material obtido mostrou ser semelhante ao NFOH de origem, porém, com muitas impurezas.

Figura 52: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto da reação de formação do éster nitrato com NFOH.

Posteriormente, na reação do NFOH durante 24 horas, o material não precipitou após adição de água, deste modo, resolveu-se tratar a reação com solução saturada de bicarbonato e THF, porém, houve separação das fases apenas com adição da solução saturada de cloreto de sódio, podendo, assim, realizar a extração, secagem com sulfato de magnésio e concentração da fase orgânica no rotaevaporador. A CCD da pequena quantidade de sólido resultante mostrou em uma das manchas, provavelmente da reversão do NFOH para NF.

Já na formação do composto NSOOH-NO à temperatura ambiente durante 6 horas, a CCD não apresentou alteração em relação ao derivado hidroximetilado de partida. Deste modo, resolveu-se aumentar o tempo de reação para 40 horas. Após o término dessa reação, a *Figura 53* mostra o espectro de ^1H resultante, onde se pode observar diminuição no valor da integral relacionada ao grupamento CH_2 e aumento na integral do grupamento hidroxila (sinais em destaque com as setas

vermelhas em 4,7 e 5,4 ppm, respectivamente). Assim, o sinal do CH₂, deslocado para campo mais baixo, devido à introdução do grupo nitro, poderia estar se sobrepondo com o sinal da hidroxila. Para se concluir a respeito, realizou-se RMN de ¹³C.

Figura 53: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do produto da reação de formação do éster nitrato NSO₂H-NO.

O espectro de ¹³C (Figura 54) não mostrou deslocamento químico do CH₂ (retângulo vermelho é a região onde era esperado sinal, caso alguma quantidade do produto tivesse sido obtida), e, além disso, mostrou a ocorrência de degradação do material de partida.

Figura 54: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto da reação de formação do éster nitrato com NSOH.

4.3.2 – MÉTODO INDIRETO

A substituição da hidroxila pelo átomo de cloro, apenas com uso do SOCl_2 não se mostrou eficaz para o composto hidroximetilado, conforme pode-se observar no espectro de RMN ^1H do $\text{NSOOH}\cdot\text{Cl}$ (Figura 55). Do mesmo modo, a formação do $\text{NSOH}\cdot\text{Cl}$ com tolueno/ SOCl_2 /piridina, também se mostrou ineficiente.

Figura 55: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto da reação de formação do cloreto de NSO OH .

A CCD do meio reacional, após 24 horas de síntese somente com SOCl_2 e piridina na proporção equimolar, mostrou que se obteve apenas 1 mancha acima do material de partida. Após filtração, a CCD do sólido resultante apresentou dois perfis distintos: o primeiro, na revelação com UV, apresentou a mancha do NSOH inicial e outra com R_f superior; o segundo, na revelação com iodo sublimado, mostrou apenas a mancha do material de partida. Assim, após realização da coluna cromatográfica, a primeira fração, que era a de interesse, apresentou-se como um sólido de coloração clara e de solubilidade razoável apenas em clorofórmio. Após análise de RMN ^1H (Figura 56), observou-se um espectro isento de todos os sinais esperados, ficando claro que o composto almejado não foi obtido.

Figura 56: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto da reação de formação do cloreto de NSOH.

4.4 – MODELAGEM MOLECULAR

A avaliação do sítio mais favorável ao ataque nucleofílico dos compostos propostos no trabalho à enzima foi feita inicialmente pela análise dos MEPs e, em seguida, pela observação da distância e posicionamento dos grupamentos passíveis de ataque nucleofílico no estudo de *docking* das moléculas (carbonila/tiocarbonila e éster nitrato) e o átomo de enxofre da Cys25 da cruzaina.

Através dos MEPs (*Figura 57*) pode-se notar a menor densidade eletrônica nos grupos tiossemicarbazonas de todas as moléculas em relação aos grupamentos semicarbazonas e aos ésteres nitratos.

Figura 57: Modelos 3D dos pró-fármacos recíprocos. A) NFOH-NO em *ball-stick*; A1) MEP do NFOH-NO; B) NFSOH-NO em *ball-stick*; B1) MEP do NFSOH-NO; C) NSOH-NO em *ball-stick*; C1) MEP do NSOH-NO; D) NSOOH-NO em *ball-stick*; D1) MEP do NSOOH-NO.

A análise das poses de melhor *score* (Figura 58) no estudo de *docking* para cada pró-fármaco sugere que:

- O grupo éster nitrato e os grupos carbonila/tiocarbonila apresentaram distância que variou entre 2,8–2,9 Å e 3,0–3,7 Å, respectivamente, em relação à Cys25. A molécula do NFSOH-NO acarretou a diferença mais significativa (2,8 e 3,7Å).

- Outra observação importante foi o posicionamento dos anéis nitro-heterocíclicos no bolso S2 do sítio ativo da cruzaina, descrito como bolso de interação hidrofóbica.

Figura 58 – *Docking* dos pró-fármacos na cruzaina. A) Sítio ativo da cruzaina e os subsítios; B) *docking* dos pró-fármacos indicando a interação com os subsítios S2 e S1; C) *docking* do NFSOH-NO, apresentando as distâncias entre a Cys25, a tiocarbonila, e o éster nitrato.

5. CONCLUSÕES

Os sinais obtidos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C relativos aos compostos intermediários são semelhantes aos da literatura (TROSSINI, 2008; TROSSINI *et al.*, 2010b). Deste modo, pode-se concluir que se obtiveram os compostos intermediários almejados, com exceção do NFSOH, o qual necessita de novas investigações na rota sintética para sua obtenção e isolamento definitivo.

A metodologia *solvent-free* mostrou-se, a princípio, como alternativa para a síntese do NF e seus bioisósteros contendo semicarbazona, no entanto, a síntese tradicional apresenta maior utilidade devido aos melhores rendimentos alcançados. As condições sintéticas da metodologia *solvent-free* necessitam, no entanto, de otimização a fim de se obter melhores rendimentos e maior pureza, especialmente para os derivados de tiosemicarbazona.

Mesmo com a utilização de diferentes métodos (direto e indireto) e diversas variações nas condições reacionais (temperatura, tempo e concentração dos reagentes), a síntese dos ésteres nitrato não conduziu aos resultados esperados, mostrando a baixa reatividade da hidroxila e a fácil degradação dos derivados nitro-heterocíclicos hidroximetilados perante os meios reacionais utilizados. Tal fato sugere que modificações moleculares em outras regiões das moléculas, como por exemplo no núcleo aromático, podem ser alternativa plausível para a obtenção de novos pró-fármacos liberadores de óxido nítrico.

Através da análise dos MEPs verifica-se a maior deficiência eletrônica na região das tiossemicarbazonas dos referidos pró-fármacos, em relação às semicarbazonas e aos ésteres nitrato. Entretanto, o estudo de *docking* mostra possível preferência de ataque nucleofílico da Cys25 ao grupo éster nitrato em relação à carbonila/tiocarbonila, devido à maior proximidade entre esses grupos, sugerindo, portanto, preferencial inativação da cruzaina pela formação de S-nitrosotiol.

6. PERSPECTIVAS

Pretende-se explorar outra metodologia com vistas a viabilizar a obtenção das moléculas propostas, como a utilização do ácido nítrico fumegante na reação. Espera-se que o aumento da concentração do agente nitrante favoreça a formação do éster com o grupo hidroxila de baixa reatividade dos compostos hidroximetilados obtidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZALEZ, M.; PORCAL, W.; DENICOLA, A.; MOLLER, M.; THOMSON, L.; TORTORA, V. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 13, p. 6324-6335, 2005.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev.*, v. 26, p 531-568, 2006.

- ALVES, R. M.; THOMAZ, R. P.; ALMEIDA, E. A.; WANDERLEY, J. S.; GUARIENTO, M. E. Chagas` disease and ageing: the coexistence of other chronic diseases with Chagas` disease in elderly patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 42, p. 622-628, 2009.
- ANIS, R. J.; ANIS, R.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. *Lancet*, v. 375, p. 1388-1402, 2010.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, Porto Alegre: Artmed, 2 ed., 2008. p. 271-277,343-345.
- BLAU, L.; MENEGON, R. F.; CHUNG, M. C. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. *Quím. Nova*, v. 29, p. 1307-1317, 2006.
- BODOR, N.; ABDELALIM, A. M. Improved delivery through biological membranes XIX: novel redox carriers for brain-specific chemical delivery systems. *J. Pharm. Sci.*, v. 74, p. 241-245, 1985.
- BRACK, K.; KERR, I. D.; BARRETT, K. T.; FUCHI, N.; DEBNATH, M.; ANG, K.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, DOYLE, P. S.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for chagas disease chemotherapy. *J. Med. Chem.*, v. 53, p. 1763-1773, 2010.
- BRESCHI, M. C.; CALDERONE, V.; DIGIACOMO, M.; MACCHIA, M.; MARTELLI, A.; MARTINOTTI, E.; MINUTOLO, F.; RAPPOSELLI, S.; ROSSELLO, A.; TESTAI, L.; BALSAMO, A. New NO-releasing pharmacodynamic hybrids of Losartan and its active metabolite: design, synthesis, and biopharmacological properties. *J. Med. Chem.*, v. 49, p. 2628-2639, 2006.
- BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. *Int. Immunopharmacol.*, v 1, p. 1457-1467, 2001.
- BUCKNER, F. S.; GRIFFIN, J. H.; WILSON, A. J.; VOORHIS, W. C. V. Potent anti-*trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 45, p. 1210-1215, 2001.
- CANADA MEDICAL ASSOCIATION JOURNAL. Canadian blood services to screen for Chagas disease. v. 177, p. 242, 2007.
- CAVALLI, A.; LIZZI, F.; BONGARZONE, S.; BRUN, R.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; BOLOGNESI, M. L. Privileged struture-guided synthesis of quinazoline derivates as inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 9, p. 3031-3035, 2009.
- CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Med. Chem. Rev.*, v. 2, p. 495-504, 2005.

- CHUNG, M. C.; GUIDO, R. V. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. F.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C. A.; VARANDA, E. A.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 11, p. 4779-4783, 2003.
- CHUNG, M. C.; SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GUIDO, V. C.; NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E. I. Latenciación e formas avançadas de transporte de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 41, p. 155-179, 2005.
- CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; SANTOS, J. L.; GIAROLLA J.; RANDO, D. G.; ALMEIDA, A. E.; BOSQUESI, P. L.; MENEGON, R. F.; BLAU, L. Prodrugs for the treatment of neglected diseases. *Molecules*, v. 13, p. 616-677, 2008.
- CIAPETTI, P.; GIELTHEN, B. Molecular variations based on isosteric replacements. In: WERMUTH, C. G. *The practice of medicinal chemistry*, London: Academic Press, ed. 3, 2008. p.290-342.
- COLASANTI, M.; SALVATI, L.; VENTURINI, G.; ASCENZI, P.; GRADONI, L. Cysteine protease as a target for nitric oxide in parasitic organisms. *Trends Parasitol.*, v. 17, p. 575, 2001.
- CORBETT, C. E. P.; SCREMIN, L. H. G.; LOMBARDI, R. A.; GAMA-RODRIGUES, J. J.; OKUMURA, M. Pancreatic lesion in acute experimental Chagas`disease. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. São Paulo*, v. 57 (2), p. 63-66, 2002.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its Discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 31-40, 2009.
- DAVIES, C.; CARDOZO, R. M.; NEGRETTE, O. S.; MORA, M. C.; CHUNG, M. C.; BASOMBRI, M. A. Hydroxymethylnitrofurazone is active in a murine model of Chagas disease. *Antim. Agents Chemother.*, v. 54, p. 3584-3589, 2010.
- DIAS, J. C. P. Ecological aspects of the vectorial control of Chagas`disease in Brazil. *Cad. de Saúde Pública*, v. 10 (supl. 2), p. 352-358, 1994.
- DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. N. S.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quím. Nova*, v. 32, p. 2444-2457, 2009.
- DURRANT, J. D.; KERANEN, H.; WILSON, B. A.; MCCAMMON, J. A. Computational identification of uncharacterized cruzain binding sites. *Plos Negl. Trop. Dis.*, v. 11, p. e676, 2010.
- DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P.S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and struture-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.*, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

- FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. J. The anti-*Trypanosoma cruzi* activity of Posaconazole in a murine modelo f acute Chagas`disease is less dependent on gamma interferon than that of Benznidazole. *Antim. Agents Chemother.*, v. 51, p. 1359-1364, 2007.
- GARZONI, L. R.; WAGHABI, M. C.; BAPTISTA, M. M.; CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. L.; BRITTO, C. C.; DOCAMPO, R.; OLDFIELD; E.; URBINA, J. A. Antiparasitic activity of risedronate in a murine modelo of acute Chagas`disease. *Int.. J. Antimicrob. Agents*, v. 23, p. 286-290, 2004.
- GUEDES, P. M. M.; OLIVEIRA, F. S.; GUTIERREZ, F. R. S.; SILVA G. K.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M.; FRANCO, D. W.; MATTAS, M. A. V.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, R. S.; SILVA, J. S. Nitric oxide donor *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]₂ as a possible therapeutic approach for Chagas` disease. *Br. J. Pharmacol.*, v. 160, p. 258-269, 2010.
- HARROLD, M. Antihyperlipoproteinemics and inhibitors of cholesterol biosynthesis. In: WILLIAMS, T. A.; LEMKE, T. L. *Foye`s principles of medicinal chemistry*, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, ed. 6, 2008. p. 806-808.
- KERR, I. D.; LEE, J. H.; FARADY, C. J.; MARION, R.; RICKERT, M.; SAJID, M.; PANDEY, K. C.; CAFFREY, C. R.; LEGAC, J.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; ROSENTHAL, P. J.; BRINEN, L. S. Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J. Biol. Chem.*, v. 284, p. 25697-25703, 2009.
- KIASAT, A. R.; KAZEMI, F.; MEHRJARDI, M. F. Synthesis of semicarbazones from carbonyl compounds under solvent free conditions. *Asian J. Chem.*, v. 17, p. 2830-2832, 2005.
- KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*, New York: Wiley-Interscience, 1988.
- KROPF, S. P. Ciência, saúde e desenvolvimento: a doença de Chagas no Brasil (1943-1962). *Tempo*, n. 19, p. 107-124, 2005.
- LENNOX, H. A.; KARCZ, D. A.; TALES, H.; MASRI, M. E. Chagas disease: clinical overview and implications for nursing. *Medsurg Nurs.*, v. 16, p. 229-235, 2007.
- LIAO, Y.; WANG, B. Substituted coumarins as ester-sensitive prodrug moieties with improved release rates. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 9, p. 1975-1800, 1999.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.*, v. 12, p. 23-49, 2005.
- LITTLE, R.; BAILEY, D.; BREWSTER, M.; ESTES, K.; CLEMMONS, R.; SAAB, A.; BODOR, N. Improved delivery through biological membranes XXXIII. Brain enhanced delivery of azidothymidine (AZT). *J. Biopharm. Sci.*, v. 1, p. 1-18, 1990.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE (SUCAM). *Doença de Chagas: clínica e terapêutica*, Brasília, 1990, p. 14-20.
- MORGON, N. H.; COUTINHO, K. *Métodos de química teórica e modelagem molecular*, São Paulo: Livraria da física, 1 ed., 2007.
- NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*, São Paulo: Atheneu, ed. 10, 2003, p. 73-96.
- NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovate lead discovery strategies for tropical disease. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 5, p. 941-955, 2006.
- OLIVEIRA, R. D. DE; ZANI, C. L.; FERREIRA, R. S.; LEITE, R. S.; ALVES, T. M. A.; SILVA, T. H. A.; ROMANHA, A. J. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotona redutase. *Quim. Nova*, v. 31, p. 261-267, 2008.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). *O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América*. In: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/dch-historia-incosur.pdf>, 2001.
- PAGLINI-OLIVA, P.; RIVAROLA, H. W. Central nervous system agents used as *Trypanosoma cruzi* infection chemotherapy: Phenothiazines and related compounds. *Curr. Med. Chem. – Anti-Infect. Agents*, v. 2, p. 323-333, 2003.
- PATRICK, G. L. Computers in medicinal chemistry. In: *An introduction to medicinal chemistry*, Oxford: University Press, ed. 4, 2009. p. 332-376.
- PEREIRA, J. M.; SEVERINO, R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ZOTTIS, A.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; CORREA, A. G. Anarcadic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 8889-8895, 2008.
- PRATT, R. F.; FARACI, W. S. Direct observation by proton NMR of cephalosporate intermediates in aqueous solution during the hydrazonolysis and beta-lactamase-catalyzed hydrolysis of cephalosporins with 3' leaving groups: kinetics and equilibria of the 3' elimination reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 108, p. 5328-5333, 1986.
- QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. *Quim. Nova*, v. 22, p. 584-590, 1999.
- REY, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001 p. 161-176.
- RIVAROLA, H. W.; PAGLINI-OLIVA, P. A. *Trypanosoma cruzi* and trypanothione reductase inhibitors: Phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. *Curr. Drug Targets*, v. 2, p. 43-52, 2002.

- ROLÓN, M.; SECO, E.; VEGA, C.; NOGAL, J. J.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A.; MALPARTIDA, F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 28, p. 104-109, 2006.
- ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 62, p. 576-588, 2010.
- SANCHEZ-DELGADO, R. A.; LAZARDI, K.; RINCON, L.; URBINA, J. A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical disease. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$. *J. Med. Chem.*, v. 36, p. 2041-2043, 1993.
- SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GUIDO, R. V. C.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. Advances in prodrug design. *Mini-Rev. Med. Chem.*, v. 5, p. 893-914, 2005.
- SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. *Br. J. Pharmacol.*, v. 152, p. 112-121, 2007.
- SILVA, J. J. N.; GUEDES, P. M. M.; ZOTTIS, A.; BALLIANO, T. L.; SILVA, F. O. N.; LOPES, L. G. F.; ELLENA, J.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; FRANCO, D. W.; SILVA, J. S. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and *in vitro/in vivo* trypanocidal activity. *Br. J. Pharmacol.*, v. 160, p. 260-269, 2010.
- SINGH, G.; SHARMA, P.D. Mutual prodrugs – a recent trend in prodrug design. *Indian J. Pharm. Sci.*, v. 56, p. 69-79, 1994.
- SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomastid drugs. *Interdiscip. Perspect Infect. Dis.*, v. 2009, p. 1-19, 2009.
- SZAJNMAN, S. H.; LIÑARES, G. E. G.; LI, Z. H.; JIANG, C.; GALIZZI, M.; BONTEMPI, E. J.; FERELLA, M.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. Synthesis and biological evaluation of 2-alkylaminoethyl-1,1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* targeting farnesyl diphosphate synthase. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 3283-3290, 2008.
- TAFT, C. A.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. Current topics in computer-aided drug design. *J. Pharm. Sci.*, v. 97, p. 1089-1098, 2008.
- The Merck Index*. Whitehouse station: Merck Research Laboratories, Division Of Merck & Co., 2006, p. 1142.
- TROSSINI, G. H. G. *Antichagásicos potenciais*: busca racional de compostos com atividade seletiva pela cruzaina, 2008. 350p. [Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

- TROSSINI, G. H. G.; MALVEZZI, A.; AMARAL, A. T.; RANGEL-YAGUI, C. O.; IZIDORO, M. A.; CEZARI, M. H. S.; JULIANO, L.; CHUNG, M. C.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, v. 25, p. 62-67, 2010.
- TROSSINI, G. H. G.; GIAROLLA, J.; REZENDE, L.; AMARAL, A. T.; ZAIM, M. H.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, E. I. Synthesis optimization of hydroxymethylnitrofurazone, na antichagasic candidate, using 3² factorial design. *Lett. Org. Chem.*, v. 7, p. 191-195, 2010.
- URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 311-318, 2009.
- URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.*, v. 115, p. 55-68, 2010.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas` disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.*, v. 19, p. 495-501, 2003.
- VENTURINI, G.; FIORAVANTI, E.; COLASANTI, M.; PERSICHINI, T.; ASCENZI, P. Cys25-nitrosylation inactivates papain. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, v. 46, p. 425-428, 1998.
- VOELKER, R. A century after Chagas disease discovery, hurdles to tackling the infection remain. *J. Am. Med. Ass.*, v. 9, p. 1045-1047, 2009.
- XIANG-QUN, X. Molecular modeling and *in silico* drug design. In: WILLIAMS, T. A.; LEMKE, T. L. *Foye's principles of medicinal chemistry*, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, ed. 6, 2008. p. 54-84.
- WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: _____ WOOLDRIGES, K. R. H; JOLLES G. *Drug Design: fact or fantasy?*, London: Academic Press, 1984. p. 47-72.
- WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: _____ *The practice of medicinal chemistry*, London: Academic Press, ed. 3, 2008. p.721-746.
- WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert. Rev. Mol. Med.*, v. 11, p. 1-24, 2009.
- WHO, World Health Organization. In: http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas/pdf/swg_chagas.pdf, 2007.
- WHO, World Health Organization. In: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>, 2010.

ANEXO – ATIVIDADES ACADÊMICAS

- Participação no Simpósio Internacional do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas (de 8 a 10 de julho de 2009), no Rio de Janeiro.

- Participação do comitê de organização local do I Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas – USP e as Redes Temáticas (de 23 a 25 de setembro de 2009), USP, *campus* de São Paulo.

- XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia – FCF/USP (de 13 a 16 de outubro de 2009).

Pôster apresentado: Design and molecular modeling study of the mutual prodrugs of NFOH and its bioisoster and nitric oxide releasing with potential antichagasic activity.

Autores: SERAFIM, R. A. M.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I.

- 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – RASBQ (de 28 a 31 de maio de 2010), em Águas de Lindóia.

- Pôster apresentado: Avaliação teórica de inibição da cruzaina de *T. cruzi* por pró-fármacos do NFOH e seus bioisósteros contendo liberadores de óxido nítrico.

Autores: SERAFIM, R. A. M.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I.

- Minicurso: Planejamento de Candidatos a Novos Fármacos

- Workshop: Interfaces entre Química e Biologia nas áreas de Produtos Naturais e Química Medicinal

- V Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos – EMMSB (de 23 a 27 de agosto de 2010), em Petrópolis.

- Pôster apresentado: Avaliação teórica de pró-fármacos recíprocos do NFOH e seus bioisósteros contendo liberadores de óxido nítrico com potencial atividade antichagásica.

Autores: SERAFIM, R. A. M.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I.

- Minicurso: Dinâmica Molecular Básica
- Minicurso: Cálculos Quânticos de Estrutura Eletrônica
- XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia – FCF/USP (de 18 a 22 de outubro de 2010).
- Pôster apresentado: Theoretical evaluation of *Trypanosoma cruzi* cruzain inhibition of NFOH prodrugs and their bioisosters containing nitric oxide releasing groups.
Autores: SERAFIM, R. A. M.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I.
- Participação da XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica – SUPFAB / FCF-USP (de 18 a 22 de outubro de 2010).
- 5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem (de 6 a 9 de novembro de 2010), em Ouro Preto.
- Pôster apresentado: Comparison between traditional and solvent-free synthesis of nitrofurazone and its bioisosters with antichagasic activity.
Autores: SERAFIM, R. A. M.; BIGATÃO, H. M.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I.
- Participação do comitê de organização local do II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas – FCF / USP (de 7 a 10 de novembro de 2011).
- II International Symposium on Drug Discovery (de 27 a 29 de julho de 2011), em Araraquara.
- Pôster apresentado: Molecular dynamics simulations of a set of 1,2-dihydro-4-quinazolinamine derivatives as potential i-NOS inhibitors.
Autores: SERAFIM, R. A. M.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, E. I.
- Artigo de revisão em elaboração intitulado “NITRIC OXIDE: STATE OF THE ART IN DRUG DESIGN”.
Autores: SERAFIM, R. A. M.; PRIMI, M. C.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I.