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

Síntese de nitroderivados potencialmente antichagásicos e leishmanicidas para uso em sistemas ADEPT

Kely Medeiros Turra

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dra. Daniela Gonçales Rando

São Paulo
2010

Kely Medeiros Turra

Síntese de nitroderivados potencialmente antichagásicos e leishmanicidas para uso em sistemas ADEPT

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Daniela Gonçales Rando
orientadora/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, Novembro de 2010.

Dedico este trabalho às pessoas acometidas por doenças negligenciadas ou àqueles que possam utilizar estas informações em prol da sociedade.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família, em especial, aos meus pais Carmem e Ayrton e à minha avó Rachel. Agradecer não somente pelo apoio durante o mestrado, mas pela minha vida, pelo amor e educação que sempre me deram. Sem eles seria impossível a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Dra. Daniela Gonçales Rando, por tudo que me ensinou, por toda paciência, por todos conselhos e pela confiança depositada em mim. Trabalhar com ela foi uma etapa de muito aprendizado, não só na vida profissional, mas também pessoal.

À Dra. Elizabeth Igne Ferreira que nos recebeu de braços abertos, fornecendo espaço e material para trabalhar.

Agradecimentos muito mais do que especiais aos meus “anjos-da-guarda”: Dra. Kátia Cilene Alves Botelho e à Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto.

À Kátia por me “aturar” todos os dia no laboratório, por toda ajuda na parte experimental do trabalho, pela paciência, amizade, companhia nas horas de trabalho, nas horas vagas e até mesmo na hora que eu aprontava alguma coisa.

À Kerly, por todos os ensinamentos, não só nos auxiliando a conduzir o trabalho de modelagem molecular, mas também pelos conselhos e amizade.

À Bárbara, por sua amizade, companhia e pelo apoio em todas as horas.

Ao Dr. Guilherme Costa Matsutani por tudo que me ensinou desde a graduação e pelo incentivo para que eu ingressasse na pós-graduação.

Aos amigos Reginaldo e Renê por todo apoio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Charles, por sempre poder contar com sua ajuda.

Aos meus amigos de laboratório: Camila, Gustavo, Hamilton, Jeanine, Marcela, Patrícia, Ricardo, Soraya e Vanessa, pelas risadas, pelos momentos de descontração, companhia nas disciplinas, enfim, por tudo que pudemos compartilhar.

À Dra. Adriana Karla Amorim, do Instituto de Química da USP, pelo auxílio nos estudos de reatividade.

Á Dra. Claudete Valduga, ao Dr.José Quincoces e à UNIBAN pelo apoio fornecido e pelas colaborações na realização das análises de infravermelho.

Ao CNPQ, pela bolsa concedida.

Um verdadeiro cientista deve ser humilde por definição ou ficará aprisionado à corrente de suas próprias idéias, aprisionado a um ego incontido, na ilusão de um conhecimento que não constitui sabedoria. (Autor desconhecido)

LISTA DE ESPECTROS

Espectro	Composto	Análise	
Espectro 1	4-hidroxi(5-nitrotiofen-2-ilmetileno)benzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz)	RMN-^{1}H	108
Espectro 2	4-hidroxi(5-nitrotiofen-2-ilmetileno)benzidrazida(DMSO-d_6, 300 MHz)	RMN-^{13}C	109
Espectro 3	4-hidroxi(5-nitrotiofen-2ilmetileno)benzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz)	Infravermelho	110
Espectro 4	3-amino-4-metilbenzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz)	RMN-^{1}H	113
Espectro 5	3-amino-4-metilbenzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz)	RMN-^{13}C	114
Espectro 6	3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida (DMSO-d6, 300 MHz)	RMN-^{1}H	116
Espectro 7	3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz)	RMN-^{13}C	117
Espectro 8	3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida	Infravermelho	119
Espectro 9	Reação de succinoilação do nitroderivado ***1*** (DMSO-d_6, 300 MHz)	RMN-^{1}H	122
Espectro 10	Composto obtido após a metodologia 2 de obtenção de hemissuccinato do nitroderivado ***1***	Infravermelho	123
Espectro 11	Hemissuccinato do composto ***1*** (DMSO-d_6, 300 MHz)	RMN-^{1}H	127
Espectro 12	Hemissuccinato do composto ***1*** (DMSO-d_6, 300 MHz)	RMN-^{13}C	128
Espectro 13	Hemissuccinato do nitroderivado ***1***	Infravermelho	129
Espectro 14	Derivado ***7*** (DMSO-d_6, 300 MHz)	RMN-^{1}H	137
Espectro 15	Hemissuccinato do derivado ***7*** (DMSO-d_6, 300 MHz)	RMN-^{1}H	139

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	
Figura 1	Distribuição geográfica da Doença de Chagas	2
Figura 2	Ciclo evolutivo do Trypanosoma cruzi nos hospedeiros vertebrado e invertebrado	5
Figura 3	Exemplo do sinal de Romaña, presença de edema bipalpebral unilateral	7
Figura 4	Estrutura química do benznidazol (A) e nifurtimox	20
Figura 5	Estruturas químicas de alguns dos fármacos em estudos para a terapêutica da Doença de Chagas	24
Figura 6	Mecanismo de redução anaeróbia e aeróbia de nitroderivados e os intermediários formados nas reações subsequentes	25
Figura 7	Estruturas químicas de alguns dos fármacos utilizados na terapêutica das leishmanioses	28
Figura 8	Nitroderivados ativos contra Trypanosoma cruzi e Leishmania sp.	30
Figura 9	Estágios do tratamento pelo sistema ADEPT	32
Figura 10	Reação de clivagem de mostarda nitrogenada fosfatada pela enzima fosfatase alcalina	34
Figura 11	Conversão do pró-fármaco epirrubicina-glicuronizada pela enzima β-glicuronidase	34
Figura 12	Catálise de pró-fármaco pela enzima β-lactamase	35
Figura 13	Conversão da 5-flucitosina em 5-fluoruracila pela citosina desaminase	35
Figura 14	Liberação do metotrexato após a clivagem do substrato pela carboxipeptidase A	36
Figura 15	Redução do grupo nitro, do pró-fármaco CB 1954, pela enzima nitrorredutase	36
Figura 16	Sitio ativo da CPG_2: mostra os dois íons de zinco, a molécula de água e alguns dos aminoácidos mais próximos	38
Figura 17	Reação de hidrólise catalisada pela CPG_2	39
Figura 18	Pró-fármacos desenvolvidos por Springer e colaboradores	40
Figura 19	Estruturas dos pró-fármacos estudados por modelagem molecular	46
Figura 20	Estrutura química do metotrexato (MTX)	46
Figura 21	Representação da carboxipeptidase G_2	53
Figura 22	Análise teórica das espécies iônicas do MTX encontradas em diferentes valores de pH	63
Figura 23	Análise teórica das espécies iônicas do pró-fármaco **1** encontradas em diferentes valores de pH	64
Figura 24	Análise teórica das espécies iônicas do pró-fármaco **2** encontradas em diferentes valores de pH	65
Figura 25	Análise teórica das espécies iônicas do pró-fármaco **3** encontradas em diferentes valores de pH	66
Figura 26	Análise teórica das espécies iônicas do pró-fármaco **4** encontradas em diferentes valores de pH.	67

Figura 27	Análise teórica das espécies iônicas do pró-fármaco **5** encontradas em diferentes valores de pH	68
Figura 28	Análise teórica das possíveis espécies iônicas do pró-fármaco **6** encontradas em diferentes valores de pH	69
Figura 29	Representação do MTX no sítio catalítico da CPG_2	74
Figura 30	Aminoácidos que compõem o bolso P1 da enzima CPG_2	75
Figura 31	Representação mostra o bolso P1 e a porção P1' adjacentes ao sítio ativo da CPG_2 (A). Posicionamento do MTX no sítio catalítico da enzima (B)	76
Figura 32	Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2-MTX versus tempo	78
Figura 33	RMSD dos confôrmeros de menor energia mínima da proteína segundo a variação de temperatura	80
Figura 34	Representação do MTX no sítio ativo da CPG_2 após simulações de DM	81
Figura 35	Possível interação entre o carboxilato do resíduo GLUT 175 da CPG_2 com o hidrogênio da amida do substrato	82
Figura 36	Orientação dos pró-fármacos **1** (A), **2** (B) , **3** (C) ,**4** (D), **5** (E) e **6** (F) no sítio ativo da CPG_2	83
Figura 37	Representação dos pró-fármacos **1** (A), **2** (B), **3** (C), **4** (D), **5** (E) e **6** (F) no sítio catalítico da CPG_2	85
Figura 38	Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2- pró-fármaco **1** versus tempo	92
Figura 39	Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2 -pró-fármaco **2** versus tempo	93
Figura 40	Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2-pró-fármaco **3** versus tempo	94
Figura 41	Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2-pró-fármaco **4** versus tempo	95
Figura 42	Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2-pró-fármaco **5** versus tempo	96
Figura 43	Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2-pró-fármaco **6** versus tempo	97
Figura 44	RMSD dos confôrmeros de menor energia mínima da proteína segundo a variação de temperatura para ao pró-fármacos **1** (A), **2** (B), **3** (C), **4** (D), **5** (E) e **6** (F)	99
Figura 45	Pró-fármacos **1** (A), **2** (B) e **3** (C) no sítio ativo da CPG_2. A presença do agente espaçante afasta a porção glutamato do sítio catalítico	100
Figura 46	Representação do pró-fármaco **4** no sítio ativo da CPG_2 após simulações de DM	102
Figura 47	Hipótese da interação entre o carboxilato do resíduo GLUT 176 da CPG_2 com o hidrogênio da amida do substrato	102
Figura 48	Representação do pró-fármaco **5** no sítio ativo da CPG_2 após simulações de DM	103
Figura 49	Possível interação entre o oxigênio do resíduo GLUT 175 da CPG_2 com o hidrogênio amídico do substrato	104
Figura 50	Representação do pró-fármaco **6** no sítio ativo da CPG_2 após simulações de DM	105
Figura 51	Possível interação entre o oxigênio do resíduo GLUT 175 da CPG_2 com o hidrogênio amídico do substrato	106

Figura 52	Espectros de RMN-^{1}H dos sólidos obtidos pelas metodologias 1 (A), 2 (B) e 3(C) aplicadas para obtenção do hemissuccinato do composto **2**.	133
Figura 53	Composto **7**, derivado do composto **1** sem a presença do grupo NO_2	137

LISTA DE TABELAS

Tabela	Descrição	
Tabela I	Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do complexo para a estrutura do MTX	74
Tabela II	Valores de energias computadas nas simulações de DM para os confôrmeros de energia mínima do complexo CPG_2-MTX	79
Tabela III	Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 1	86
Tabela IV	Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 2	87
Tabela V	Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 3	88
Tabela VI	Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 4	89
Tabela VII	Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 5	89
Tabela VIII	Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 6	90
Tabela IX	Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2-pró-fármaco ***1***	92
Tabela X	Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2-pró-fármaco ***2***	93
Tabela XI	Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2-pró-fármaco ***3***	94
Tabela XII	Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2–pró-fármaco *4*	95
Tabela XIII	Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2-pró-fármaco *5*	96
Tabela XIV	Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2-pró-fármaco *6*	97
Tabela XV	Estudos de síntese do succinil 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2-ilmetileno)benzidrazida	120
Tabela XVI	Estudos de síntese do composto 3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida	131
Tabela XVII	Estudos de síntese do 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2ilmetileno)benzidrazida	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alanina	ALA
Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy	ADEPT
Arginina	ARG
Asparagina	ASP
Carboxipeptidase G_2	CPG_2
Catepsina B-like	cpB
Cisteíno-proteases catepsina L-like	cpL
Cromatografia em camada delgada	CCD
Dicicloexilcarbodiimida	DCC
Dicicloexiluréia	DCU
Dimetilaminopiridina	DMAP
Dimetilsulfóxido	DMSO
Dinâmica molecular	DM
Energia correspondente à soma das contribuições de energia eletrostática e de van der Waals intermoleculares	INTERV+C
Energia de deformação angular	Eang
Energia de deformação axial ou estiramento	Eest
Energia de interação do tipo 1-4 ou Lennard-Jones	E1,4
Energia de ligação de hidrogênio	EHb
Energia de solvatação	Esolv
Energia de van der Waals	EvdW
Energia eletrostática	Eel
Energia torsional	Etors
Energia total (potencial)	Etot
Fenilalanina	PHE
Gene-Directed Enzyme-Prodrug Therapy	GDEPT
Glutamato	GLU
Histidina	HIS
Infravermelho	IV
Interações entre os Orbitais Naturais de Ligação	NBO
Isoleucina	ILE
Kelvin	K
Lisina	LYS

Leishmaniose Tegumentar Americana	LTA
Leishmaniose visceral	LV
Mecânica Molecular	MM+
Metotrexato	MTX
N,*N*- carbonildiimidazol	CDI
Picossegundos	ps
Protein Data Bank	PDB
Ressonância Magnética Nuclear	RMN
Serina	SER
Tetraidrofurano	THF
Temperatura ambiente	T.A.
Tetrametilsilano	TMS
Treonina	THR

SUMÁRIO

LISTA DE ESPECTROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	xviii
1.1. Doença de Chagas	2
1.1.1. Transmissão	3
1.1.2. Ciclo	4
1.1.3. Fases clínicas	6
1.1.4. Forma crônica cardíaca	8
1.1.5. Forma crônica digestiva	9
1.1.6. Forma crônica nervosa	9
1.2. Leishmanioses	9
1.2.1 Agente etiológico	10
1.2.2. Transmissão	12
1.2.3. Reservatório	13
1.2.4. Formas clínicas	13
1.2.4.1. Leishmaniose Tegumentar Americana	14
1.2.4.2. Leishmaniose visceral	17
1.3. Quimioterapia das parasitoses	
1.3.1. Fármacos aplicados na terapêutica da Doença de Chagas	19
1.3.2. Fármacos aplicados na terapêutica das Leishmanioses	26
1.3.3. Agentes promissores em estudo	28
1.4. Sistema ADEPT: Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy	31
1.4.1. Carboxipeptidase G2	37
1.5. Modelagem Molecular	41
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1.Materiais	
3.1.1. Programas computacionais	48

3.1.2. Estruturas cristalografadas 49
3.1.3. Reagentes 49
3.1.4. Solventes 50
3.1.5. Solventes deuterados 50
3.2. Métodos
3.2.1. Estudos de modelagem molecular 51
3.2.1.1. Construção das estruturas dos pró-fármacos 51
3.2.1.2. Minimização de energia dos modelos dos pró-fármacos 52
3.2.1.3. Processamento da proteína para os estudos de ancoramento 52
3.2.1.4. Estudos de ancoramento 53
3.2.1.5. Estudos de dinâmica molecular (DM) 54
3.2.2. Síntese
*3.2.2.1. Preparação dos nitroderivados ativos **1** e **2*** 55
3.2.2.2. Preparação dos derivados benzidrazídicos não-nitrados 56
3.2.2.3. Síntese dos pró-fármacos 58
*3.2.2.4. Succinoilação do derivado **7*** 58
3.2.3. Métodos analíticos 59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO
4.1. MODELAGEM MOLECULAR 61
4.1.1. Aplicação do software *Marvin Beans* 62
4.1.2. Desenho e otimização das estruturas dos pró-fármacos 71
4.1.3. Ancoramento 71
4.1.4. Dinâmica molecular
4.1.4.1. Dinâmica molecular dos pró-fármacos 91
4.2. SÍNTESE 107
5. CONCLUSÂO 143
6. PERSPECTIVAS 145
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 147
ANEXO A

RESUMO

Doenças negligenciadas acometem milhares de pessoas em todo o mundo, principalmente em países subdesenvolvidos. A exemplo destas encontram-se doenças como a leishmaniose e a doença de Chagas que representam relevantes problemas de saúde pública. As terapias disponíveis para estas doenças tropicais, contudo, estão longe de serem satisfatórias e eficazes, considerando-se que os quimioterápicos existentes apresentam reconhecida toxicidade, alto custo e eficácia moderada. Com o propósito de obter alternativas terapêuticas otimizadas, este projeto de pesquisa teve como objetivo a obtenção de pró-fármacos de compostos nitroderivados com comprovada atividade leishmanicida e antichagásica para serem utilizados em sistemas ADEPT visando maior eficácia e menor toxicidade no tratamento destas parasitoses. A princípio, duas frentes de trabalho em paralelo foram adotadas: uma teórica, para determinação do mecanismo catalítico da carboxipeptidase G_2 (CPG_2) e obtenção de informações relacionadas ao mecanismo de clivagem dos pró-fármacos propostos, e a outra sintética, para obtenção dos compostos propriamente ditos. Estudos teóricos de ancoramento e dinâmica molecular da CPG_2 com um de seus reconhecidos substratos, o metotrexato, indicaram que o mecanismo de ação proposto para metaloproteases em geral também pode ser aplicado a esta enzima. Informações relacionadas ao mecanismo de clivagem dos pró-fármacos propostos também foram obtidas. A rota sintética inicialmente proposta para a obtenção dos pró-fármacos partia da ligação dos nitroderivados ao ácido glutâmico por intermédio de um agente espaçante, o ácido succínico. Com base nas informações obtidas nos estudos teóricos, entretanto, o projeto foi reformulado focando-se na síntese dos pró-fármacos sem agente espaçante, pois estes se mostraram mais favoráveis ao reconhecimento pela enzima. Com relação à síntese, a obtenção dos compostos planejados não foi alcançada a despeito dos esforços empreendidos. Estudos teóricos e experimentais de reatividade parecem comprovar a tese de que o grupo nitro desativa

as funções nucleofílicas das estruturas dos nitrocompostos que seriam fundamentais para as reações de acoplamento ao transportador ácido glutâmico.

Este achado, contudo, constitui um importante problema a ser solucionado, visto que nitroderivados parecem exercer suas atividades principalmente mediante redução do grupo nitro e produção de espécies reativas de oxigênio nas redondezas dos parasitas.

ABSTRACT

Neglected diseases affect millions of people around the world for the most part in underdeveloped countries. Leishmaniasis and Chagas disease are example of important public health problems spread through Africa, Asia and Latin America. Unfortunately, currently available chemotherapy to treat these diseases remains ineffective, being the most frequently applied drugs toxic, expensive and of moderate potency.

By considering this actual picture and envisioning new therapeutic alternatives, the aim of this work was to design and synthesize potential antichagasic and antileishmanial prodrugs of nitroderivatives to be used in Antybody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT), a drug design approach which results in targeted delivery of the active compounds, increasing their potencies in addition to lowering their toxicity.

Theoretical studies to determine the catalytic mechanism of the carboxypeptidase G_2 (CPG_2) and to obtain information about the cleavage mechanism of proposed prodrugs were performed whereas different synthetic approaches were made to obtain the compounds. Docking and molecular studies of the CPG_2 considering theoretical interactions with its known substrate, methotrexate, indicated that the proposed general mechanism for metalloproteases could be indeed applied to this enzyme. Information about the cleavage mechanism of prodrugs was also obtained. Initially prodrugs proposed were composed by nitroderivatives structures attached to glutamic acid, the chosen transporter agent, by a spacer group, the succinic acid. Theoretical studies, however, had showed that prodrugs constructed without a spacer agent could be better recognized by the enzyme. These results re-directed the synthetic approach to new prodrug structure without spacer.

Despite all efforts spent, it was impossible to obtain the proposed prodrug structures. Experimental reactivity studies were then accomplished, since it was possible that the nitro group, from nitroderivatives structure, was able to reduce the nucleophilic power of particular functional

groups chosen to accomplish the coupling between the active compound and the transporter. The results corroborate this hypothesis and the absence of nitro group facilitates the prodrug synthesis.

This, however, constitute an important problem to be solved since the nitroderivative seams to exert their function mainly by nitro group reduction and production of free radical species in the surrounding of the parasites.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi (T. cruzi)*, foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. Registros mais remotos de sua existência, entretanto, foram evidenciados em múmias em Chinchorro, no Peru, datadas de 9.000 anos de idade (FIOCRUZ, 2010).

Esta doença é circunscrita à América Latina e representa, ainda hoje, cem anos após sua descoberta, relevante problema de saúde pública. Sua distribuição geográfica estende-se desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile (DIAS *et al*., 2009; WERNER *et al.*, 2008).

Figura 1. Distribuição geográfica da Doença de Chagas
Adaptado de: http://earthtrends.wri.org/updates/node/184. Fonte: World Health Organization

Atualmente, estima-se que 8 a 9 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita (PAHO, 2009). É uma enfermidade crônica debilitante e incapacitante que apresenta significativo índice de mortalidade entre os portadores, também chamados de pacientes chagásicos,

principalmente dentre os que desenvolvem cardiopatia chagásica crônica, podendo levar à morte, no mínimo, de 15.000 pessoas por ano somente no Brasil (ARGOLO *et al*., 2007; BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

Dados adicionais atestam que a perda econômica relacionada à mortalidade e morbidade de populações jovens devido a Doença de Chagas são cifras superiores a U$$ 8156 milhões/ano (PAHO,2009).

1.1.1. Transmissão

A maior parte dos casos de infecção, tanto em seres humanos quanto em outros vertebrados, ocorre principalmente pela picada de insetos hematófagos vetores. Outras vias de transmissão como a transfusão sanguínea, a via congênita ou pelo aleitamento materno, e transplante de órgãos contaminados, a via oral e a inoculação acidental em laboratório não devem ser descartadas (FIOCRUZ, 2010; BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

O inseto vetor da doença de Chagas é o triatomíneo hematófago vulgarmente conhecido como barbeiro. A transmissão ocorre quando o inseto, infectado com o *T. cruzi*, suga o sangue do indivíduo e defeca próximo à picada. A picada por si não transmite a doença, mas em geral, causa ardência local que provoca coceira. O ato de coçar acaba por introduzir no organismo a forma infectante do parasita contida nas fezes do barbeiro, via orifício da picada ou, ainda, através de mucosas como a boca e a conjuntiva ocular (ARGOLO *et al*., 2007).

No Brasil, durante as duas últimas décadas, a transmissão transfusional ganhou grande importância epidemiológica devido à migração de indivíduos infectados da zona rural para os centros urbanos. Se por um lado a migração reduzia a exposição da população rural a vetores infectados, por outro, ela aumentava a probabilidade de contaminação por *T. cruzi* em indivíduos politransfundidos, principalmente quando não se observava rigoroso controle nos bancos de

sangue. Atualmente, os riscos desta via de transmissão da Doença de Chagas no Brasil são mínimos, sendo estimado entre três e vinte ocorrências no contexto de mais de 4 milhões de transfusões anuais. Tais avanços devem ser considerados graças à seleção sorológica rigorosa de doadores nos bancos de sangue (DIAS, 2006).

A transmissão vertical da infecção chagásica pode ocorrer por via transplacentária ou pelo leite materno. Quando há infecção através da placenta, problemas como aborto, prematuridade, neomortalidade e retardo de crescimento intrauterino podem ser observados. Já a amamentação constitui forma rara de transmissão. Aventa-se que isso se deva à proteção fornecida à criança pelos anticorpos maternos (BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

A via oral tem sido sugerida desde que episódios agudos da doença foram observados em áreas isentas de vetores domiciliares do *T. cruzi*. Esta transmissão ocorre pela ingestão de alimentos contaminados pelas fezes de triatomíneos e evidencia a capacidade dos parasitas em penetrar através da membrana do trato gastrintestinal além de resistir aos líquidos do suco gástrico (WERNER *et al.*, 2008; CAMANDAROBA, LIMA, ANDRADE, 2002; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991).

A transmissão por acidente laboratorial ocorre quando da manipulação inadequada de material contaminado, entretanto esta via possui pouca significância epidemiológica (BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

1.1.2. Ciclo

O *T. cruzi*, protozoário hemoflagelado da ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, responsável pela infecção chagásica, apresenta ciclo biológico complexo, conforme representado na Figura 2. Seu ciclo de vida encontra-se dividido em duas etapas, sendo que, uma delas ocorre no hospedeiro invertebrado (vetor) e outra em hospedeiros

vertebrados como mamíferos de pequeno e médio porte, incluindo o homem (CIMERMAN,CIMERMAN, 2002).

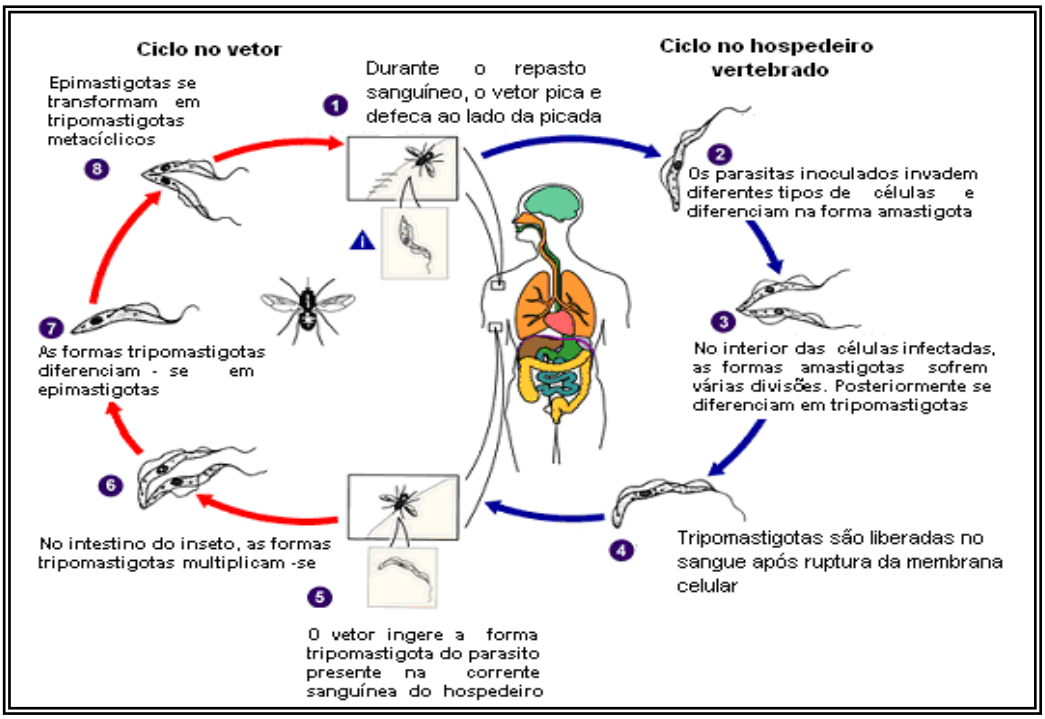


Figura 2. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Adaptado de:http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/S-Z/TrypanosomiasisAfrican/body_TrypanosomiasisAfrican_Page1.htm

Os hospedeiros invertebrados são insetos hemípteros da família *Reduviidade*, vulgarmente conhecidos como barbeiros, que durante seu repasto, ingerem a forma tripomastigota do parasita encontrada na corrente sanguínea de hospedeiros vertebrados infectados. Já na luz do estômago deste inseto, o *T. cruzi* inicia seu ciclo de multiplicação dando origem à forma flagelada denominada epimastigota. Estas, ao atingirem a porção terminal do intestino, diferenciam-se em tripomastigota metacíclica, as quais constituem a forma infectante da doença e que serão eliminadas para o ambiente nas dejeções do triatomíneo (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

Como anteriormente explicado, as formas tripomastigotas entram no hospedeiro vertebrado através do orifício da picada e, ao atingirem a corrente sanguínea, necessitam, obrigatoriamente, invadir uma célula para cumprir seu ciclo vital. Nesta fase, os tripomastigotas invadem células das fibras musculares lisas e estriadas, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais onde assumem forma arredondada denominada amastigota. Estas, por sua vez, participam do processo de multiplicação intracelular e, após um processo de sucessivas divisões binárias, saturam as células de parasitas. Segue-se, então, um processo de distensão e rompimento das células parasitadas, no qual formas amastigotas e tripomastigotas são liberadas na corrente sanguínea juntamente com diversos mediadores de inflamação. As formas amastigotas se degeneram enquanto que as tripomastigotas invadem as células vizinhas. Os parasitas mortos apresentam característica imunogênica acentuada e são os responsáveis por desencadear a resposta inflamatória inicial, dando origem à fase aguda da doença (FIOCRUZ, 2010; BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

1.1.3. Fases clínicas da Doença de Chagas

Clinicamente, a doença em humanos caracteriza-se por duas fases: a aguda e a crônica.

A fase aguda, quando sintomática, pode surgir após 7 a 10 dias da infecção pelo *T. cruzi*. Esta fase representa período de alta parasitemia e de infecção generalizada, em diferentes tipos celulares, causada pelo protozoário. Caracteriza-se por sintomas como mal-estar, quadro febril moderado, hepatoesplenomegalia, distúrbios cardíacos podendo ser confundida com outras infecções (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002; BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

Os sinais mais característicos são o chagoma de inoculação com a presença de inchaço no local da picada e o sinal de Romaña, em que existe a presença de edema bipalpebral unilateral, que ocorre quando o barbeiro pica próximo aos olhos (Figura 3) (ARGOLO *et al*., 2007; BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

Figura 3. Exemplo do sinal de Romaña, presença de edema bipalpebral unilateral.
Fonte: http://apuntesdemed.blogspot.com/2008/04/trypanosomosis-enfermedad-de-chagas.html

A fase aguda perdura até o momento em que o hospedeiro consegue estabelecer uma resposta imune suficiente para reprimir os processos inflamatórios uni ou multifocais e diminuir, paulatinamente, a parasitemia. Este período caracteriza o início da fase crônica da doença (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

A fase crônica é a mais relevante da doença devido aos danos irreversíveis causados pelo parasita, os quais diminuem a qualidade de vida do paciente podendo levá-lo, inclusive, à morte (ARGOLO *et al*., 2007). Esta fase pode se manifestar após período de latência assintomático o qual pode durar anos e que se caracteriza por comprometimento cardíaco e/ou por distúrbios digestivos e neurológicos.

O período de latência assintomático trata-se da forma crônica indeterminada. Nesta fase existe um estado de aparente equilíbrio entre parasita e hospedeiro, apresentando baixa parasitemia e altos níveis de anticorpos circulantes no sangue. A progressão da infecção

dependerá da complexa relação entre o parasita e o hospedeiro, envolvendo fatores ambientais e genéticos de ambos como comprovado por estudos recentes que apontam a possibilidade de predisposição genética ao desenvolvimento de uma das formas clínicas crônicas da doença de Chagas em alguns pacientes (FIOCRUZ, 2010).

1.1.4. Forma crônica cardíaca

A forma crônica cardíaca é a mais importante forma de manifestação clínica da doença de Chagas, dado o elevado número de óbitos decorrentes de sua instalação e ao seu significativo poder debilitante e incapacitante. No Brasil, onde a infecção por *T. cruzi* é endêmica, a cardiopatia chagásica crônica está entre as principais causas de incapacitação e aposentadoria. Suas principais consequências são lesões no miocárdio, de evolução inflamatória e fibrosante, que resultam em insuficiência cardíaca progressiva, fenômenos tromboembólicos e arritmias, de curso fatal (FIOCRUZ, 2010; BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000). As limitações funcionais advindas da forma crônica cardíaca, além de afetarem a saúde do indivíduo de forma global, são responsáveis por elevado impacto sócio-econômico no País. Geram altos custos tanto de maneira direta como internações hospitalares, procedimentos ambulatoriais e tratamento, quanto custos indiretos, com previdência social, na concessão de auxílios-doença e aposentadorias precoces relacionadas à moléstia (BATISTA *et al.*, 2007). Estima-se que o custo para a implantação de marca-passos e de cirurgias corretivas em pacientes chagásicos crônicos represente mais de 750 milhões de dólares por ano. Este valor, somado aos 237 milhões de dólares decorrentes de problemas sociais como absenteísmo no trabalho, aposentadoria precoce e às mortes prematuras relacionadas à doença, representa o prejuízo anual que a doença de Chagas acarreta nos países endêmicos (MEYER, KANESHIMA, KANESHIMA, 2006).

1.1.5. Forma crônica digestiva

A forma digestiva da doença caracteriza-se pela dilatação de vísceras ocas, como o esôfago e o cólon, causando alterações em sua morfologia e em sua motilidade, devido às lesões em plexos nervosos (FIOCRUZ, 2008; CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

A ocorrência do megaesôfago e do megacólon são as manifestações mais comuns, alterações de secreção e absorção no trato digestivo, distensão abdominal, fecaloma, constipação, regurgitação e odinofagia também são frequentes (VILLELA *et al*., 2007; HUEB, 2006).

1.1.6. Forma crônica nervosa

No âmbito de sistema nervoso central e autônomo, a doença em sua forma crônica pode provocar alterações de intensidade variáveis, geralmente pouco perceptíveis. Porém, essa forma descrita e referida por Chagas várias vezes, carece ainda de melhores estudos (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002; BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

1.2. Leishmanioses

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*. Podem afetar tanto animais silvestres e domésticos quanto seres humanos (BISUGO *et al*., 2007; GONTIJO, 2004; CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), a leishmaniose ocorre em 88 países e está entre as sete mais importantes doenças de origem parasitária do mundo. Estima-

se que aproximadamente 12 milhões de pessoas estejam infectadas e considera-se que, anualmente, ocorram 2 milhões de novos casos (WHO, 2010).

No Brasil, a doença em sua forma dermotrópica, apresenta ampla distribuição por todas as regiões geográficas, sendo predominante na região norte do País. Já a sua forma visceral acomete, principalmente, a região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A importância atual desta zoonose é significativa, sobretudo quando se considera o problema no Brasil, já que a mesma parece estar em expansão em algumas áreas do território nacional (BISUGO *et al.*, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

1.2.1. Agente etiológico (SONODA, 2007; CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

A leishmaniose é causada por vinte diferentes espécies de protozoários patogênicos pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, da família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* (WHO, 2010).

O gênero *Leishmania* divide-se em dois subgêneros, *Leishmani*a e *Viannia*, que são classificados de acordo com o local que se desenvolvem no tubo digestório do vetor. O desenvolvimento do subgênero *Leishmania* restringe-se à porção anterior e média do tubo digestório do vetor, já o *Viannia* desenvolve-se desde a porção anterior até a posterior do órgão. Estes subgêneros compreendem várias espécies que estão envolvidas em espectro de doenças infecciosas de caráter crônico, incluindo manifestações dermotrópicas e viscerais.

As espécies mais importantes, no Brasil, responsáveis pela doença em sua forma dermotrópica são:

⇨ ***Leishmania (Leishmania) amazonensis***: Esta espécie distribui-se pelas florestas da Amazônia, região Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Está associada à leishmaniose cutânea localizada e cutânea difusa (VILLELA *et al*., 2007);

⇨ ***Leishmania (Viannia) guyanensis***: Espécie aparentemente limitada ao Norte da bacia Amazônica, que se estende pelas Guianas. Ocorre, principalmente, em florestas de terra firme. Associa-se à leishmaniose cutânea com múltiplas lesões, por vezes, podendo acometer o sistema linfático, mas raramente comprometem mucosas (VILLELA *et al*., 2007);

⇨ ***Leishmania (Viannia) braziliensis***: Apresenta ampla distribuição por todo o território nacional. É responsável pela leishmaniose cutânea, mucocutânea e ganglionar.

À leishmaniose visceral são correlacionadas três principais espécies: (MELO, 2004).

⇨ ***Leishmania (Leishmania) donovani***: Presente na costa oeste da Índia, leste da África e Bangladesh;

⇨ ***Leishmania (Leishmania) infantum***: Espécie que ocorre na China, Ásia Central, Europa e África;

⇨ ***Leishmania (Leishmania) chagasi***: Espécie encontrada nas Américas do Sul e Central, com exceção do Chile. Estudos bioquímicos e moleculares recentes mostraram semelhanças entre esta espécie e a *L. infantum*.

1.2.2. Transmissão

As leishmanioses são transmitidas entre os animais e o homem pela picada de fêmeas de diversas espécies de insetos dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Plhebotominae*, conhecidos genericamente por flebotomíneos (WHO, 2010; CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

No mundo, das quinhentas espécies de flebotomíneos conhecidas, somente trinta foram descritas como sendo vetores da doença. Entretanto, a espécie e o gênero do vetor responsável pela sua transmissão variam conforme a espécie do agente etiológico e sua localização geográfica (WHO, 2010; VILLELA *et al*., 2007; MELO, 2004).

Durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, os flebotomíneos ingerem formas amastigotas do parasita, as quais permanecem de 4 a 25 dias no tubo digestivo do inseto. Neste local passam por uma série de transformações morfológicas e fisiológicas, diferenciando-se em formas promastigota e paramastigota e, por fim, em promastigotas metacíclicas, sendo estas, as formas infectantes do parasita (WHO, 2010). Estas formas migram e instalam-se nas glândulas salivares destes insetos e, desta forma, estes, ao se alimentarem novamente, inoculam a forma infectante na pele do novo hospedeiro juntamente com sua saliva (MELO, 2004).

Em todos os países da América, exceto no Chile, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é identificado como a espécie vetora da *L. chagasi*, sendo esta a principal espécie responsável pela transmissão da leishmaniose visceral no Brasil (SONODA, 2007; MELO, 2004). Já o vetor da leishmaniose tegumentar americana, outra forma de manifestação clínica das leishmanioses, parece pertencer aos gêneros *Psychodopigus* e *Lutzomyia (*VILLELA *et al*., 2007). Espécies como *L. pessoai, L. intermedia, L. migonei, L. whitmani, L. intermedia, L fischeri, L. firmatoi, L. amarali,* dentre outras, também estão associadas à transmissão da doença no Brasil (SILVA, CUNHA, 2007; CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

1.2.3. Reservatório

As diferentes espécies dos parasitas discutidas anteriormente apresentam, como hospedeiros, não só o ser humano, mas, também, alguns vertebrados que atuam como reservatório para esta doença. Assim como os vetores, os reservatórios também variam de acordo com a espécie de *Leishmania* em questão. A importância em se conhecer os reservatórios vertebrados do parasita reside em identificar possíveis focos de infecção e disseminação da doença (WHO, 2010).

Animais silvestres e domésticos são os reservatórios mais comuns do parasita. No ambiente silvestre, gambás, raposas, marsupiais, primatas e roedores são descritos como reservatórios. No âmbito doméstico, o cão é considerado a principal fonte de infecção, devido à apresentação de alto parasitismo cutâneo, que pode facilitar a infecção de flebotomíneos (BISUGO, 2007; CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

1.2.4. Formas clínicas

De acordo com a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção podem ocorrer diferentes manifestações clínicas da doença classificadas, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), como leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. A leishmaniose cutânea caracteriza-se por lesões ulcerosas em partes expostas do corpo tais como face, braços e pernas e costuma regredir espontaneamente. A leishmaniose cutânea, quando não tratada adequadamente, pode evoluir para a mucocutânea que se caracteriza por imunidade celular exacerbada e lesões altamente destrutivas. Em conjunto, estas duas manifestações também são classificadas como leishmaniose tegumentar (SONODA, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A leishmaniose visceral, que tem como principal agente etiológico a *L. donovani,* afeta o sistema fagocitário mononuclear e acomete órgãos como o fígado, baço, medula óssea, podendo causar manifestações intestinais, fenômenos hemorrágicos, hepatoesplenomegalia, dentre outros. Caso o tratamento adequado não seja instituído a tempo, esta infecção pode ser potencialmente fatal (GONTIJO, 2004; CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

1.2.4.1. Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é conhecida em quase todos os países americanos, estendendo-se do sul dos Estados Unidos ao Norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição por todas as regiões geográficas, destacando-se na região Norte (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

As primeiras referências a esta forma da doença, no Brasil, foram descritas em 1855, por Cerqueira, que a denominou como “botão de Biskra”. Em 1909, após grande epidemia de casos de úlceras acompanhadas de lesões mucosas, em Bauru e São Paulo, Lindemberg e Carine & Paranhos identificaram o seu agente etiológico como sendo a *L. tropica* (VALE, FURTADO, 2005; CIMERMAN, CIMERMAN, 2002). Desde as duas últimas décadas, a doença apresenta-se em franco crescimento, tanto em magnitude quanto em expansão geográfica (SILVA, CUNHA, 2007; GUERRA *et al.*, 2006).

Esta classificação abrange duas manifestações clínicas da doença que são, classicamente, conhecidas como leishmaniose cutânea e mucocutânea.

⇨ *Leishmaniose cutânea*

Esta manifestação da parasitose caracteriza-se pelo parasitismo de células do sistema fagocítico monocuclear (monócitos, histiócitos e macrófagos) da pele de hospedeiros vertebrados (VILLELA *et al*., 2007; CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

Caracteriza-se por diversos sintomas clínicos, que incluem afecções dermatológicas associadas a lesões cutâneas ulcerosas. Tais manifestações apresentam, contudo, características peculiares associadas às diferentes espécies causadoras (VILLELA *et al*., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000). No geral, as lesões típicas são úlceras crônicas de 2 a 5 cm de diâmetro, com bordas endurecidas, que podem estar cobertas por uma crosta endurecida ou apresentar exsudato, tornando-se dolorosa se muito grande ou infectada com agentes secundários, como bactérias ou leveduras. A infecção pode produzir grande número de lesões causando graves danos estéticos, que podem comprometer o convívio social do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

De forma geral, a apresentação cutânea, pode ser subclassificada como cutânea localizada, cutânea disseminada ou cutânea difusa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004):

Na forma cutânea localizada, ocorre o aparecimento de lesão única ou múltipla, em geral, ulcerosa com bordas elevadas, no(s) ponto (s) onde houve a picada infectante do vetor. Já a forma cutânea disseminada caracteriza-se por numerosas pequenas lesões ulceradas distantes do local da picada e, no geral, distribuídas por todo o corpo. Estas provavelmente ocorrem devido à disseminação hematogênica ou linfática do parasita (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Na apresentação cutânea difusa, que constitui manifestação rara da leishmaniose tegumentar, existe deficiência imunológica específica do hospedeiro a antígenos contra *Leishmania*. Esta variante é causada por subespécies diferentes, que são capazes de induzir o

hospedeiro infectado à imunodepressão específica. Os aspectos clínicos, imunológicos e parasitológicos são diferentes das outras formas da leishmaniose tegumentar. Neste caso, existe maciço comprometimento dérmico, que pode recobrir grandes extensões cutâneas e geralmente são de tratamento difícil ou ineficaz (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A leishmaniose cutânea tende à cura espontânea em período que pode variar de meses a anos, mesmo na ausência de tratamento. A partir daí o paciente poderá permanecer clinicamente curado por tempo indefinido, apresentar recidivas ou evoluir para a leishmaniose mucosa tardia (WHO, 2010).

⇨ *Leishmaniose mucocutânea* (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002)

A leishmaniose mucocutânea, também referida como leishmaniose mucosa tardia, ocorre, na maioria das vezes, secundariamente às lesões cutâneas prévias que foram submetidas a tratamentos ineficientes. Acredita-se que seja consequência de metástases hematogênicas que acometam mucosas de vias aéreas superiores. Os mecanismos pelos quais as leishmanias conseguem sobreviver em latência no organismo do hospedeiro durante anos e os fatores desencadeantes da doença, entretanto, ainda precisam ser elucidados. Esta variante acomete a via ororrespiratória, causando destruição das cavidades nasais, seguida pela destruição da faringe, laringe e cavidade oral.

Às vezes, a forma mucocutânea pode apresentar origem indeterminada, ou seja, as lesões mucosas podem se apresentar clinicamente isoladas, sem que haja evidências de LTA prévia.

A leishmaniose mucocutânea pode ser subclassificada como:

- ⇨ Leishmaniose mucosa contígua
- ⇨ Leishmaniose mucosa concomitante

Na leishmaniose mucosa contígua, a mucosa é acometida em consequência da propagação direta das lesões cutâneas próximas. Já em sua apresentação concomitante, as lesões mucosas encontram-se distantes das lesões cutâneas.

Caracteriza-se por apresentar uma imunidade celular exacerbada e lesões altamente destrutivas causando deformações desfigurantes da região oral e nasofaríngea, que aparecem tardiamente após a cicatrização das lesões primárias.

1.2.4.2. Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo. É endêmica em 62 países dos quatro continentes, especialmente em países subdesenvolvidos. Os países das Américas do Sul e Central atingidos são: Brasil, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname, Panamá, México, Belize, Guatemala, Paraguai, Bolívia e Colômbia (BISUGO, 2007; MELO, 2004).

Anualmente, registram-se mais de 500 mil novos casos de LV no mundo, sendo que 90% destes correspondem a países como Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (MELO, 2004). No continente americano, o Brasil é responsável por mais de 90% dos casos registrados (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

No Brasil, as primeiras referências a esta doença datam de 1911 quando Carlos Chagas suspeitou de sua ocorrência nas proximidades do rio Amazonas (SONODA, 2007). Atualmente, a

LV é considerada endêmica em 19 estados do País, sendo sua maior incidência registrada na região Nordeste (TORRES, FILHO, 2006).

A Organização Mundial de Saúde aponta aumento do número de casos de LV no Brasil desde 1999. Em nosso país, esta manifestação da leishmaniose era, inicialmente, de distribuição rural, entretanto encontra-se em expansão para focos urbanos desde a década de 1980 (WHO, 2010).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar americano, é uma infecção generalizada do sistema fagocitário mononuclear. Esta é a forma mais grave das leishmanioses e, caso não tratada em tempo hábil, pode evoluir a óbito em mais de 90% dos casos (MELO, 2004).

Após a transmissão pelo vetor, ocorre multiplicação do parasita no citoplasma das células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM), tecido a partir do qual, por via hematogênica, ocorrerá a disseminação do parasita, atingindo vísceras com maior riqueza de células deste sistema. Os órgãos mais afetados são o baço, o fígado, os linfonodos, a medula óssea e a pele. Outros órgãos também podem ser atingidos, como o intestino, os pulmões e os rins. Nos casos mais avançados da doença todos os órgãos são envolvidos (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002, MELO, 2004).

As manifestações clínicas apresentam intensidade variável, sendo fatores determinantes para a sua evolução e gravidade da doença, a idade, o estado nutricional e as características imunogenéticas do paciente. Deve-se considerar, contudo, que, uma parte dos indivíduos acometidos pode permanecer assintomática por toda a vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Após o período de incubação, que pode variar de três semanas a seis meses, a doença apresenta, inicialmente, sintomas clássicos como discreta hepatoesplenomegalia, febre, palidez, perturbações intestinais e tosse (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Caso não seja instituído tratamento adequado, com agravamento progressivo da doença, o paciente evolui para um

quadro de hepatoesplenomegalia volumosa, com aumento de volume do abdômen, febre persistente, anemia e infarto de linfonodos. Clinicamente, a doença em seu período terminal caracteriza-se por manifestações hemorrágicas, caquexia extrema, além de complicações infecciosas associadas que, geralmente, evoluem ao óbito (WHO, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

1.3. Quimioterapia das parasitoses

1.3.1. Fármacos aplicados na terapêutica da Doença de Chagas

Após a descoberta da Doença de Chagas, em 1909, diversos agentes como os derivados quinolínicos, arsênicos, sais de ouro, bismuto, estanho, iodeto de sódio, violeta de genciana, ácido salicílico, anti-histamínicos, sulfonamidas, cortisona e mais de trinta antibióticos passaram a ser empregados em sua terapêutica até a década de 1960 (COURA, CASTRO, 2002). A maioria destes compostos apresentava, contudo, apenas efeito supressivo sobre a parasitemia, não sendo eficazes na cura da infecção (BRENER, 1968).

Estudos realizados por Packchanian na década de 1950 (PACKCHANIAN, 1957; PACKCHANIAN, 1952) demonstraram resultados promissores com a utilização de derivados nitrofurânicos no tratamento de ratos infectados por *T.cruzi*. Um destes derivados, a 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona, foi testado, posteriormente, *in vivo*, tanto para casos agudos quanto crônicos desta parasitose. Apesar da boa eficácia clínica, o derivado apresentou grande incidência de efeitos colaterais relacionados, principalmente, à dose utilizada (COURA *et al*., 1962; FERREIRA, 1961).

Desde o início da década de 1970, dois fármacos, descobertos empiricamente, começaram a ser utilizados no tratamento da Doença de Chagas: o nifurtimox e o benznidazol.

Atualmente, é empregado para o tratamento da doença de Chagas, no Brasil, apenas um: o benznidazol (URBINA, DOCAMPO, 2003; COURA, CASTRO, 2002).

O benznidazol (Figura 4), tradicional antiparasitário produzido pela *Roche* e comercializado pelo nome Rochagan® ou Radanil®, é ativo somente contra as formas sanguíneas do parasita e seus efeitos colaterais são bastante abrangentes, incluindo desde efeitos gástricos até leucopenia (JANNIN, VILLA, 2007; ARGOLO *et al*., 2007; GADELHA, 2003).

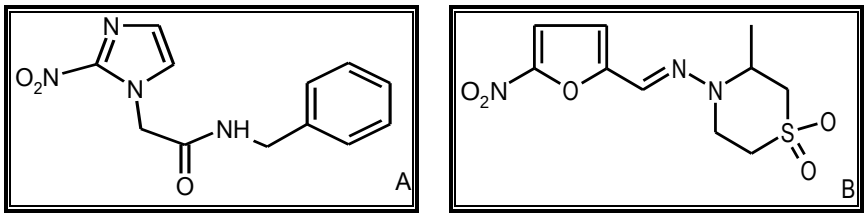


Figura 4. Benznidazol (A) e nifurtimox (B).

Um segundo fármaco, o nifurtimox, derivado 5-nitrofurânico, produzido pela *Bayer Health Care* e comercializado como Lampit®*,* também apresenta atividade contra tripanossomatídeos, porém, foi retirado da terapêutica brasileira em razão dos efeitos tóxicos mais graves que os do benznidazol, associado à baixa eficácia nas cepas brasileiras (JANNIN, VILLA, 2007; CARNEIRO DE FRANÇA, 2004).

Nifurtimox e benznidazol, lançados em 1967 e 1972, respectivamente, são os únicos antichagásicos de uso terapêutico, porém são ativos apenas na fase aguda da doença, apresentando baixa eficácia na fase crônica (JANNIN, VILLA, 2007).

Esses compostos apresentam mecanismo de ação que envolve, inicialmente, uma ou mais reações de redução do grupo nitro, seguidas de inibição de várias enzimas que são necessárias às exigências energéticas da célula do parasita. A redução do grupo nitro leva à produção de radicais livres bastante danosos para as células, podendo interagir com vários componentes celulares e propagar seus efeitos deletérios. Este efeito é particularmente importante para o caso do *T. cruzi* devido à sua deficiência de catalase e glutationa peroxidase,

o que torna o parasita extremamente vulnerável aos radicais livres formados (ROJAS, 2007; COURA, CASTRO, 2002; GRINGAUZ, 1997; DOCAMPO, 1990; DOCAMPO, MORENO, 1985).

Os avanços no conhecimento da bioquímica e biologia celular do *T. cruzi* fundamentaram a pesquisa de novas alternativas para o tratamento desta parasitose. Vários alvos têm sido foco de estudos e têm apresentado resultados promissores, dentre eles podemos destacar (URBINA, DOCAMPO, 2003):

- Inibidores da biossíntese de esterol (MAYA *et al*., 2007; URBINA, DOCAMPO, 2003):

O *T. cruzi* necessita de esteróides específicos durante seu ciclo evolutivo, tanto para sua viabilidade quanto para sua proliferação, sendo extremamente suscetível aos inibidores da síntese destas substâncias. Estes inibidores podem atuar, *in vitro*, em diferentes etapas na biossíntese de esteróis. O mecanismo de ação tripanomicida mais aceito para esta classe de fármacos é o de inibição da enzima 14-α-esterol desmetilase do complexo citocromo P-450. Desta maneira, o composto final da via biossintética, o ergosterol, não é produzido, acarretando a alterações de permeabilidade de membrana. Para o caso dos tripanossomatídeos, sua inibição leva ao acúmulo de 14-α-metilesterol, um metabólito tóxico para sistemas de enzimas, ligadas a membranas do parasito, que incluem o sistema de transporte de elétrons. Alguns antifúngicos triazólicos disponíveis comercialmente como, por exemplo, o cetoconazol e o itraconazol (Figura 5), mostraram-se parcialmente efetivos em estudos *in vivo*, visto que com sua administração houve diminuição da parasitemia mesmo com manutenção de sorologia positiva para *T. cruzi*. A utilização de outros triazóis bem como diferentes estratégias que possam afetar a biossíntese de ergosterol como, por exemplo, a inibição da enzima lanosterol e esqualeno sintase permanecem sob investigação.

- Inibidores da cisteíno-protease:

O parasita *T. cruzi* apresenta uma enzima proteolítica, a cruzipaína, a qual é responsável pela decomposição de proteínas em todos os estágios do ciclo de vida do parasito e que desempenha papel fundamental nas funções essenciais de crescimento e sobrevivência. Inibidores seletivos desta protease são capazes de bloquear, *in vitro*, a proliferação extracelular de formas epimastigotas e amastigotas intracelulares. A exemplo de inibidores irreversíveis de cruzipaína, os quais se revelaram potenciais agentes antichagásicos, podemos citar as diazometilcetonas, as fluormetilcetonas, as alilsulfonas, as vinilsulfonas e as vinilsulfonamidas (FIOCRUZ, 2010; CAZZULO, STOKA, TURK, 2001).

- Inibidores do metabolismo do pirofosfato:

Parasitas da família *Tripanosomatidae* apresentam organelas especializadas do tipo acidocalcinomas. Estas organelas são responsáveis pelo armazenamento de pirofosfato, polifosfatos, cátions e pela adaptação do parasito a situações de estresse.

Compostos que possam se acumular seletivamente no parasito e inibir enzimas envolvidas na reação do pirofosfato como, por exemplo, a esqualeno sintase e a sintase farnesil pirofosfato apresentam acentuada atividade contra *T. cruzi in vitro* e *in vivo* e, portanto, são considerados candidatos promissores na terapia antichagásica. Podemos citar alguns fármacos bifosfonados que são aplicados na clínica para a terapia de desordens ósseas como o alendronato de sódio (Figura 5) (FIOCRUZ, 2010).

- Inibidores da biossíntese de purinas:

Parasitas tripanossomatídeos são incapazes de realizar a biossíntese de purinas, bases nitrogenadas essenciais para sua sobrevivência. Desta forma, sua captação do meio externo, por uma enzima denominada hipoxantina-guanina fosforribosil transferase, faz-se necessária. Isto indica que compostos capazes de inibir seletivamente a ação desta enzima sejam potencialmente ativos contra *T. cruzi* (URBINA, DOCAMPO, 2003).

O fármaco alopurinol (Figura 5), utilizado no tratamento de gota, atua como análogo de purinas e pode ser incorporado ao DNA do parasita pela enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferase, interrompendo a síntese de RNA e proteínas. Este composto tem se mostrado ativo em modelos murinos apresentando a Doença de Chagas na fase aguda, porém grandes variações no efeito biológico de acordo com diferentes espécies foram relatadas e sua eficácia terapêutica em humanos ainda vem sendo discutida (URBINA, DOCAMPO, 2003).

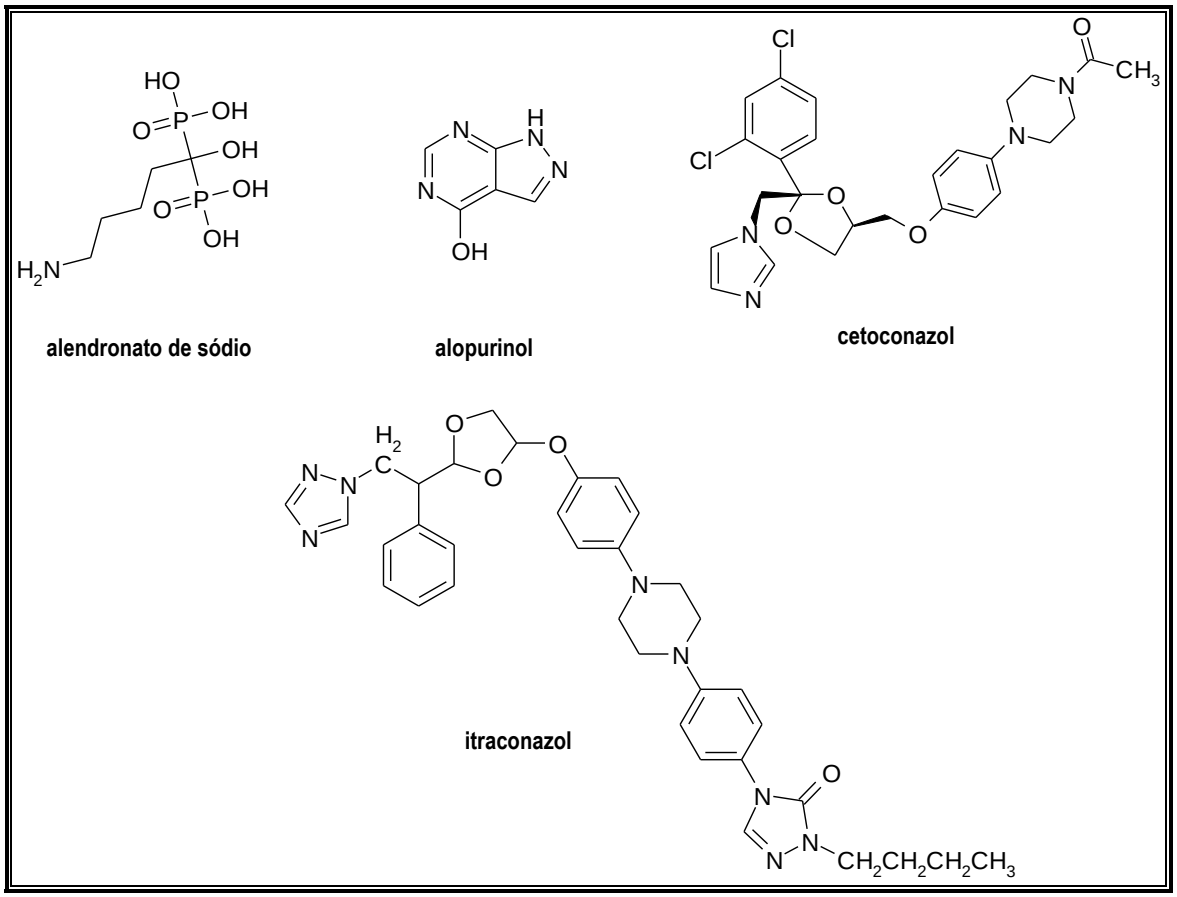


Figura 5. Estruturas químicas de alguns dos fármacos em estudos para a terapêutica da Doença de Chagas.

- Nitroderivados

Mediante a ação terapeuticamente comprovada dos nitroderivados benznidazol e nifurtimox, análogos estruturais e/ou funcionais destes compostos, com características toxicológicas minimizadas, ainda merecem ser estudados, principalmente quando se considera a capacidade destes compostos de provocar intensa destruição parasitária. Estes derivados, testados experimentalmente na década de 1950 e, posteriormente, testados *in vivo* por Ferreira e colaboradores (FERREIRA,1961, 1962; FERREIRA *et al.*, 1963), demonstraram bons resultados clínicos.

Sua atividade biológica é principalmente atribuída à redução do grupo nitro, sendo este indispensável à ação antiparasitária, principalmente quando ligado a anéis furânicos, tiofênicos e imidazólicos (RACE *et al*., 2005).

O mecanismo de redução do grupo nitro ($R\text{-}NO_2$) (Figura 6) inicia-se com a reação catalisada pela enzima NADPH redutase citocromo P-450. Esta enzima produz um ânion nitro radical ($R\text{-}NO_2^{\,-}$) que, por sua vez, entra em processo de redução com oxigênio presente no meio o qual é, então, parcialmente reduzido a ânion superóxido (O_2^-). Este último sofre a ação da enzima superóxido-dismutase originando espécies reativas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os radicais formados anteriormente poderão, na presença de Fe^{3+}, formar radical hidroxila livre ($OH^{\,-}$). Estes intermediários reagem indiscriminadamente com lipídeos, proteínas, DNA e RNA levando a danos irreversíveis nas biomacromoléculas do parasita (MAYA *et al.*, 2007, RACE *et al.*, 2005; POZAS *et al.*, 2005).

Já na ausência de oxigênio, o ânion nitro radical ($R\text{-}NO_2^-$), formado na primeira etapa do processo de redução, é transformado em derivado nitroso (Ar-NO) que, por sua vez, pode se ligar covalentemente a grupos tióis essenciais de enzimas e outras proteínas. Este radical pode sofrer outras reações de redução gerando intermediários como hidroxilamina (Ar-NHOH) a qual é, posteriormente, reduzida ao derivado amínico ($Ar\text{-}NH_2$).

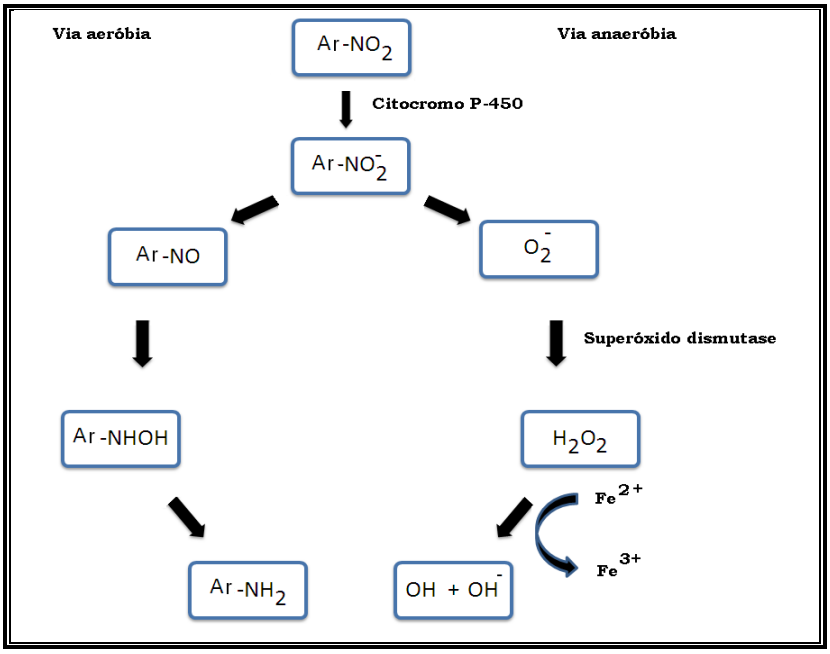


Figura 6. Mecanismo de redução anaeróbia e aeróbia de nitroderivados e os intermediários formados nas reações subsequentes (Adaptado de Viodé *et al.*, 1999).

Aventa-se, contudo, a possibilidade de atuarem, também, como inibidores enzimáticos irreversíveis de enzimas presentes no parasita, com destaque para as cisteíno-proteases (BOCEDI *et al*., 2004).

1.3.2. Fármacos aplicados na terapêutica das Leishmanioses

Para o tratamento das leishmanioses, a seleção do fármaco mais adequado pode variar conforme o tipo de enfermidade, resistência do parasita e condições de saúde do paciente. Infelizmente, sua terapêutica também depende de fármacos de reconhecida toxicidade, caros e nem sempre de eficácia satisfatória (SILVA, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Antimoniais pentavalentes (Figura 7) são fármacos utilizados na terapêutica das leishmanioses há mais de 20 anos e são recomendados como tratamento de primeira escolha (GHAFFARIFAR *et al.*, 2006). Estes são derivados do ácido estilbônico, sendo que cerca de 15% do antimônio encontra-se no estado de oxidação trivalente (BRUNTON, LAZO, PARKER, 2006; FRANCO, 1995). Os mais empregados são: antimoniato de meglumina (Glucantime® – Laboratórios Rhodia) e estibogluconato sódico (Pentostan® – Laboratórios Borroughs-Wellcome).

O mecanismo de ação destes compostos permanece não esclarecido, mas, aparentemente, envolve a inibição da síntese de ATP (RATH *et al.*, 2003; BERMAN, 1989) possivelmente por interação covalente com grupos sulfidrila de enzimas essenciais ao parasita.

Se o tratamento com antimoniais pentavalentes falha, diamidinas aromáticas como, por exemplo, o isotionato de pentamidina (Lomidina®, Figura 7) e a diamidina-estilbeno (Stilbamidina®), bem como antibióticos como a anfotericina B podem ser empregados como fármacos de segunda escolha (WHO, 2010; SILVA, 2006; BERMAN, 1989).

As diamidinas aromáticas, usadas para o tratamento das leishmanioses desde 1939, não são comercializadas no Brasil e encontram-se disponíveis, somente no Serviço de

Medicamentos para Doenças Parasitárias do Serviço de Saúde Pública, nos Estados Unidos (RATH *et al.*, 2003). São fármacos muito potentes e que só devem ser utilizados caso haja resistência aos antimoniais pentavalentes (SILVA, 2006). Estes fármacos interferem na síntese de poliaminas, que atuam regulando o crescimento e diferenciação celular, impedindo, assim, a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do parasita (BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004). Além disso, estes fármacos são capazes de se complexar com o DNA levando à inibição seletiva de enzimas e/ou à inibição direta da transcrição gênica. A alta toxicidade desta classe de fármacos é um fator limitante em seu emprego terapêutico. Dentre os principais efeitos adversos estão hipoglicemia, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (RATH *et al*., 2003).

A anfotericina B (Figura 7), antibiótico poliênico e antifúngico derivado de cepas de *Streptomyces nodosus* representa boa opção na terapêutica desta parasitose.

O mecanismo de ação da anfotericina B baseia-se na sua ligação ao ergosterol, com consequente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasita. Apesar de sua eficácia, muitas dificuldades são encontradas em sua utilização devido à necessidade de longos períodos de tratamento, monitoramento hospitalar e de seus efeitos tóxicos marcantes como febre, hipotensão, diminuição da função renal e dos níveis séricos de potássio. Tentativa de atenuar esses efeitos consiste na incorporação deste antibiótico em lipossomas transportadores a fim de diminuir sua absorção pelos rins, o órgão alvo de toxicidade deste fármaco. (POZAS *et al*., 2005; RACE *et al.*, 2005; BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004; RATH *et al.*, 2003).

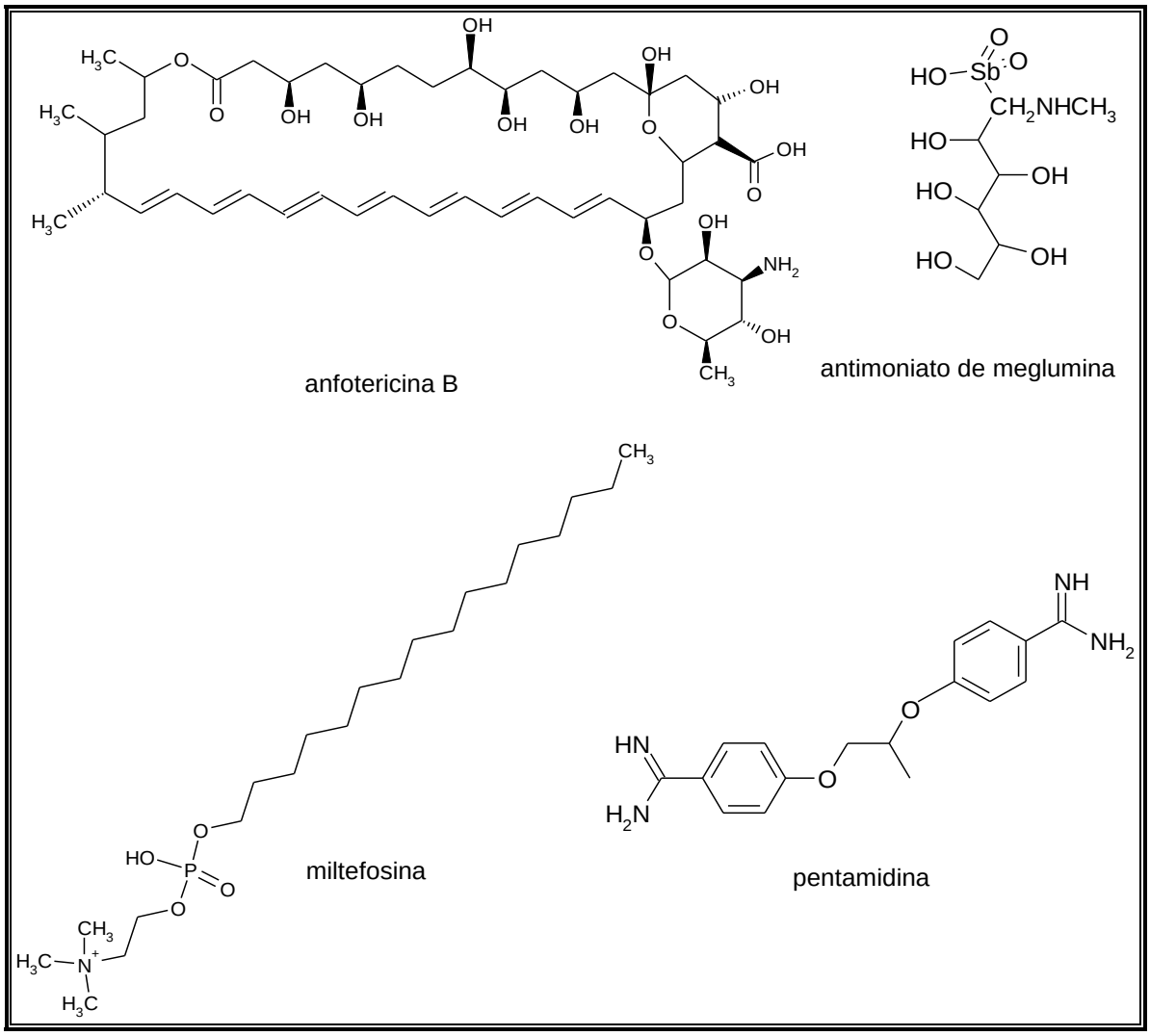


Figura 7. Estruturas químicas de alguns dos fármacos utilizados na terapêutica das leishmanioses.

Frente à carência de alternativas terapêuticas pouco tóxicas ou de perfil farmacocinético adequado para o tratamento desta parasitose, também neste caso diferentes classes de compostos químicos vêm sendo estudadas como potenciais agentes leishmanicidas.

1.3.3. Agentes promissores em estudo

- Miltefosina:

Atualmente, a miltefosina (Figura 7), desenvolvida primeiramente para ação antineoplásica, vem sendo satisfatoriamente empregada no tratamento das leishmanioses. Este

foi o primeiro fármaco de uso oral utilizado no tratamento da Leishmaniose Visceral e apresenta eficácia comprovada, inclusive em casos de resistência a antimoniais. Seu mecanismo de ação está relacionado a alterações na síntese e composição lipídica da membrana parasitária modulando, assim, sua permeabilidade e fluidez bem como o metabolismo de fosfolipídeos para posterior indução da célula a apoptose (COSTA, LUCAS, SAMPAIO, 2008). Já sua utilização na Leishmaniose Tegumentar Americana necessita de maiores estudos, visto que este fármaco parece apresentar eficácia somente contra algumas espécies de leishmanias (CROFT, YARDLEY, 2006). A miltefosina tem sua utilização aprovada na Índia, porém seu uso deve ser seguido com cautela, já que esta apresenta potencial efeito teratogênico (MAYA *et al*., 2007).

- Produtos naturais

O uso de derivados naturais para o tratamento de leishmanioses tem sido considerado campo bastante promissor. Exemplos de compostos promissores em estudo são os flavonóides luteolina e quercetina, capazes de inibir o ciclo celular de promastigotas de *L. donovani,* levando-as à apoptose (SHAHA, 2006).

Outro exemplo são as chalconas, ampla classe de compostos propenônicos, que parecem exercer ação sobre cisteíno-proteases de leishmanias, como evidenciado por Selzer *et al*., em 1997. Enzimas como as cisteíno-proteases catepsina L-*like* (cpL) e catepsina B-*like* (cpB) são encontradas em praticamente todas as espécies de leishmanias e parecem exercer papel fundamental no crescimento e virulência do parasito.

Chen *et al*. (2001) mostraram que a licochalcona A exerce excelente atividade inibitória do crescimento de formas promastigotas e amastigostas de *Leishmania major* e *L. donovani*. Seu alvo molecular mais provável, entretanto, é a enzima mitocondrial fumarato redutase,

podendo atuar, também, sobre a succinato desidrogenase, NADH desidrogenase ou as succinato e NADH citocromo C redutases.

- Nitroderivados

Nitroderivados também são alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose. Estudos realizados por Rando (2005) apresentam série de 53 nitroderivados benzidrazídicos, que foi ensaiada, *in vitro*, contra *L. donovani,* revelando análogos promissores quando comparados à pentamidina, fármaco padrão do estudo. Dois compostos que se destacaram neste estudo foram os análogos 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2-ilmetileno)benzidrazida e 3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida (***1*** e ***2***, Figura 8), bioisósteros da nifuroxazida, que apresentaram valores de IC_{50} de 0,89 e 0,62 μM, respectivamente contra os 1,06 μM exibidos pela pentamidina.

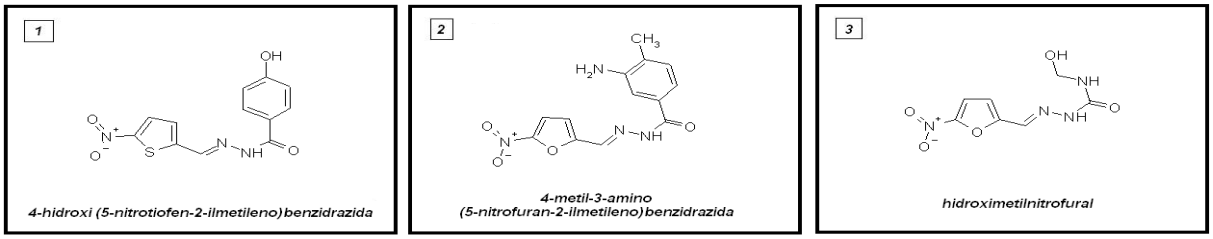


Figura 8. Nitroderivados ativos contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp*.

Tavares e colaboradores ensaiaram série análoga contendo os nitroderivados ***1*** e ***2*** contra formas epimastigotas de *T. cruzi* e verificaram que estes compostos também apresentam ação antichagásica comparável ou melhor que as exibidas pelo benznidazol (dados não publicados).

Trabalho publicado por Chung e colaboradores, em 2003, apresenta resultados promissores de atividade antichagásica do composto hidroximetilnitrofural (***3***, Figura 8) obtido como intermediário de síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural com primaquina. O composto exibiu atividade frente a formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi* em

concentrações de 5 a 10 μM, sendo tão ou mais ativos que o benznidazol utilizado como padrão do ensaio. O mesmo trabalho mostra, ainda, que o composto ***3*** exibiu atividade mutagênica quatro vezes menor que seu análogo nitrofural.

Nitroderivados, como já mencionado, contudo, possuem pouca aceitação pela comunidade médica devido à série de efeitos colaterais que podem apresentar quando administrados em elevadas concentrações. Entre as manifestações tóxicas mais comuns estão reações de hipersensibilidade, pneumonite, urticária, hepatotoxicidade, angiodema e reações como mal-estar, cefaléia e tonturas características de neurotoxicidade (WERMUTH, 2008).

1.4. Sistema ADEPT: Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy

A otimização de protótipos é uma das etapas mais desafiadoras na pesquisa por novos fármacos dada a necessidade de conhecimento e associação de diferentes abordagens científicas e tecnológicas (WESS, URMANN, SICKENBERGER, 2001).

Dentre tais metodologias, merece realce a latenciação, tipo de modificação molecular, que consiste na produção de forma de transporte inativa do fármaco, que, *in vivo*, mediante processos enzimáticos e/ou químicos libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele (TESTA, 2004; CHUNG, FERREIRA, 1999; FRISS, BUNDGAARD, 1996).

Sistema ADEPT, Antibody Directed Enzyme-Prodrug Therapy, é estratégia terapêutica que visa transportar fármacos, sob formas latentes, desde seu local de administração até seu sítio de ação específico. Esta técnica tem como objetivo solucionar problemas da quimioterapia, como diminuir toxicidade sistêmica, minimizando, assim, reações adversas provocadas pela ação inespecífica do fármaco em outros alvos (BLAU, MENEGON, CHIN, 2006).

Esta estratégia, introduzida por Bagshawe (1987), constitui-se de duas fases (Figura 9): A primeira compreende a sensibilização das células ou microrganismos alvos pela administração de um anticorpo monoclonal, específico para antígenos dos mesmos, conjugado à enzima não expressa pelo organismo humano. Através do reconhecimento antígeno-anticorpo, a célula alvo passa a apresentar, em sua superfície, a enzima ligada ao anticorpo selecionado.

Em uma segunda etapa, após os complexos não-ligados à superfície do alvo terem sido eliminados da corrente sanguínea, um pró-fármaco não-tóxico, que se apresenta ligado covalentemente ao substrato específico da enzima em questão, é administrado. A enzima acoplada ao anticorpo liberará, seletivamente, o fármaco em sua forma ativa nas proximidades do alvo.

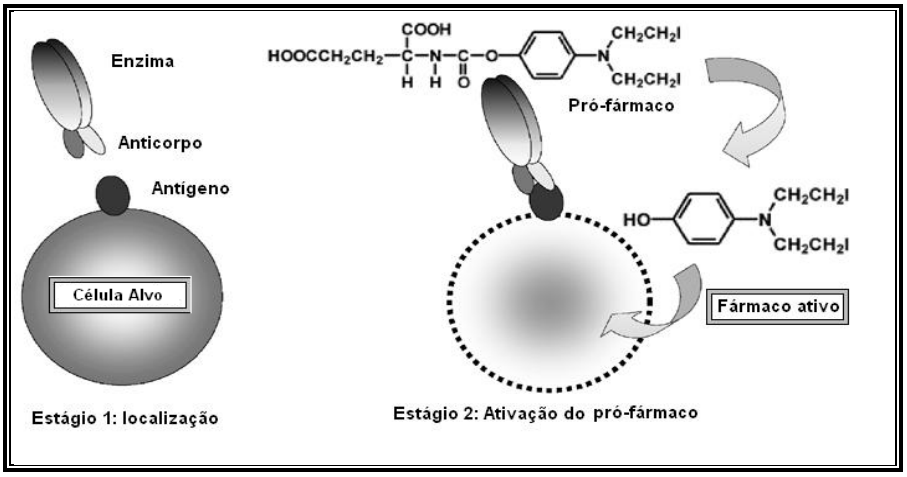


Figura 9. Estágios do tratamento pelo sistema ADEPT.
Adaptado de: http://www.nature.com/bjc/journal/v90/n12/images/6601888f1

Os sistemas ADEPT podem proporcionar vantagens quando comparados às terapias convencionais ou àquelas nas quais somente anticorpos são utilizados para o direcionamento de fármacos. Quando da utilização do ADEPT, o complexo antígeno-anticorpo pode converter um grande número de moléculas de pró-fármacos não-tóxicos a fármacos ativos potentes no sítio alvo, minimizando, assim, a toxicidade sistêmica. Ao contrário de outros transportadores, não é

necessário que o complexo penetre nas células alvo para que ocorra a ativação do pró-fármaco (NICULESCU-DUVAZ, SPRINGER, 1997).

Neste contexto, um grande número de pró-fármacos foi desenvolvido, em especial para o tratamento de tumores (FLORENT *et al*.,1998). O uso de mostardas nitrogenadas aromáticas para a aplicação deste sistema tem sido extensivamente descrito em literatura (NICULESKU-DUVAZ *et al.*, 2003; DOWELL *et al.*, 1996; SPRINGER, NICULESCU-DUVAZ, PEDLEYT, 1994). Outros pró-fármacos derivados de quimioterápicos como a duocarmicina, paclitaxel, camptotecina, pirrolbenzodiazepínicos têm sido sintetizados na tentativa de minimizar seus efeitos tóxicos na terapia contra o câncer (TIETZE *et al*., 2009; ALAOUI, 2006; MASTERSON *et al.*, 2006; LEU, ROFFLER, WANGCHERN, 1999). Ainda, Blau (2005) propôs a obtenção de pró-fármacos derivados nitrofurânicos e aminoquinolínicos ligados a transportador β-lactâmico, para utilização em sistemas ADEPT, no tratamento da Doença de Chagas.

Em relação à obtenção do conjugado enzima-anticorpo, algumas técnicas como utilização de reagentes bifuncionais ou tecnologia de DNA recombinante podem ser empregadas (BLAU, MENEGON, CHIN, 2006; BAGSHAWE *et al*., 1994).

A obtenção por tecnologia de DNA recombinante pode auxiliar na minimização da imunogenicidade do complexo, pois com a utilização desta técnica, podem ser feitas combinações de regiões variáveis de anticorpos não humanos, responsáveis pelo reconhecimento do antígeno alvo, com regiões constantes de anticorpos humanos (BLAU, MENEGON, CHIN, 2006).

A escolha da enzima a ser empregada no sistema ADEPT deve ser realizada considerando-se fatores como apresentação de menor risco de imunogenicidade possível para que não ocorram reações de hipersensibilidade, conferir alta seletividade para determinados substratos, ter toxicidade mínima, alta atividade catalítica, não estar presente no plasma e em tecidos humanos para que não ocorra ativação em partes não desejadas ou, se estiver, deve ser

expressa somente em baixas concentrações nos demais tecidos (BLAU, MENEGON, CHIN, 2006; BAGSHAWE *et al*., 1994). A seguir seguem exemplos de enzimas utilizadas em sistemas ADEPT (BLAU, 2005; NICULESCU-DUVAZ, SPRINGER, 1997):

- **Fosfatase alcalina:** Esta enzima, que hidrolisa grupos fosfatos de substratos alifáticos e aromáticos, é extraída do intestino de bezerros. Uma das desvantagens em sua utilização é que também se encontra presente em tecidos humanos e em fluidos corpóreos. Derivados de mostardas nitrogenadas (Figura 10) são exemplos de pró-fármacos desenvolvidos para serem clivados por estas enzimas.

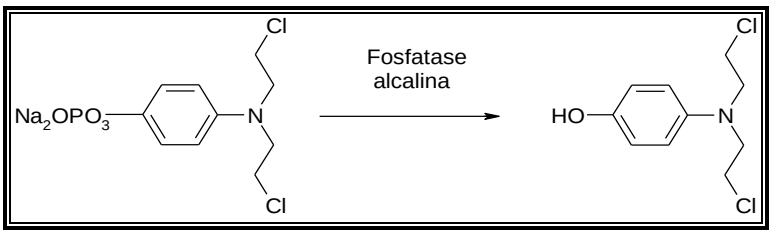


Figura 10. Reação de clivagem de mostarda nitrogenada fosfatada pela enzima fosfatase alcalina.

- ***β–glicuronidase:*** Cliva ligações glicosídicas em análogos do ácido glicurônico. É proveniente de bactérias *Escherichia coli*, mas também pode ser encontrada intracelularmente em lisossomas humanos. Na Figura 11 segue exemplo de quimioterápico planejado para ser clivado por β-glicuronidases:

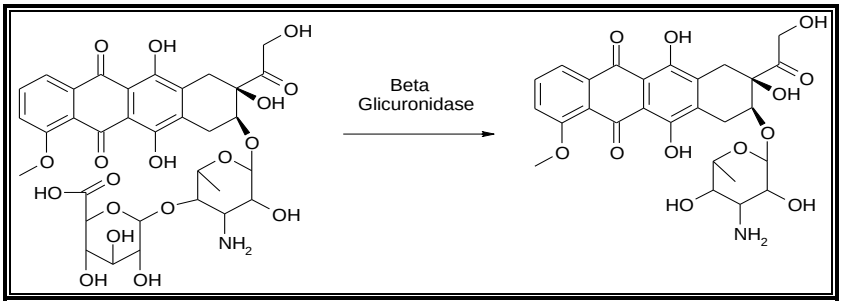


Figura 11. Conversão do pró-fármaco epirrubicina-glicuronizada pela enzima β-glicuronidase.

- ***β-lactamase:*** Enzima com alta especificidade para clivagem de substituintes ligados à posição 3' de moléculas de cefalosporina. Catalisa a hidrólise do anel lactâmico desta estrutura, acarretando a liberação do fármaco ativo. Enzima não encontrada em mamíferos e que não apresenta homologia com enzimas humanas. São provenientes de bactérias *Enterobacter cloacae*, cepa 256 e que se encontram disponíveis comercialmente em sua forma purificada.

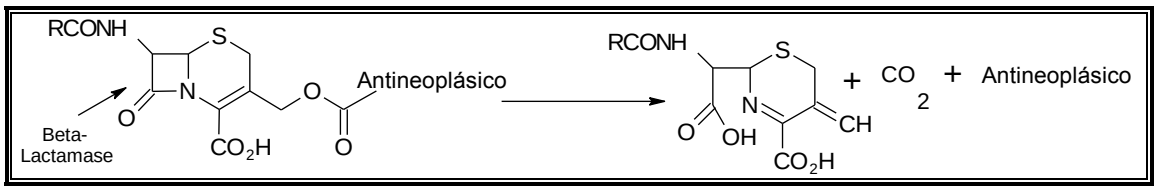


Figura 12. Catálise de pró-fármaco pela enzima beta-lactamase.

- ***Citosina-desaminase:*** Catalisa a desaminação da citosina em uracila. Tem sido empregada na conversão de alguns fármacos como 5-flucitosina, agente antifúngico, em 5-fluoruracila, agente antitumoral.

Figura 13. Conversão da 5-flucitosina em 5-fluoruracila pela citosina desaminase.

- ***Carboxipeptidase A***: Realiza a clivagem de α-glutamil-peptídeos e é extraída de pâncreas bovino. O metotrexato dipeptídico (metotrexato-α–*L*-alanina, Figura 14) é um pró-fármaco que pode ser clivado por esta enzima, liberando o fármaco ativo. Entre uma série de dipeptídeos estudados, o metotrexato-α–*L*-alanina mostrou ser um bom substrato para esta enzima.

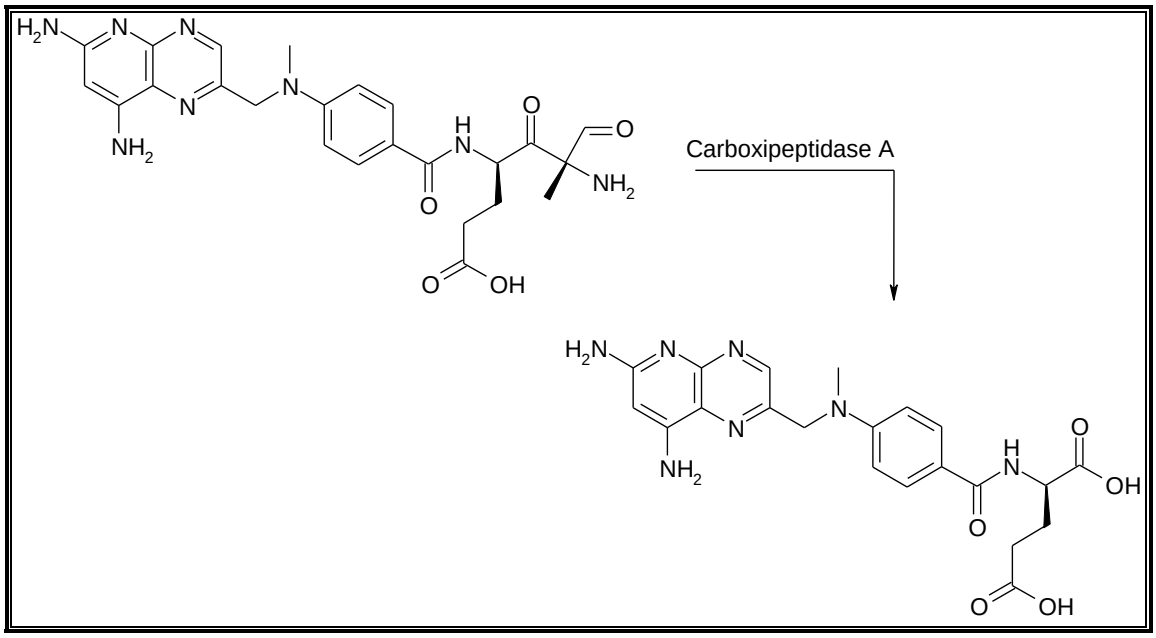


Figura 14. Liberação do metotrexato após a clivagem do substrato pela carboxipeptidase A.

- ***Nitrorredutase:*** Enzima bacteriana proveniente de *Escherichia coli*, reduz grupos nitros em alguns sistemas aromáticos. O pró-fármaco CB 1954 (Figura 15), exemplo de substrato para nitrorredutases, pode ser utilizado no tratamento de carcinossarcomas.

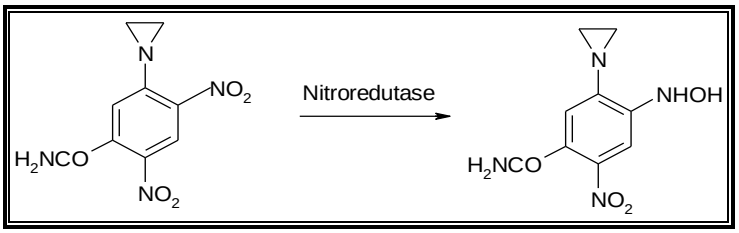


Figura 15. Redução do grupo nitro, do pró-fármaco CB 1954, pela enzima nitrorredutase.

1.4.1. Carboxipeptidase G_2 (CPG_2)

As carboxipeptidases pertencem à classe de enzimas que catalisam seletivamente a clivagem de aminoácidos da porção C-terminal de polipeptídeos e proteínas (HOLZ, BZYMEK, SWIERCZEK, 2003).

A enzima carboxipeptidase G_2 (CPG_2) é uma exopeptidase homodimérica com massa molecular de, aproximadamente, 42 kD por subunidade. É uma metaloenzima zinco dependente, produzida por *Pseudomonas sp* RS-16 (EC 3.4.17.11), não encontrada em mamíferos (MINTON, ATKINSON, SHERWOOD, 1983; ROWSELL *et al.*, 1997; HEDLEY, OGILVIE, SPRINGER, 2007).

Esta enzima catalisa a clivagem da porção C-terminal de folato reduzido, não-reduzido e de seus análogos em ácido pteróico e ácido L-glutâmico, conferindo alta seletividade para substratos apropriados, que contenham similaridade com sua estrutura (BLAU, MENEGON, CHIN, 2006; ROWSELL *et al.*, 1997; BAGSHAWE *et al.*, 1994).

A estrutura cristalografada deste dímero foi determinada em resolução de 2.5 Å por Rowsell e colaboradores (1997); cada um de seus monômeros contém um sitio co-catalítico e um domínio de dimerização que consistem de quatro folhas β-pregueadas antiparalelas envolvidas por duas α-hélices (HOLZ, BZYMEK, SWIERCZEK, 2003). Os dois sítios ativos encontram-se separados por uma distância de 62 Å e parecem atuar de forma independente (ROWSELL *et al.*, 1997). A conformação ativa da CPG_2 requer a homodimerização e a presença de dois átomos de zinco por subunidade (HEDLEY, OGILVIE, SPRINGER, 2007).

No sítio ativo desta enzima, os dois íons de zinco (Zn^{2+}) encontram-se separados por uma distância de 3.3 Å. Ambos são tetraedricamente coordenados por grupos funcionais de alguns aminoácidos. O zinco 1 é coordenado pelos oxigênios carboxílicos da asparagina (ASP) 141, glutamato (Glu)176 e pelo nitrogênio imidazólico da histidina (His)385. Já o zinco **2** é

coordenado pelos carboxilatos da Asp141, Glu200 e um nitrogênio imidazólico da His112. Portanto, cada átomo de zinco é coordenado por uma histidina, um glutamato e um aspartato, sendo que a Asp141 e uma molécula de água formam ponte de ligação entre os dois metais, coordenando-os (HOLZ, BZYMEK, SWIERCZEK, 2003; ROWSELL *et al.*, 1997) (Figura 16).

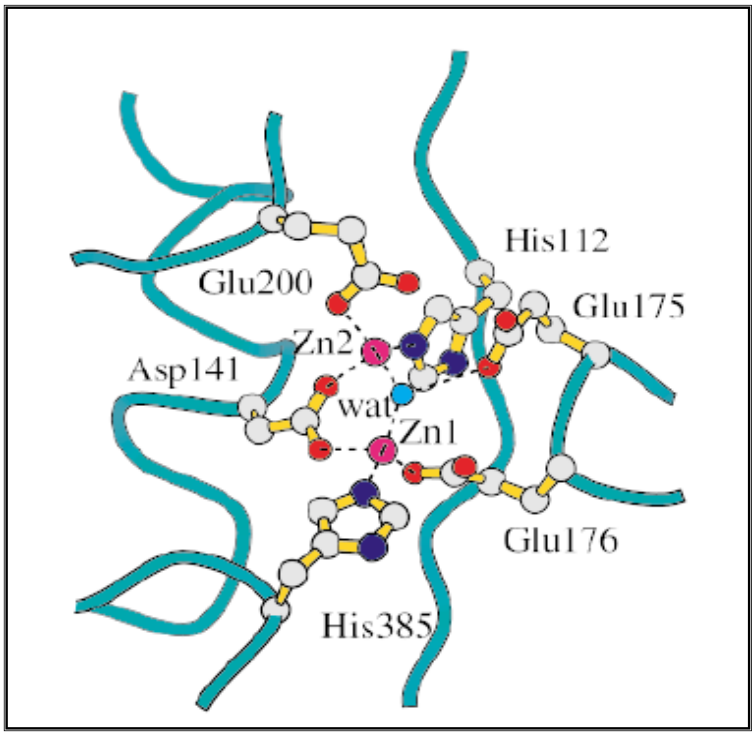


Figura 16. Sitio ativo da CPG_2: mostra os dois íons de zinco, a molécula de água e alguns dos aminoácidos mais próximos. Os átomos de oxigênios são representados pela cor vermelha, os nitrogênios por azul escuro, os íons zinco pela cor rosa e a molécula de água por azul claro (ROWSELL, 1997). [1]

Acredita–se que seu mecanismo de ação catalítico esteja relacionado à molécula de água, presente entre os dois átomos de zinco, e que esta atue como nucleófilo primário do sítio ativo. Todas as peptidases atuam pelo mecanismo geral no qual o carbono eletrofílico de uma carbonila, presente no substrato, é atacado por uma molécula nucleofílica de água coordenada por um dos átomos de zinco (WOUTERS, HUSAIN, 2001).

Próximo ao sítio catalítico desta enzima localiza-se um resíduo de ácido glutâmico (GLU 175) que forma uma ligação de hidrogênio com a molécula de água presente entre os metais.

[1] Observar que as numerações dos átomos de zinco não remetem aos seus estados de oxidação. Os termos "Zn1 e Zn2" correspondem, única e exclusivamente, à legenda para diferenciá-los ao longo das discussões.

Provavelmente, este aminoácido seja o responsável pela ativação da molécula de água como agente nucleofílico por interagir com um dos hidrogênios desta molécula (HOLZ, BZYMEK, SWIERCZEK, 2003). O resíduo arginina (Arg) 324, próximo a este sítio, também parece estar envolvido na interação entre o complexo enzima-substrato, haja vista que quando da sua substituição por uma alanina (ALA), a enzima apresenta atividade catalítica diminuída em relação ao metotrexato (MTX) (ROWSELL, 1997).

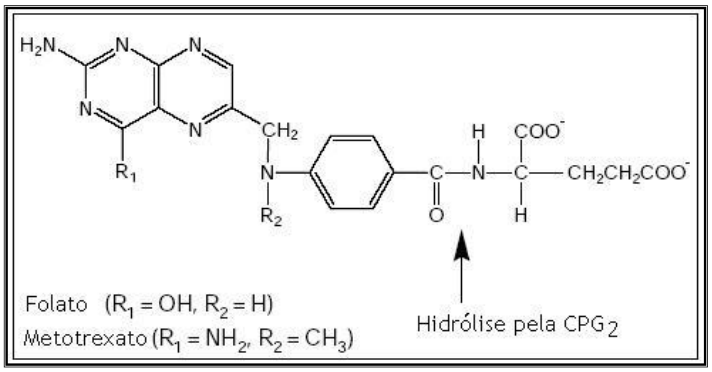


Figura 17. Reação de hidrólise catalisada pela CPG_2.

A CPG_2, produzida pela indústria Protherics e comercializada como Voraxaze®, pode ser utilizada na terapia de pacientes intoxicados por MTX, pois quando administrada diretamente no plasma depleta os níveis de metrotrexato circulante devido à remoção de sua porção glutâmica, inativando-o e impedindo os efeitos tóxicos deste fármaco (DEMIRDJIAN, LAGHOUATI, VASSAL, 2008). Esta também tem mostrado eficiência em inibir o desenvolvimento de alguns tipos de tumores, *in vivo*, como o carcinoma *Walker 256* (MINTON, ATKINSON, SHERWOOD, 1983).

Esta metaloprotease tem sido empregada em sistemas Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy (GDEPT) e ADEPT na terapia contra câncer. Nesta última estratégia, a enzima é acoplada a anticorpo contra antígeno específico do tumor para subsequente ativação de pró-fármaco, sendo geralmente aplicadas na conversão de mostardas nitrogenadas latenciadas (BLAU, MENEGON, CHIN, 2006; XU, MCLEOD, 2001; ROWSELL *et al.*, 1997).

A ligação do anticorpo conjugado à enzima pode ser realizada de duas maneiras: quimicamente ou por tecnologia de DNA recombinante. Em relação à conjugação química, alguns reagentes bifuncionais podem ser utilizados para a ligação do complexo (MICHAEL *et al.*, 1996; BAGSHAWE *et al.*, 1994).

Já na tecnologia de DNA recombinante, técnica que vem sendo bastante utilizada, é possível incorporar informações genéticas para a produção da enzima e do anticorpo em plasmídeos de bactérias para que estas produzam o complexo (PIERCE, 2004; MICHAEL *et al.*, 1996).

Em trabalho desenvolvido por Minton e colaboradores (1983) a sequência nucleotídica que codifica a CPG_2 pôde ser identificada e clonada em bactérias *Escherichia coli*, permitindo, assim, a síntese desta enzima pela tecnologia citada anteriormente.

A CPG_2 possui várias características que a tornam interessante para uso em sistemas ADEPT: nenhum co-fator é requerido para a sua ativação e não há análogo humano em relação a seu substrato. O mecanismo de ativação dos pró-fármacos pode ser realizado em uma única etapa ativando, assim, um grande número de fármacos que se tornam citotóxicos ao alvo de interesse (FRIEDLOS *et al.*, 2008).

Springer e colaboradores (1990) desenvolveram três pró-fármacos a partir de mostardas nitrogenadas para serem utilizados em sistema ADEPT, tendo como substrato o ácido glutâmico para posterior ativação pela CPG_2 (Figura 18).

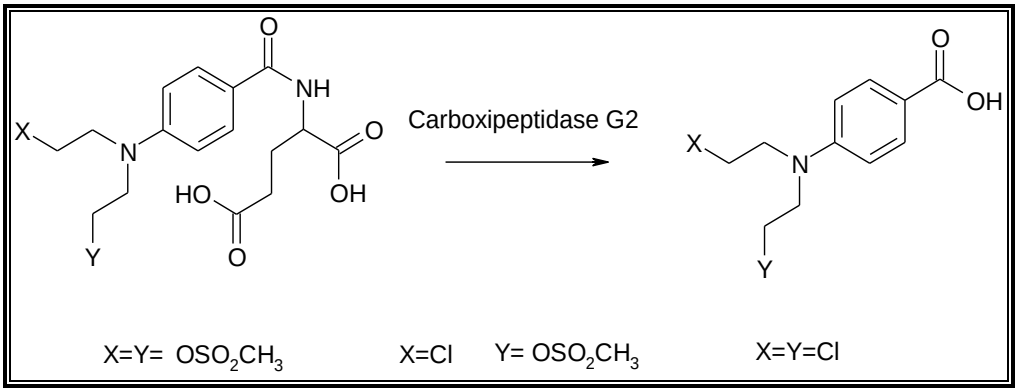


Figura 18. Pró-fármacos desenvolvidos por Springer e colaboradores.

Ensaios de toxicidade celular *in vitro* foram realizados para avaliar o potencial de conversão dos pró-fármacos e a viabilidade de duas linhagens de células tumorais na presença destes e do complexo enzima-anticorpo. Todos se mostraram ativos mediante a conversão enzimática e apresentaram potencial efeito citotóxico.

Ensaios posteriores foram realizados, *in vivo*, por Bagshawe e colaboradores (1996) utilizando-se mostardas nitrogenadas e um complexo enzima–anticorpo A5B7-CPG_2 para o tratamento de câncer de cólon. Os resultados demonstraram que apesar de algumas limitações relacionadas aos efeitos adversos dos fármacos, este sistema poderia ser efetivo no tratamento do câncer de cólon e em outros carcinomas (BEGENT, 1996).

1.5. Modelagem molecular

A modelagem molecular consiste na investigação de estruturas químicas tridimensionais e de suas propriedades moleculares, em situações específicas, empregando-se como ferramenta a química teórica e computação gráfica (CARVALHO *et al.*, 2003; SILVA, 2003).

Na década de 1980, o desenvolvimento de recursos computacionais e avanços em química teórica viabilizaram o crescimento desta técnica. Atualmente, a modelagem molecular é ferramenta amplamente utilizada no planejamento racional de fármacos, pois auxilia na compreensão das interações com alvos biológicos, sejam estes canais iônicos, proteínas transportadoras, enzimas, dentre outros, muitas vezes elucidando mecanismos de ação dos compostos ao nível molecular (SILVA, 2003).

Duas abordagens podem ser aplicadas para a compreensão das interações tridimensionais entre ligante-alvo biológico: a de ancoramento ao receptor (*docking*) e a dinâmica molecular. (MORGON, COUTINHO, 2007).

Estudos de ancoramento consistem basicamente em prever o modo de interação de moléculas no sítio ativo de um determinado alvo e também em quantificar a afinidade do complexo. É possível calcular energias de interação bem como comparar os resultados teóricos de afinidade de ligação obtidos com dados experimentais (WERMUTH, 2008). Estas comparações geram informações relevantes para o desenvolvimento de ligantes otimizados, os quais apresentariam interações mais adequadas com o receptor promovendo, assim, maior estabilidade do complexo e maior eficácia farmacodinâmica (BULTINCK *et al*., 2004).

Sabe-se que o processo de reconhecimento molecular de uma molécula pelo seu receptor é um processo dinâmico e que envolve um grande número de interações intermoleculares entre o ligante, a molécula receptora e o solvente, sendo que o complexo pode apresentar conformações variáveis e que fatores entrópicos e entálpicos influenciam neste processo. Desta forma, cabe mencionar que uma das limitações da ferramenta implica a consideração da flexibilidade do receptor durante as análises e também a aproximação das variações entrópicas conformacionais das moléculas que participam da interação (MORGON, COUTINHO, 2007; ALONSO, BLIZNYUK, GREADY, 2006).

Dinâmica molecular (DM) é uma técnica que tem sido amplamente utilizada no planejamento racional de novos ligantes a um alvo terapêutico. Esta abordagem é uma das mais versáteis nos estudos de macromoléculas biológicas, pois permite incorporar flexibilidade aos complexos, melhorando as interações e reforçando a complementaridade entre eles (NAMBA, SILVA, SILVA, 2008). Permite, também, entender o comportamento dinâmico de proteínas em diferentes escalas de tempo, estudar o efeito de moléculas de solvente explícito tão bem quanto parâmetros termodinâmicos, entalpia e entropia. Entretanto, estudos de DM podem exigir grande tempo computacional e, por vezes, sistemas muito grandes podem atingir estados de energia mínima local e entrar em *loop* que, mesmo com a aplicação de esquemas de aquecimento e

resfriamento, não conseguem ser vencidos a fim de se obter o estado de energia mínima global do espaço conformacional em questão (ALONSO, BLIZNYUK, GREADY, 2006).

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

À vista do exposto e ante a necessidade de se obter alternativas quimioterápicas contra a doença de Chagas e a leishmaniose, doenças de importância médico-social inconteste ao País, os objetivos deste trabalho englobam:

❖ A síntese de pró-fármacos (Figura 19) para aplicação em sistemas ADEPT. Dois foram planejados a partir de 2 nitroderivados (***1*** e ***2***, Figura 8), obtidos por Rando e colaboradores (RANDO, 2005), que apresentaram pronunciada atividade leishmanicida e tripanomicida quando comparados à fármacos padrão utilizados no tratamento desta parasitose como a pentamidina e o benzinidazol. O terceiro pró-fármaco foi planejado a partir do nitroderivado hidroximetilnitrofural (***3***, Figura 8), obtido por Chung e colaboradores (2003), que também apresentou atividade tripanomicida promissora, sendo tão ou mais ativo que o benzinidazol. Estes compostos devem ser conjugados sinteticamente ao ácido glutâmico, substrato da CPG_2, para que possam ser reconhecidos e clivados por esta enzima. A aplicação do sistema ADEPT visa diminuir a toxicidade sistêmica associada a estes nitroderivados e aumentar sua eficácia terapêutica por meio de direcionamento e liberação do pró-fármaco próximo ao seu sítio de ação.

❖ Estudos de ancoramento e dinâmica molecular entre os pró-fármacos em questão e a enzima carboxipeptidase G_2 visando compreender os mecanismos moleculares possivelmente envolvidos na liberação, *in situ*, dos nitroderivados. Espera-se que estes estudos não só esclareçam os possíveis mecanismos da liberação nas redondezas do parasita, como também direcionem os trabalhos sintéticos, inclusive sugerindo a presença ou não de agentes espaçantes para a constituição do pró-fármaco.

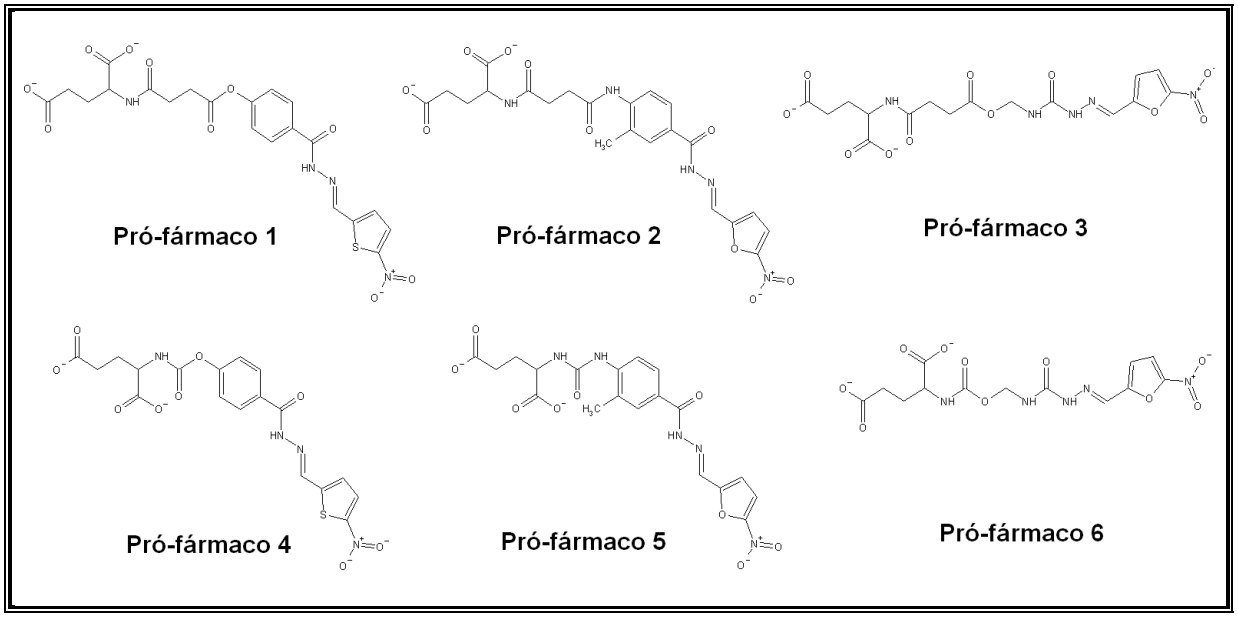


Figura 19. Estruturas dos pró-fármacos estudados por modelagem molecular.

❖ Com base nos estudos de modelagem propor mecanismo de ação da enzima carboxipeptidase G_2, utilizando-se, como padrão, o MTX (Figura 20), um substrato reconhecido por esta enzima. Este estudo visa compreender o mecanismo de catálise enzimática e estabelecer um padrão para posterior análise e comparação com os pró-fármacos propostos neste trabalho.

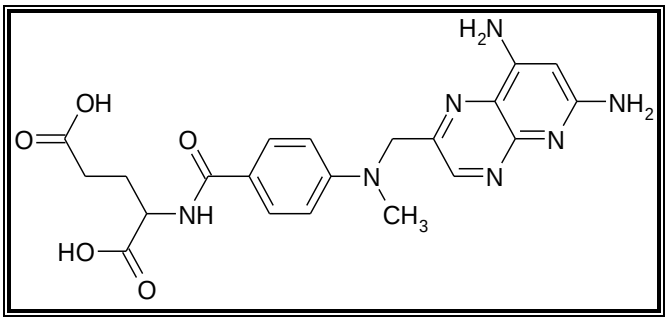


Figura 20. Estrutura química do MTX.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1. Programas computacionais

- **Gaussian 03W** (Wallingford CT, 2003): Software utilizado para cálculos *ab inito. D*isponível para download em: http://www.gaussian.com/

- **GOLD 3.1** (*Genetic Optimization for Ligand Docking*, *Cambridge Crystallographic Data Centry, 2004*): Programa necessário para a realização dos estudos de ancoramento; software disponível em: http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/ sob licença paga.

- **Hyperchem 7.51** (Hypercube, Inc, 2003): Software utilizado para desenho e visualização de estruturas químicas bem como para minimização de energia, obtenção de conformação de carga de ponto único e análise conformacional; encontra-se disponível em: http://www.hyper.com/ sob licença paga.

- ***Marvin Beans*** (ChemAxon Ltd, 2009): Este software encontra-se disponível em: http://www.chemaxon.com/marvin

- **MOLSIM 3.2** (The Chem21 Group, Inc, 1997): Software utilizado nos estudos de minimização e dinâmica molecular. Licença acadêmica gratuita.

- **PYMOL Molecular Graphics System 1.1** (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA, 2002): Software utilizado para a visualização de estruturas tridimensionais de macromoléculas como proteínas, ácidos nucléicos, açúcares bem como de pequenas estruturas. É utilizado na

produção de ilustrações para publicações em periódicos. Licença de avaliação. Disponível no site http://www.pymol.org.

3.1.2. Estruturas cristalografadas

As estruturas utilizadas para desenho e otimização tanto das pequenas moléculas quanto das macromoléculas estão depositadas na base de dados Protein Data Bank (PDB) no endereço http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do e podem ser acessadas pelos códigos a seguir:

- 1yki: resolução 1,70 Å (RACE *et al*., 2005) = Nitrofural
- 1ii5: resolução 1,60 Å (MAYER, OLSON, GOUAUX, 2001)= Ácido– L- glutâmico
- 3gc2: resolução 1,85 Å (MINASOY *et al*., 2009) = Ácido succínico
- 1cg2: resolução 2,5 Å (ROWSELL *et al*., 1997) = Carboxipeptidase G_2
- 3ia4: resolução 1,70 Å (HAY *et al*., 2009) = MTX

3.1.3. Reagentes

- Anidrido succínico (Fluka)
- Ácido L-glutâmico (Sigma-Aldrich)
- Ácido 3-amino-4-metilbenzóico (Sigma-Aldrich)
- Carbonato de potássio (Synth)
- Dicicloexilcarbodiimida (DCC, Merck)
- Dimetilaminopiridina (Sigma-Aldrich)
- Formaldeído 37% (Sigma-Aldrich)
- Furfuraldeído (Sigma-Aldrich)

- Hidrato de hidrazina 80% v/v (Sigma-Aldrich)
- *N'N'*- Carbonildiimidazol (CDI, Sigma-Aldrich)
- Nitrofural (Avocado)
- Quercetina (Betapharma) (Shanghai) Co., Ltd.
- Sódio metálico (Sigma-Aldrich)
- Pentóxido de fósforo (Merck)
- 4-hidroxibenzidrazida (Sigma-Aldrich)
- 5-nitro-2-tiofeno carboxaldeído (Sigma-Aldrich)
- 5-nitro-2-furaldeído (Sigma-Aldrich)

3.1.4. Solventes

- Clorofórmio (Synth)
- Etanol (FMAIA)
- Éter dietílico (FMAIA)
- Metanol anidro (FMAIA)
- Tetraidrofurano (FMAIA)

3.1.5. Solventes deuterados

- Clorofórmio deuterado $CDCl_3$ (Cambridge Isotope Laboratories)
- Dimetilsulfóxido deuterado (Cambridge Isotope Laboratories)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Estudos de Modelagem Molecular

Para dar início aos estudos de modelagem molecular, foram realizadas análises de um composto padrão, o MTX, e dos pró-fármacos propostos neste trabalho pelo emprego do programa computacional *Marvin Beans* (ChemAxon Ltd, 2009). Este estudo visa compreender o comportamento destes compostos nos diferentes pH aos quais poderia ser submetido, tanto nas etapas sintéticas, quanto nos estudos de modelagem molecular em nível de receptor (pH 7,4) ou considerando-se outros compartimentos orgânicos como o estômago (pH 2.0) e o intestino delgado (pH 8,0).

As estruturas foram desenhadas no módulo *Marvin Sketch* e visualizadas no módulo *Marvin View,* ambos presentes no pacote *Marvin Beans* (ChemAxon Ltda). A distribuição das microespécies passíveis de serem formadas em diferentes pH para os três pró-fármacos propostos foi, então, obtida utilizando-se a ferramenta *pka plugin*, ajustando-se as condições de análise para:

- ⇨ Limite inferior de pH: 0,0
- ⇨ Limite superior de pH: 14,0
- ⇨ Intervalo de incremento no pH: 0,2
- ⇨ Temperatura: 298 K

3.2.1.1. Construção das estruturas dos pró-fármacos

Os modelos tridimensionais da estrutura do MTX e dos pró-fármacos foram construídos, na forma protonada, no módulo *Build* do software Hyperchem 7.51 (Hypecube, 2003).

Empregaram-se como referência as coordenadas cartesianas do MTX, do nitrofural, do ácido succínico e do ácido glutâmico depositadas no banco de dados de estruturas químicas PDB (*Protein Data Bank*), sob o código de entrada 3IA4, 1YKI, 3GC2, 1II5 e resolução 1,70, 1,85, 1,60 Å, respectivamente.

3.2.1.2. Minimização de energia dos modelos dos pró-fármacos

Metodologias de mecânica clássica e mecânica quântica foram utilizadas para otimizar os modelos dos pró-fármacos gerados e para calcular suas cargas atômicas parciais. As estruturas tridimensionais dos pró-fármacos foram desenhadas e otimizadas por mecânica molecular, empregando-se o campo de força Mecânica Molecular (MM+) do software Hyperchem 7.51 (HyperChem 7.5, Hypercube, Inc.). Suas cargas atômicas parciais foram calculadas com o método semi-empírico PM3, também implementado neste programa.

3.2.1.3. Processamento da proteína para os estudos de ancoramento

A estrutura de Raio-X cristalografada da enzima *Carboxipeptidase* G_2 com resolução de 2,5 Å, obtida no banco de dados *PDB, sob o código 1CG2*, foi utilizada como modelo para a geometria do receptor (Figura 21).

Neste estudo, utilizaram-se apenas duas das quatro subunidades protéicas desta enzima, a fim de reduzir o tempo computacional nos estudos de dinâmica molecular. A redução de seu tamanho foi realizada com o auxílio do software *Hyperchem* 7.51 (HyperChem 7.5, Hypercube, Inc.) As moléculas de solvente, íons não-complexados e os pares de elétrons desemparelhados (*lone pair*) foram retirados da estrutura manualmente. Somente uma molécula de água e dois íons de zinco, que participam do mecanismo catalítico foram mantidos no sítio

ativo para a construção do modelo. Após a adição de hidrogênios aos resíduos, cargas parciais AMBER foram atribuídas a todos seus átomos (WEINER *et al*., 1984). À terminação das cadeias foram adicionados grupos metilas (*block groups*) com cargas parciais igual a zero.

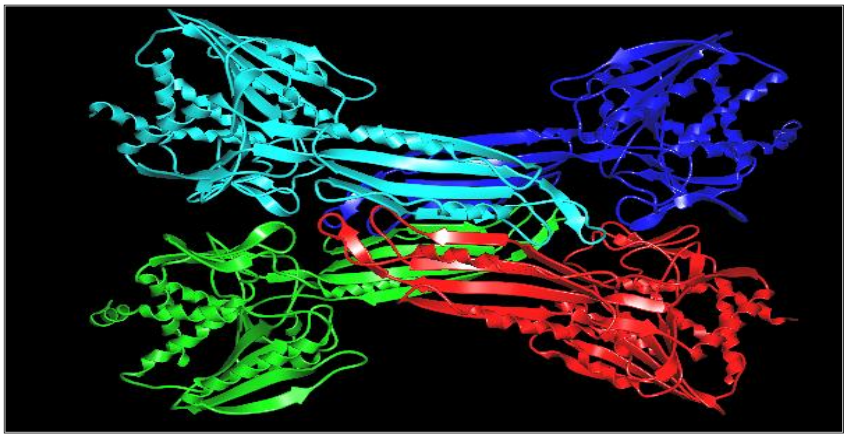


Figura 21. Representação da carboxipeptidase G_2.. As diferentes subunidades estão representadas sob a forma de fitas e em cores diferentes. Modelo produzido no software Chimera.

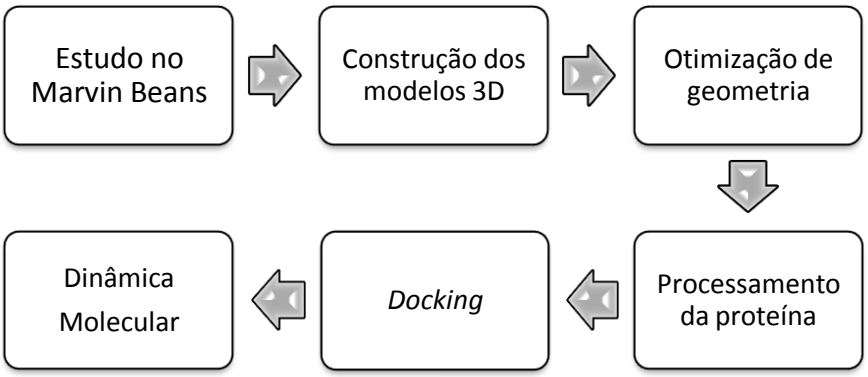
3.2.1.4. Estudos de ancoramento

Os estudos de ancoramento foram realizados empregando-se o software *GOLD* 3.1 (*Cambridge Crystallographic Data Centry,* 2004).

Para efetuar os ancoramentos, os íons de zinco (Zn^{2+}) foram parametrizados como metais de coordenação geométrica tetraédrica e um deles foi selecionado como referência na formação do complexo. A molécula de água, localizada entre os Zn^{2+}, foi considerada durante o processo de reconhecimento ligante-proteína. As demais opções foram mantidas conforme o padrão do programa.

As estruturas dos ligantes, previamente processadas no programa *Hyperchem* 7.51 (HyperChem 7.5, Hypercube, Inc.), foram selecionadas para dar início ao processo. O ancoramento foi realizado dez vezes, em condições idênticas. Cada corrida gerou dez confôrmeros, classificados em ordem crescente de energia total do complexo.

Fluxograma 1: Sequência dos procedimentos realizados nos estudos de modelagem molecular

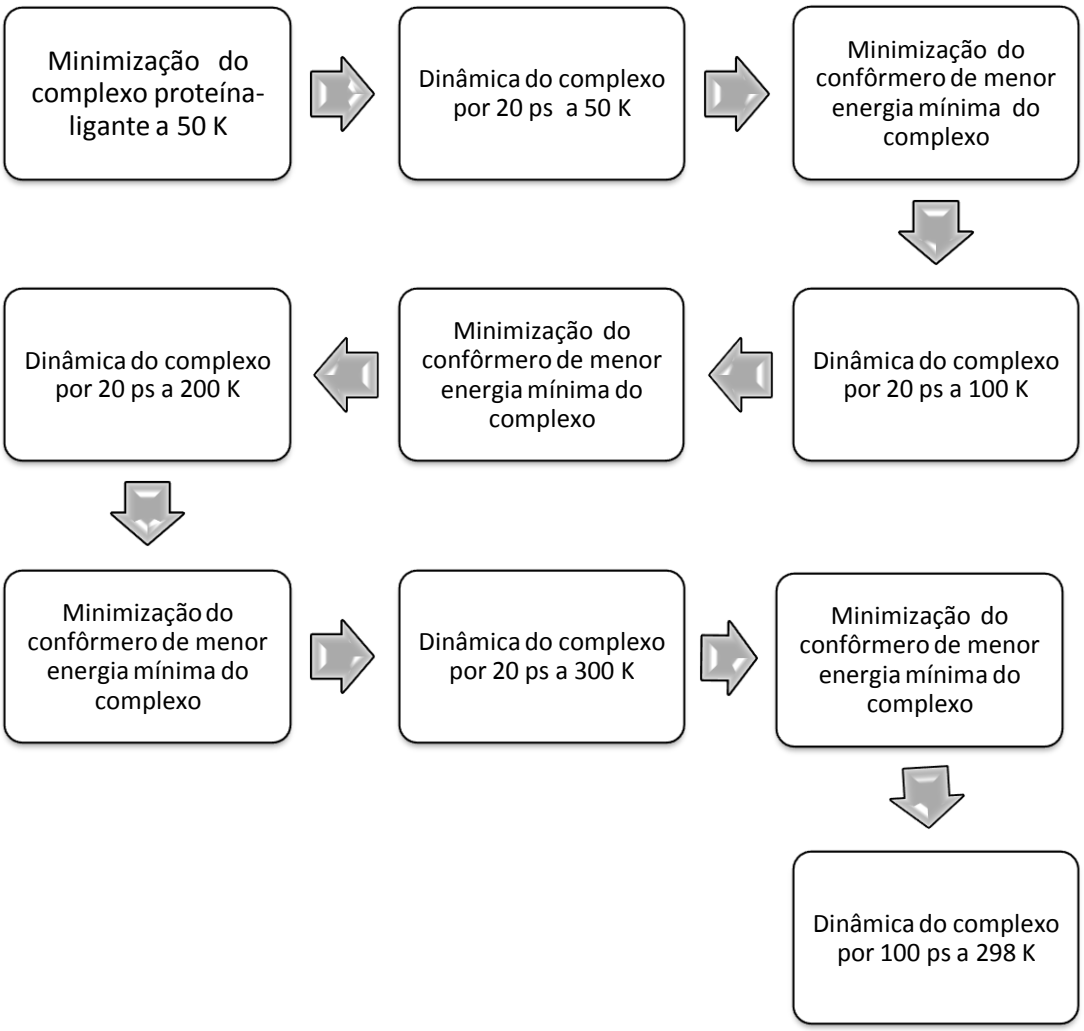


3.2.1.5. Estudos de dinâmica molecular (DM)

O programa MOLSIM, versão 3.2 (MOLSIM 3.2, The Chem21 Group, Inc., 1997), foi empregado para o processamento dos cálculos de dinâmica molecular (DM) das estruturas tridimensionais dos complexos pró-fármacos-CPG_2 e MTX-CPG_2 previamente obtidos no software *GOLD* 3.1 (*Cambridge Crystallographic Data Centry,* 2004). O protocolo empregado para estas simulações foi o esquema de aquecimento lento seguido de resfriamento (*warming up*).

A princípio, empregou-se um esquema de aquecimento com DM curtas (20 ps) a 50, 100, 200 e 300 Kelvin (K). A conformação de energia mínima do complexo à temperatura de 50 K foi selecionada e teve sua energia minimizada na temperatura da simulação subsequente. A geometria deste complexo foi, então, utilizada para a simulação de 50 ps à temperatura de 100 K. Este procedimento foi repetido até que se atingisse 300 K. O confôrmero da simulação a 300 K foi utilizado em DM de 100 ps a 298 K, temperatura do ensaio cristalográfico da proteína (Fluxograma 2). A trajetória foi registrada a cada 20 passos da simulação resultando em 5.000 conformações para a estrutura de cada um dos complexos. O valor utilizado para a constante dielétrica foi de 3,5. Os confôrmeros de mínimo global obtidos foram selecionados para análise e visualização.

Fluxograma 2: Processo de aquecimento e resfriamento dos complexos pró-fármacos-CPG_2 .



3.2.2. Síntese

*3.2.2.1. Preparação dos nitroderivados ativos **1** e **2***

Os nitroderivados 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2-ilmetileno)benzidrazida (**1**) e 3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida (**2**) podem ser obtidos em 3 etapas (RANDO, 2005):

Etapa 1: Esterificação

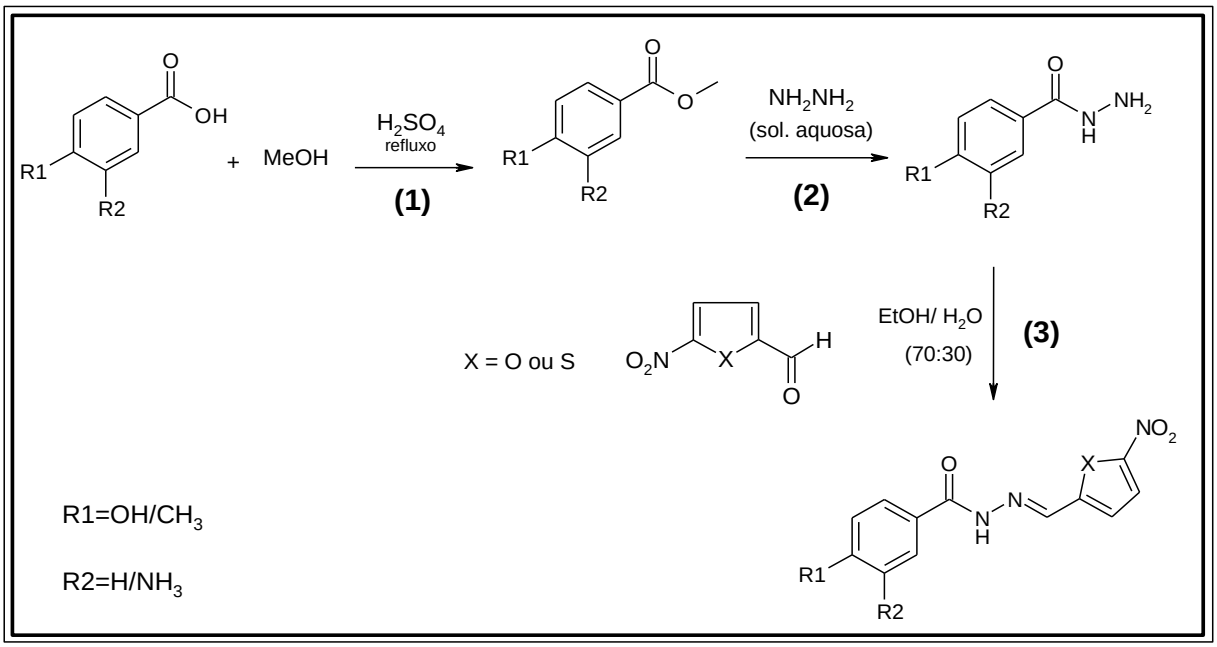
A partir dos ácidos 4-hidróxibenzóico ou 3-amino-4-metilbenzóico (30 mmol) obtém-se o éster metílico por refluxo, com excesso de metanol (60 mmol) e ácido sulfúrico (0,06 mL), em balão acoplado a condensador de refluxo, por quatro horas. Após este período, destila-se o excesso de metanol, obtendo-se um sólido, o qual é filtrado sob pressão reduzida e seco em alto vácuo.

Etapa 2*: Preparação das hidrazidas*

As hidrazidas são obtidas pela reação de hidrato de hidrazina a 80% (p/V) (11 mmol) sob aquecimento a 60 ^{o}C, em balão acoplado a condensador de refluxo e termômetro. Sob agitação magnética, adiciona-se, lentamente, o éster do ácido 4-hidroxibenzóico ou 3-amino-4-metilbenzóico (0,5 mmol), elevando-se, então, a temperatura até o refluxo e mantendo-o por aproximadamente 1 hora. Resfria-se a solução em banho de gelo para obtenção de sólido, que pode ser separado por filtração sob pressão reduzida.

Etapa 3*: Obtenção dos compostos nitro-heterociclos benzidrazídicos*

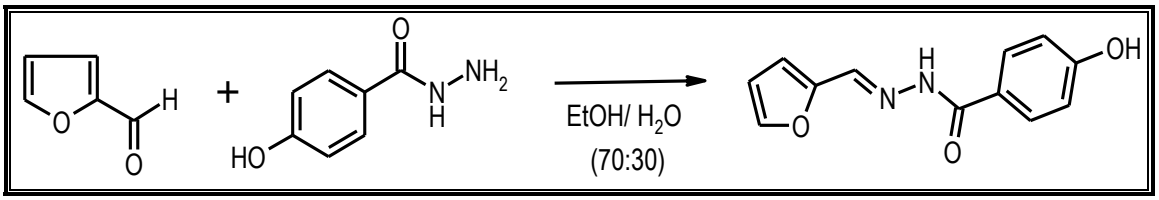
Em balão acoplado a condensador de refluxo, adiciona-se o aldeído do nitrotiofeno ou do nitrofurano (10 mmol) à mistura de água destilada e etanol, na proporção de 2:5. A mistura é aquecida a refluxo e, então, adiciona-se, sob agitação e, lentamente, a benzidrazida substituída, em proporção equimolar (10 mmol). A agitação é mantida por 30 minutos e, então, o precipitado formado é filtrado sob pressão reduzida e seco em bomba de vácuo, sendo armazenado em dessecador com sílica-gel e pentóxido de fósforo.



Esquema 1. Rota sintética de obtenção dos nitroderivados benzidrazídicos.

3.2.2.2. Preparação dos derivados benzidrazídicos não-nitrados

O composto 4-hidroxi(tiofen-2-ilmetileno)benzidrazida (derivado **7**) pode ser obtido em apenas uma etapa:



Esquema 2. Reação para a obtenção do 4-hidroxi(tiofen-2-ilmetileno)benzidrazida.

A um balão de fundo redondo acoplado a condensador de refluxo, adiciona-se furfuraldeído (10 mmol) à mistura de água destilada e etanol, na proporção de 2:5. Sob aquecimento e agitação magnética, adiciona-se, lentamente, a benzidrazida monosubstituída (10 mmol). Após 2 horas, o precipitado formado é filtrado sob pressão reduzida e seco em bomba de vácuo.

3.2.2.3 Síntese dos pró-fármacos

Os nitroderivados 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2-ilmetileno)benzidrazida (***1***) e o 3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida (***2***) obtidos anteriormente, empregando-se a metodologia aplicada por Rando e colaboradores (2002), foram utilizados na síntese dos pró-fármacos (1 e 2, Figura 19) mediante reação com anidrido succínico em proporção equimolar ou frente a ligeiro excesso deste último reagente.

Variações de condições reacionais como temperatura, proporções dos reagentes, solventes, presença e tipo de agentes acoplantes e/ou catalisadores foram realizadas segundo discutido na tabela XVI do item Resultados e Discussão.

Os produtos obtidos foram isolados mediante filtração a vácuo em funil de Büchner, secos em dessecador com pentóxido de fósforo, analisados e utilizados para o acoplamento ao ácido glutâmico para obtenção das estruturas dos pró-fármacos.

As variações metodológicas são descritas em detalhes no anexo A deste documento.

*3.2.2.4. Succinoilação do derivado **7***

O derivado ***7*** (4 mmol) é solubilizado em THF anidro e mantido sob agitação na presença de anidrido succínico em excesso (4,5 mmol) por 4 horas. A reação é acompanhada por CCD, utilizando-se como eluente metanol/clorofórmio (1:9). Mistura heterogênea líquido-sólida é obtida após o término da reação. O precipitado é separado por filtração e o filtrado rotoevaporado à temperatura ambiente e pressão reduzida. O sólido obtido é seco em bomba de alto vácuo e mantido em dessecador com pentóxido de fósforo.

3.2.3. Métodos analíticos

Os compostos sintetizados foram analisados a partir das seguintes técnicas e aparelhos:

- Cromatografia em Camada Delgada. Placas de sílica com indicador de fluorescência F254-Merck
- Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV) - FTIR Bomem
- Ponto de Fusão Modelo M-565 Büchi- Switzerland
- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono – Brucker DPX 300 MHz,

Estes equipamentos estão disponíveis no Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, SP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. MODELAGEM MOLECULAR

Nos estudos de modelagem molecular realizados neste projeto foram consideradas, inicialmente, as estruturas de pró-fármacos contendo ácido succínico como agente espaçante entre as estruturas do transportador (ácido glutâmico) e dos compostos ativos (nitroderivados). As estruturas estudadas são ilustradas na Figura 20 e identificadas como pró-fármaco **1**, **2** e **3**.

Levantamento bibliográfico realizado ao longo do desenvolvimento do trabalho, contudo, trouxe informações sobre o trabalho desenvolvido por Khan e colaboradores (1999), no qual estes descrevem possíveis relações entre a estrutura química e a atividade biológica de substratos da CPG_2. Este trabalho revela que características como a presença de uma porção carboxílica livre no resíduo de ácido glutâmico e anel benzênico próximo ao grupo carbonílico da ligação amida da estrutura do substrato seriam essenciais para a especificidade da CPG_2. Tais características podem ser observadas em substratos reconhecidos da enzima como, por exemplo, os folatos e o MTX.

Por esta razão, estruturas de nitroderivados acopladas diretamente ao ácido L-glutâmico por ligações carbamatos (pró-fármaco **4**, pró-fármaco **5** e pró-fármaco **6**) foram consideradas nos estudos teóricos de clivagem pela enzima em estudo. Os estudos da literatura indicam, ainda, que a clivagem da ligação amídica nos substratos da CPG_2 também pode variar em porções ureída (KHAN *et al.*, 1999).

Por fim, o MTX, substrato reconhecido da CPG_2, foi utilizado como padrão para efeitos de comparação dos resultados com os obtidos para os compostos propostos.

4.1.1. Aplicação do software Marvin Beans

Com o auxílio do software *Marvin Beans* realizou–se uma varredura nos valores de pH de 0 a 14. Esta análise foi aplicada com o intuito de estudar as possíveis espécies ionizadas, referentes ao MTX e aos pró-fármacos, encontradas nos diferentes pH do organismo e das condições reacionais.

Para o MTX, durante a varredura, sete espécies moleculares foram geradas (Figura 22).

A espécie apresentando dupla função carboxilato (número 6, Figura 22), foi a de maior concentração na variação de pH entre 5,4 a 13,6. Como esta espécie ionizada também se encontra em maior concentração no pH fisológico (7,4) a mesma foi selecionada para estudos posteriores de dinâmica molecular e de ancoramento com a enzima carboxipeptidase G_2.

Análise das espécies iônicas: MTX

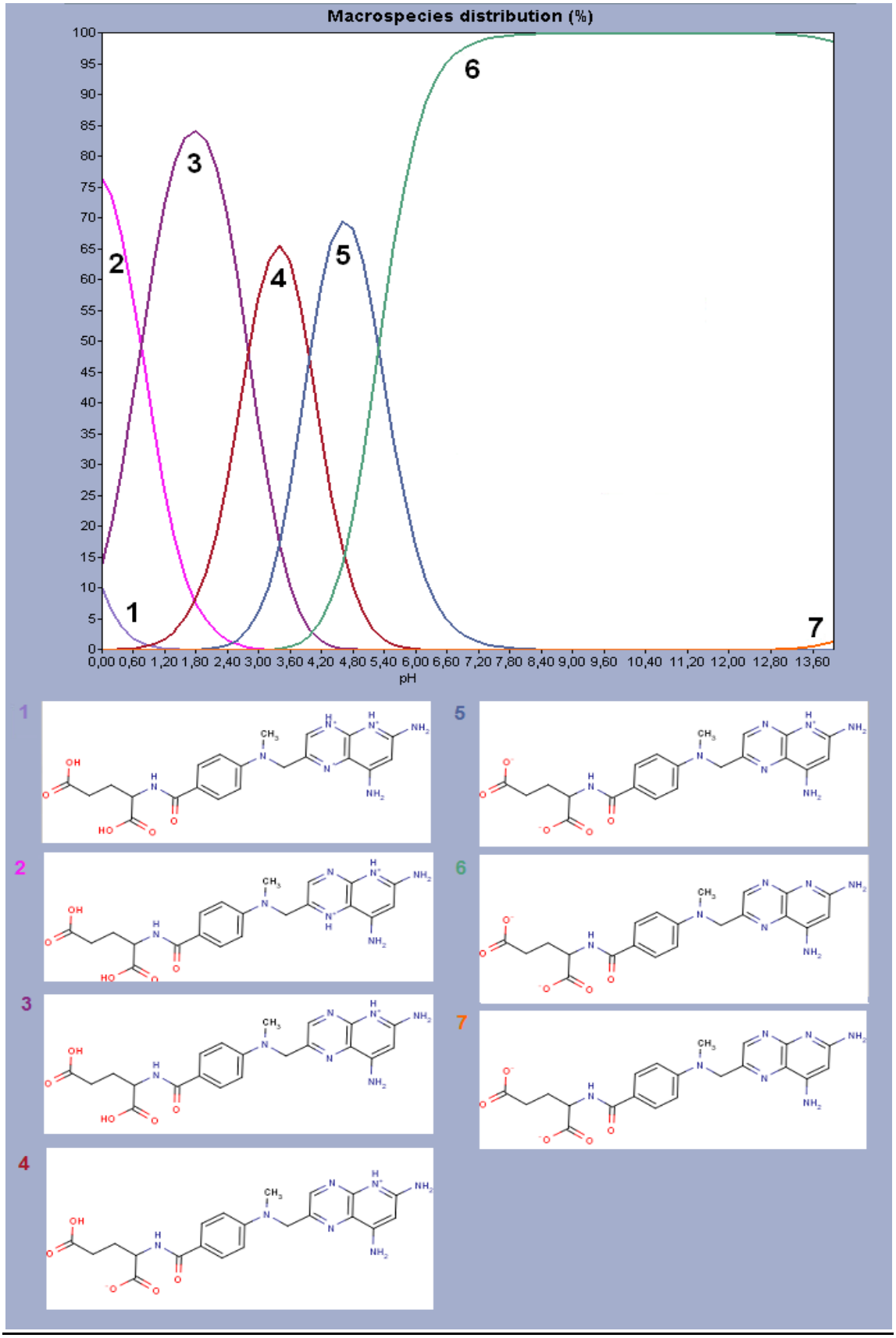


Figura 22. Análise teórica das espécies iônicas do MTX encontradas em diferentes valores de pH.

Análise das espécies iônicas: Pró–fármaco 1

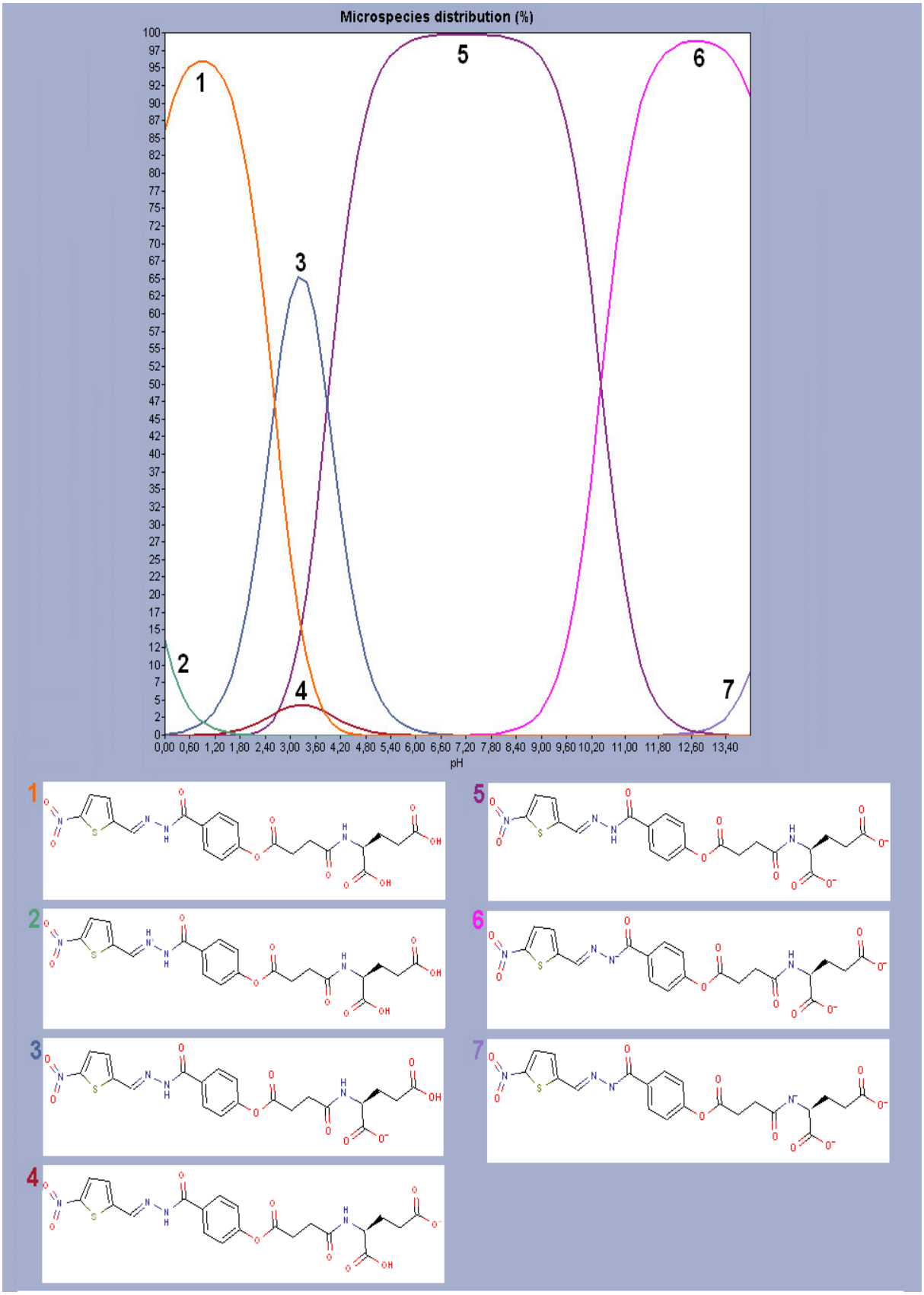


Figura 23. Análise teórica das espécies iônicas do pró-fármaco ***1*** encontradas em diferentes valores de pH.

Análise das espécies iônicas: Pró–fármaco 2

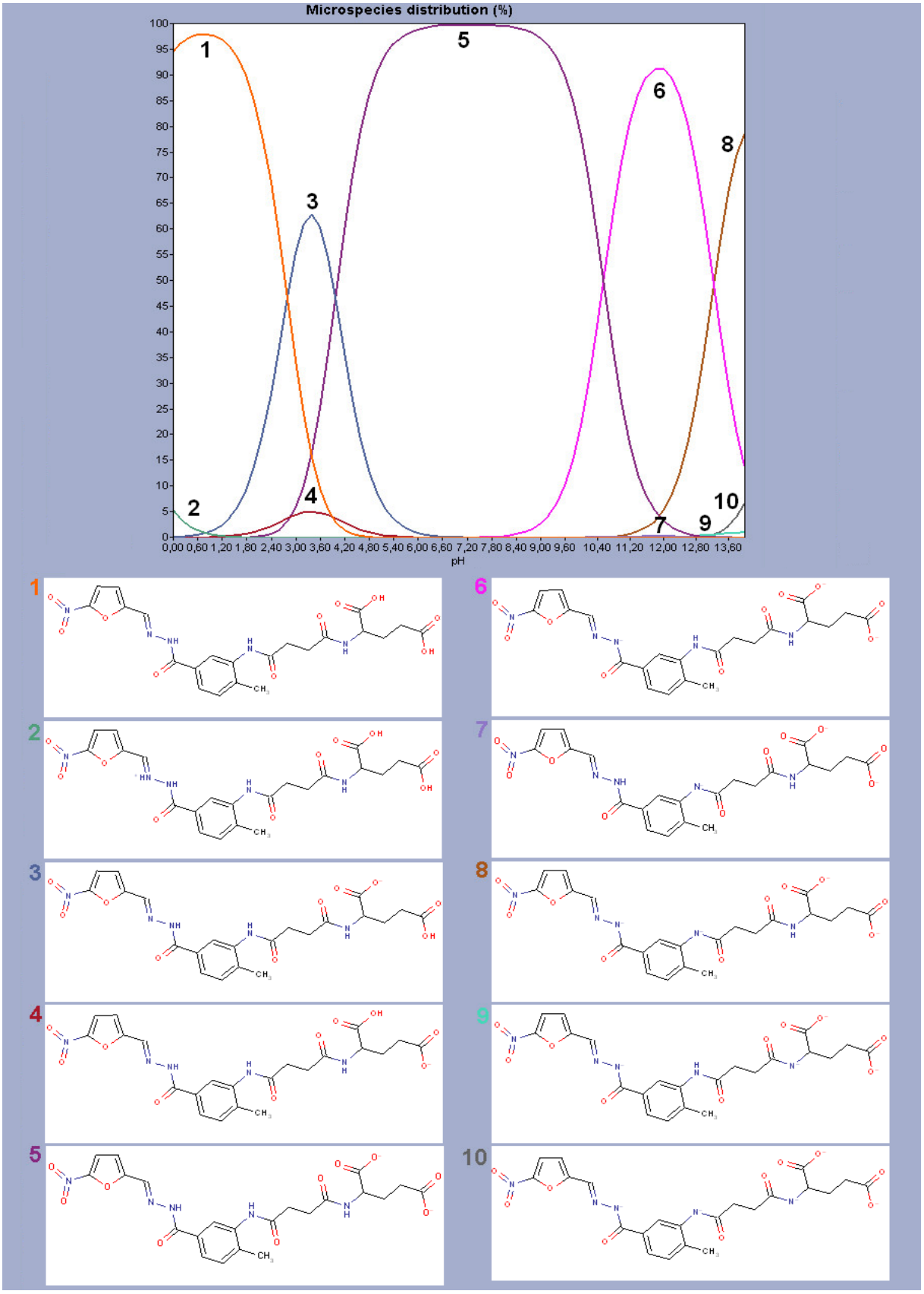


Figura 24. Análise teórica das espécies iônicas do pró-fármaco **2** encontradas em diferentes valores de pH.

Análise das espécies iônicas: Pró–fármaco 3

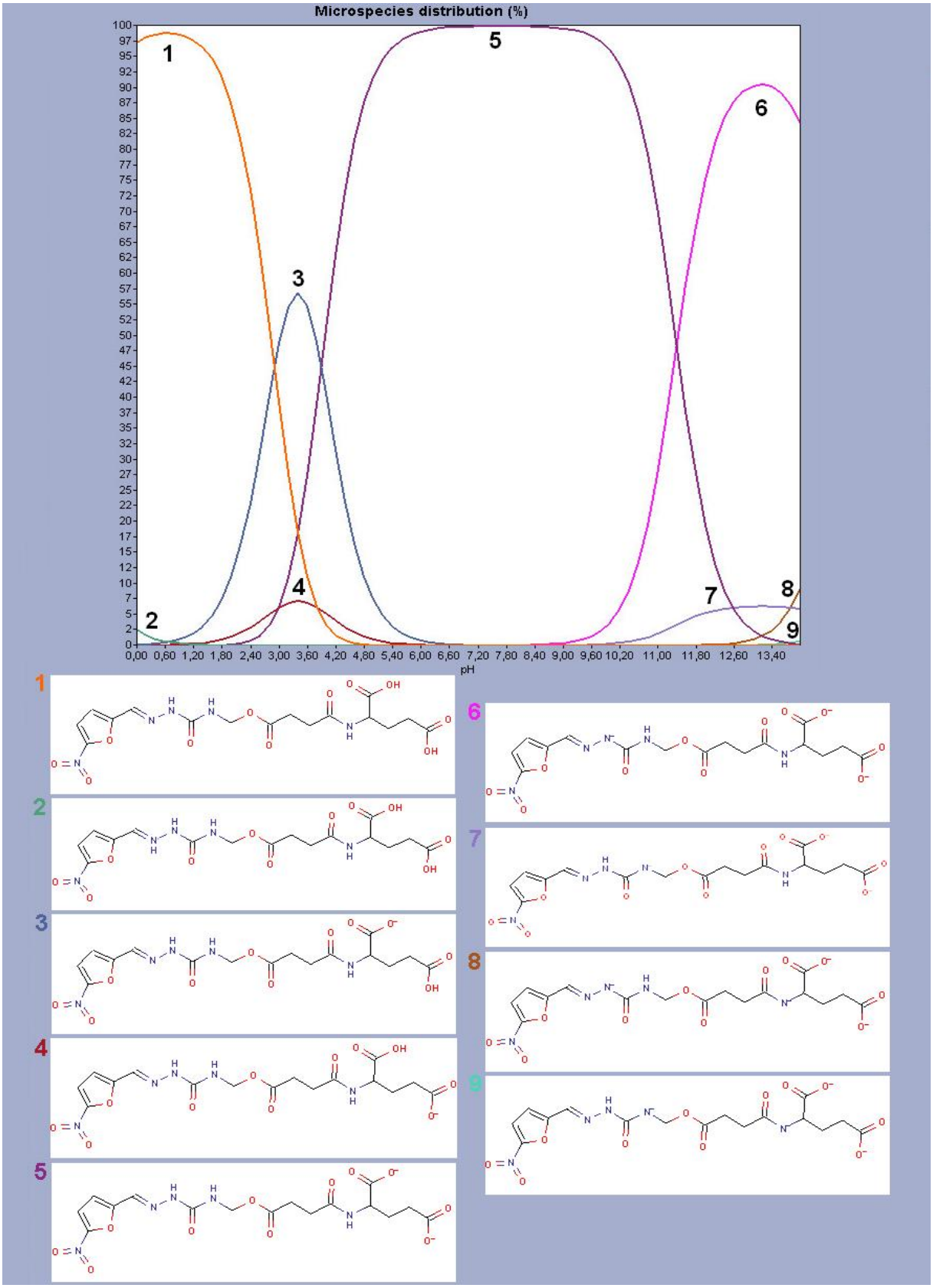


Figura 25. Análise teórica das espécies iônicas do pró-fármaco ***3*** encontradas em diferentes valores de pH.

Análise das espécies iônicas: Pró–fármaco 4

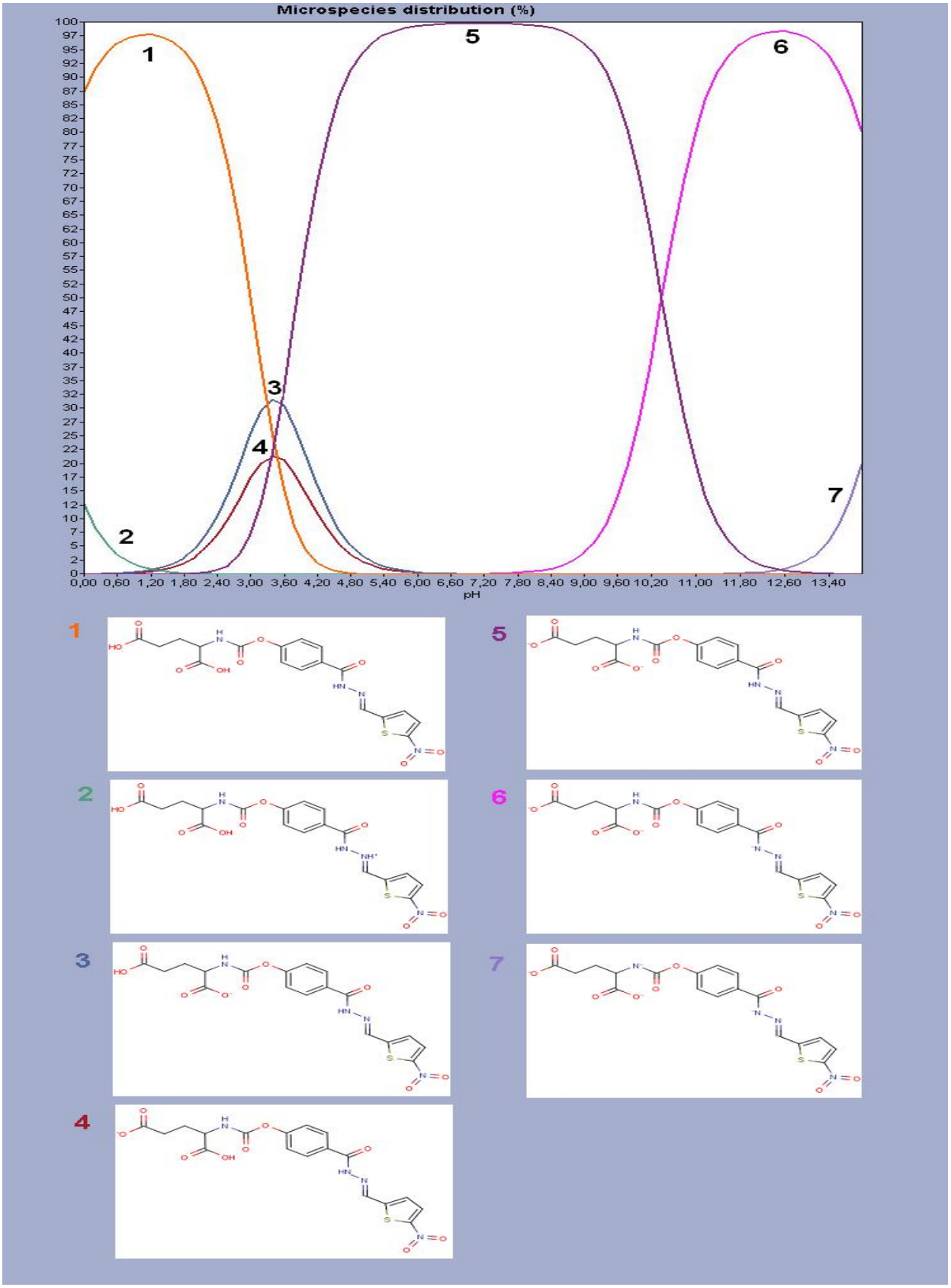


Figura 26. Análise teórica das espécies iônicas do pró-fármaco ***4*** encontradas em diferentes valores de pH.

Análise das espécies iônicas: Pró–fármaco 5

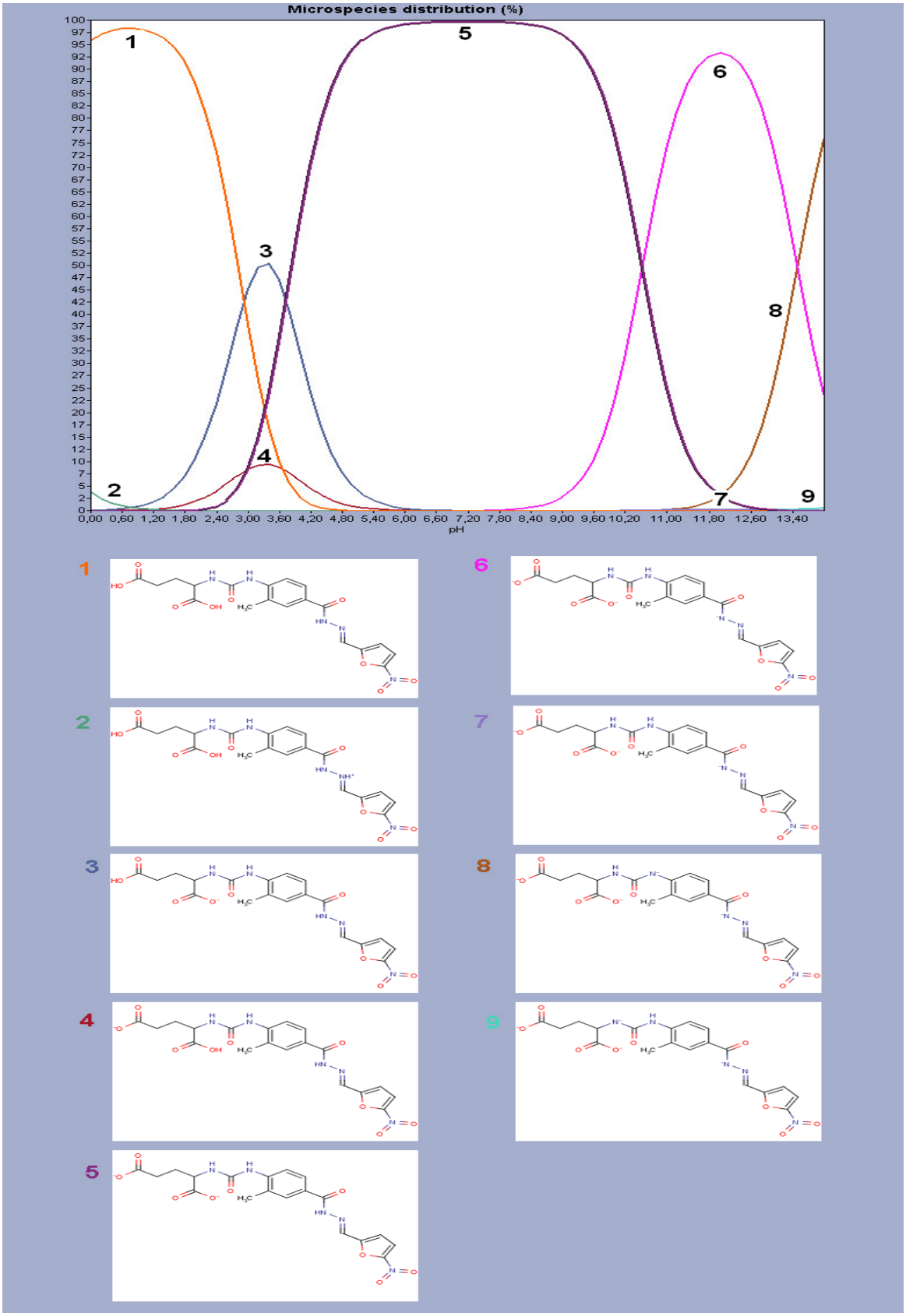


Figura 27. Análise teórica das espécies iônicas do pró-fármaco ***5*** encontradas em diferentes valores de pH.

Análise das espécies iônicas: Pró–fármaco 6

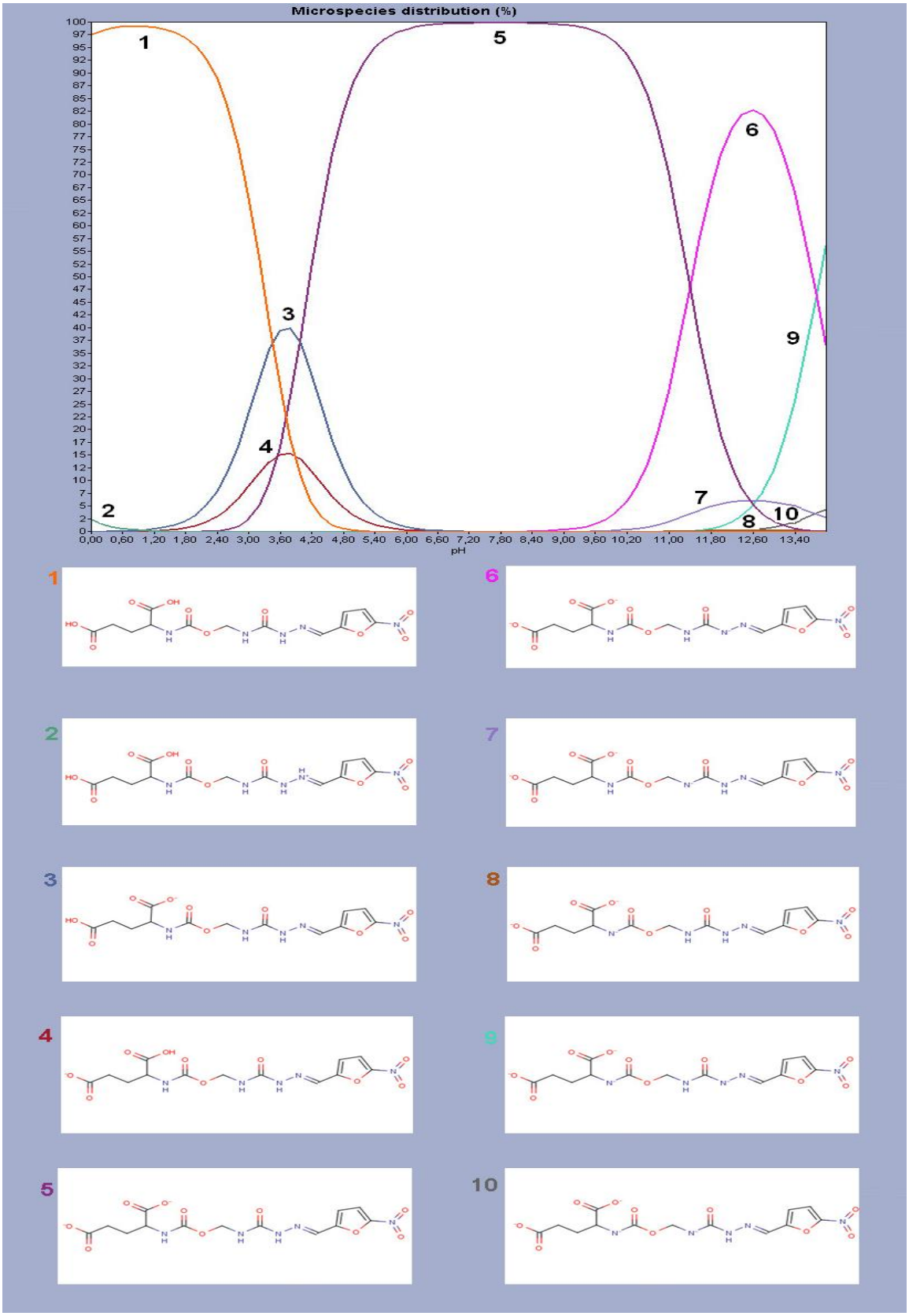


Figura 28. Análise teórica das possíveis espécies iônicas do pró-fármaco ***6*** encontradas em diferentes valores de pH.

A mesma análise teórica sobre quais espécies poderiam ser encontradas em função da variação de pH foi realizada para cada um dos pró-fármacos propostos. Especial atenção foi dada para o valor de pH 7,4 fisiológico, escolhido como valor de pH de trabalho (Figura 22-28).

Em todas as análises, ainda que diferentes números de espécies tenham sido geradas para cada um dos pró-fármacos, a espécie de número 5, ou seja, o pró-fármaco contendo a porção glutamato sob a forma de dicarboxilato foi a predominante em pH fisiológico em todos os casos.

Também foi possível verificar quais outras espécies estariam presentes em diferentes compartimentos orgânicos. A exemplo destas, podemos citar o caso do pró-fármaco 1 (Figuras 23):

- ✓ A espécie de número 3, que apresenta apenas uma de suas funções carboxílicas desprotonada, seria a predominante no compartimento estomacal (pH = 2,0) como revela o gráfico da Figura 22, sendo representada pela curva de coloração azul escuro.
- ✓ Por outro lado, a espécie de número 5, predominante no pH sanguíneo, também parece ser preponderante quando consideramos o pH do compartimento intestinal (8,0). A medida que o valor de pH aumenta, a espécie de número 6, apresentando não somente dois carboxilatos, mas também uma desprotonação do nitrogênio da função hidrazida, começa a se formar e poderia estar presente, em equilíbrio com a espécie 5 (50% cada), nas porções finais do intestino delgado. Estes dados fornecem uma previsão inicial sobre a absorção destes fármacos, caso fossem administrados por via oral, porém estudos posteriores de farmacocinética devem ser realizados a fim de verificar a melhor via de administração destes compostos.

É interessante notar que, em todos os pró-fármacos, a parte da estrutura química correspondente ao transportador do pró-fármaco, o ácido glutâmico, é a que apresenta variação

significativa em pH fisiológico. Sendo esta estrutura a de reconhecimento por parte da carboxipeptidase G_2, é importante que a forma ionizada seja considerada nos estudos de modelagem dos pró-fármacos.

4.1.2. Desenho e otimização das estruturas dos pró-fármacos

As geometrias das estruturas tridimensionais de cada um dos pró-fármacos, previamente construídas e tratadas por meio de Mecânica Molecular (MM+) e metodologia semi-empírica (PM3), foram utilizadas como parâmetros iniciais para os estudos de ancoramento.

4.1.3. Ancoramento

Uma questão importante a considerar-se neste estudo de ancoramento dos complexos refere-se ao fato de que o mecanismo catalítico da carboxipeptidase G_2 (CPG_2), enzima alvo nos estudos de nossos pró-fármacos, ainda não foi totalmente esclarecido (WOUTERS, HUSAIN, 2001). No entanto, acredita-se que seu mecanismo de ação esteja relacionado à água de hidratação, presente entre os dois átomos de zinco, e que esta atue como nucleófilo primário do sítio ativo. De modo geral, este mecanismo ocorre para todas as carboxipeptidases, e parte do pressuposto de que um carbono carbonílico eletrofílico, presente no substrato, é atacado pelo oxigênio nucleofílico desta molécula de água coordenada por um átomo de zinco (WOUTERS, HUSAIN, 2001).

Informações sobre a estrutura cristalografada da CPG_2 encontram-se disponíveis no banco de dados *PDB*, sob o código de entrada 1CG2 (ROWSELL *et al.,1997)*. Também estão disponíveis informações obtidas em trabalhos de comparação de proteínas por homologia (HOLZ, BZYMEK, SWIERCZEKL, 2003; WOUTERS, HUSAIN, 2001). Dados de co-cristalografia

e informações relacionadas a interações com seus substratos, entretanto, não se encontram descrito em literatura.

Por esta razão, a estrutura de um de seus reconhecidos substratos, o MTX (Figura 20), foi ancorada a esta enzima, a fim de se estabelecer um padrão para análise das possíveis interações dos pró-fármacos propostos neste trabalho. Para este estudo, então, foram consideradas informações da literatura sobre a interação do MTX com outras enzimas como, por exemplo, a diidrofolato redutase (VOLPATO *et al.*, 2009; SENKOVICH, SCHORMANN, CHATTOPADHYAY, 2009) bem como as hipóteses de interações com substratos formuladas pelo grupo responsável pela elucidação estrutural da enzima por cristalografia de raios-X (ROWSELL *et al*., 1997).

Estudos quânticos e cristalográficos de metalopeptidases propõem o mecanismo catalítico de enzimas que apresentam dois átomos de zinco envolvidos na clivagem de seus substratos pelo sítio catalítico. Este é o caso, por exemplo, da carboxipeptidase de *Aeromonas proteolytica,* que apresenta extensiva homologia estrutural no sítio catalítico quando comparada à CPG_2 (ROWSELL *et al*., 1997). Estes estudos também foram tomados como base para as simulações de ancoramento e dinâmica molecular desenvolvidas neste estudo e a serem discutidas.

A estrutura cristalografada do MTX foi obtida no banco de dados *PDB* e os procedimentos para sua otimização e cálculos de carga foram realizados sob a mesma metodologia dos pró-fármacos. Seu ancoramento à CPG_2 foi realizado dez vezes, sob condições idênticas. Cada corrida gerou dez confôrmeros classificados em ordem crescente de energia total do complexo. Esta ordenação dos ancoramentos obtidos pelo programa computacional é denominada *score* e consiste na somatória de diferentes contribuições energéticas, a saber, energia de ligação de hidrôgenio proteína-ligante, energia de van der

Waals proteína–ligante, energia interna de van der Waals do ligante e energia de torsão do ligante. O ajuste foi medido como a somatória negativa de todos os componentes energéticos envolvidos na energia final do complexo, sendo que valores numéricos maiores correspondem a melhores ajustes.

Os confôrmeros gerados foram analisados de acordo com a distância entre os átomos da proteína e do ligante que participariam do processo catalítico. Segundo a literatura, a enzima participaria com um dos íons zinco e com uma molécula de água de adsorção presente no centro catalítico, enquanto o ligante interagiria por meio de uma carbonila eletrofílica que receberia os elétrons provenientes da água. Desta forma, foram consideradas, na escolha dos melhores complexos, as distâncias mais favoráveis entre o átomo de oxigênio da molécula de água (átomo 1) e a carbonila da amida do substrato (átomo 2), bem como a distância de coordenação entre o átomo de oxigênio do substrato (átomo 3) pelo átomo de Zn^{2+} do sítio catalítico (átomo 4), distâncias estas que possibilitariam a clivagem da porção glutamato. Tais distâncias, previamente descritas em literatura (KLUSÁK e*t al*., 2009; HARDING, 2001), deveriam obedecer o limite de 3,5 Å e 2,5 Å, respectivamente. Para a escolha do confôrmero, também foi considerado seu posicionamento na ordenação energética dos complexos obtidos (*ranking*), uma vez que os melhores pontuados seriam energeticamente mais favoráveis.

Para o MTX, em um total de 100 confôrmeros analisados, 20 apresentaram distâncias dentro dos limites discutidos (Tabela I), porém nem todos se mostraram energeticamente favoráveis.

Tabela I. Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do complexo para a estrutura do MTX

Ancoramento	Posição no *ranking*	Distância (Å) do átomo 1 em relação ao átomo 2	Distância (Å) do átomo 3 em relação ao átomo 4
1	1°	2,92	2,75
1	3°	3,33	3,22
1	8°	3,39	3,22
1	9°	3,70	3,64
2	1°	3,59	3,56
2	3°	3,36	3,25
3	1°	3,44	3,22
3	9°	2,79	3,67
4	10°	3,41	3,29
5	6°	3,55	3,46
5	9°	3,49	3,37
6	2°	3,26	3,12
7	3°	3,49	3,53
8	2°	3,66	3,78
8	3°	3,37	3,29
8	5°	3,65	3,58
8	6°	3,79	3,73
8	7°	3,82	3,60
9	5°	3,89	3,85
10	9°	3,42	3,30

Figura 29. Representação do MTX no sítio catalítico da CPG_2. Os pontilhados amarelos mostram a distância entre os átomos 1 e 2, bem como a distância do átomo 3 em relação ao 4. Os carbonos estão representados em verde, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, hidrogênio em branco e zinco em laranja. A proteína é representada na sua estrutura secundária, em que folhas beta-pregueadas aparecem em rosa e alfa-hélices em verde. Modelo produzido no software *Pymol 1.1*

O confôrmero com distâncias de 2,75 Å entre o átomo 1 e o átomo 2, e 2,92 Å entre o átomo 3 e o átomo 4 (Figura 29) apresentou valores compatíveis com os esperados para interações com metais segundo estudos de coordenação descritos em literatura (KLUSÁK e*t al*., 2009; HARDING, 2001) e, por ser energeticamente mais favorável, foi escolhido como padrão para desenvolver as simulações de DM.

A análise dos resultados de ancoramento sugere que, uma vez ancorado no sítio ativo, o MTX interage em pontos críticos para o reconhecimento e clivagem pela CPG_2, sendo que os confôrmeros energeticamente mais favoráveis tendem a se orientar de forma a acomodar a porção pteridina em um bolso adjacente (P1) ao sítio catalítico, composto principalmente pelos resíduos serina 210 (SER 210), Treonina 213 (THR 213), fenilalanina 327 (PHE 327), treonina 361 (THR 361), alanina 363 (ALA 363) e glutamato 375 (GLUT 375) (Figura 30, A). O aminoácido ALA 363 localiza-se na parte posterior do bolso conforme mostra Figura 30, B.

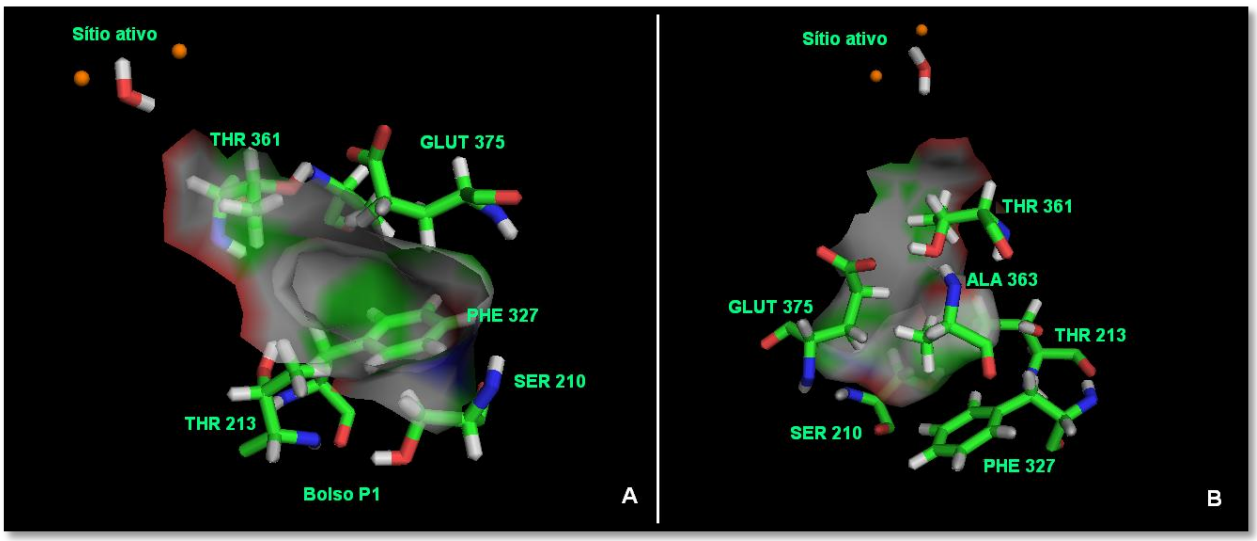


Figura 30. Aminoácidos que compõem o bolso P1 da enzima CPG_2. Os carbonos estão representados em verde, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, hidrogênio em branco e zinco em laranja (*Pymol 1.1).* As poses frontal e posterior do bolso P1 são representadas nas ilustrações A e B, respectivamente.

A porção glutamato do MTX, por sua vez, orienta-se para a região externa da estrutura protéica (P1'). A disposição geral do sítio ativo da CPG_2 é ilustrada na Figura 31, A e o encaixe descrito anteriormente na Figura 31, B.

O ancoramento foi empregado com o intuito de encontrar o confôrmero de melhor ajuste no sítio ativo da CPG_2 e para que este fosse utilizado como estrutura de entrada (*input*) nas simulações de DM. A combinação destas duas técnicas permite compreender melhor o comportamento do sistema, auxiliando na obtenção de informações mais detalhadas e de maior confiabilidade sobre o mecanismo catalítico envolvido na clivagem de substratos pela CPG_2.

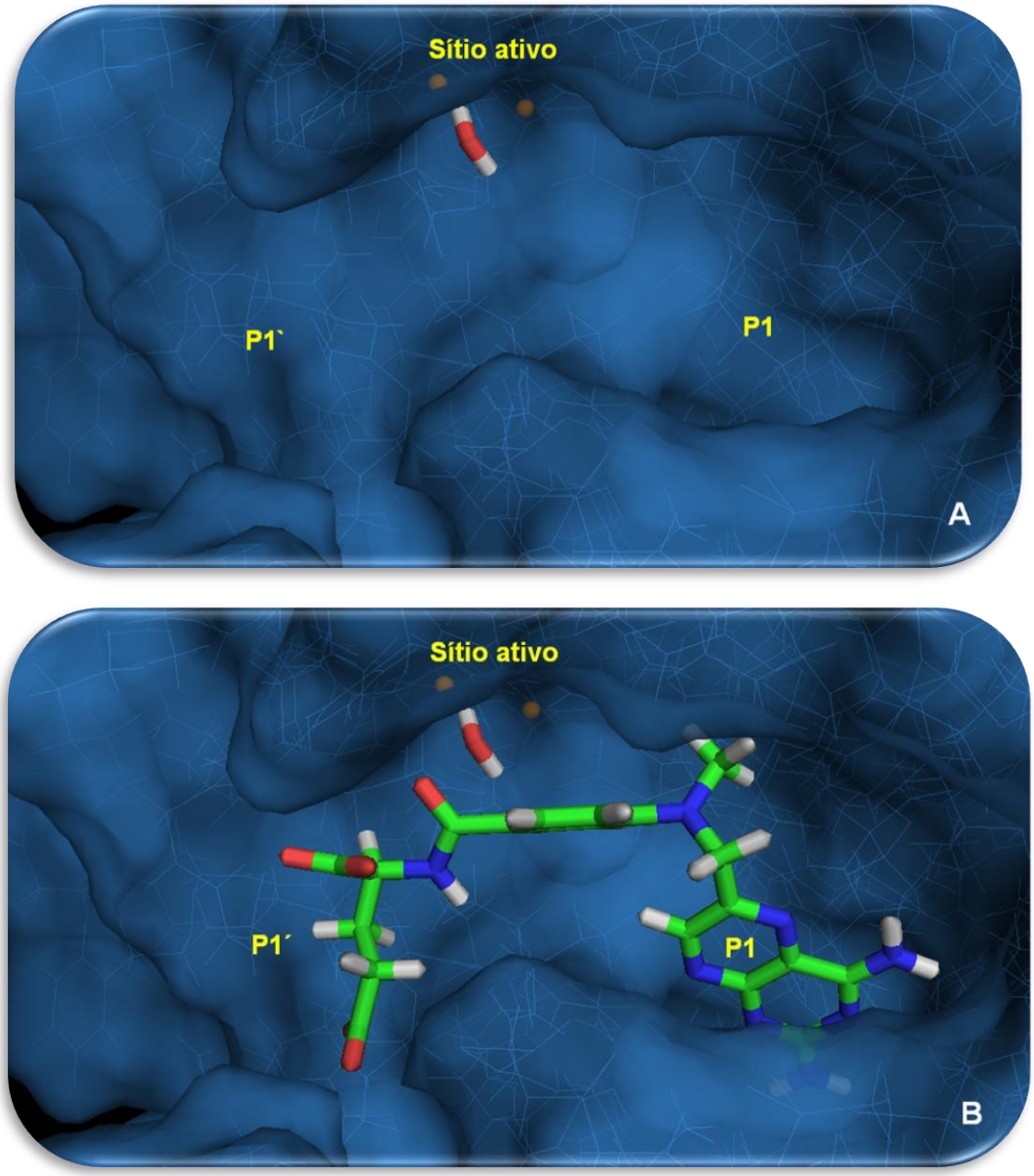


Figura 31. Representação mostra o bolso P1 e a porção P1' adjacentes ao sítio ativo da CPG_2 (A). Posicionamento do MTX no sítio catalítico da enzima (B). Átomos de carbono são representados em verde, nitrogênio em azul. Oxigênio em vermelho e os hidrogênios e branco. Os átomos de zinco do sítio catalítico estão representados como modelo bola-palito e na cor laranja. Modelo produzido no software *Pymol 1.1.*

4.1.4. Dinâmica molecular

Para as simulações de dinâmica molecular (DM), empregou-se o software MOLSIM 3.2 (MOLSIM 3.2, The Chem21 Group, Inc., 1997).

Estas simulações foram processadas com os modelos tridimensionais dos complexos, previamente obtidos no software GOLD 3.1 (*Cambridge Crystallographic Data Centry,* 2004), os quais tiveram a energia previamente minimizada pelos métodos *steepest descent* e gradiente conjugado.

Aos átomos da cadeia polipeptídica do modelo protéico foram conferidas massas fictícias elevadas, de 5000 u.m.a., a fim de determinar restrições cartesianas. Isto nos permitiu concentrar as forças das DM somente nas cadeias laterais da proteína sem que ocorresse perda da integridade estrutural do modelo, proporcionando, assim, melhor acomodação do substrato e estabilização mais rápida do complexo (PASQUALOTO, FERREIRA, 2006).

A abordagem, *warming-up*, utilizada nas simulações de DM permite explorar diferentes estados conformacionais da geometria do complexo, sendo que a partir de altas temperaturas é possível que o ligante vença barreiras energéticas e encontre o encaixe ideal no sítio ativo (TOKARSKI, HOPFINGER, 1997).

Na figura 32 apresentam-se os perfis conformacionais ao longo da DM realizada para cada uma das temperaturas estudadas (Figura 32).

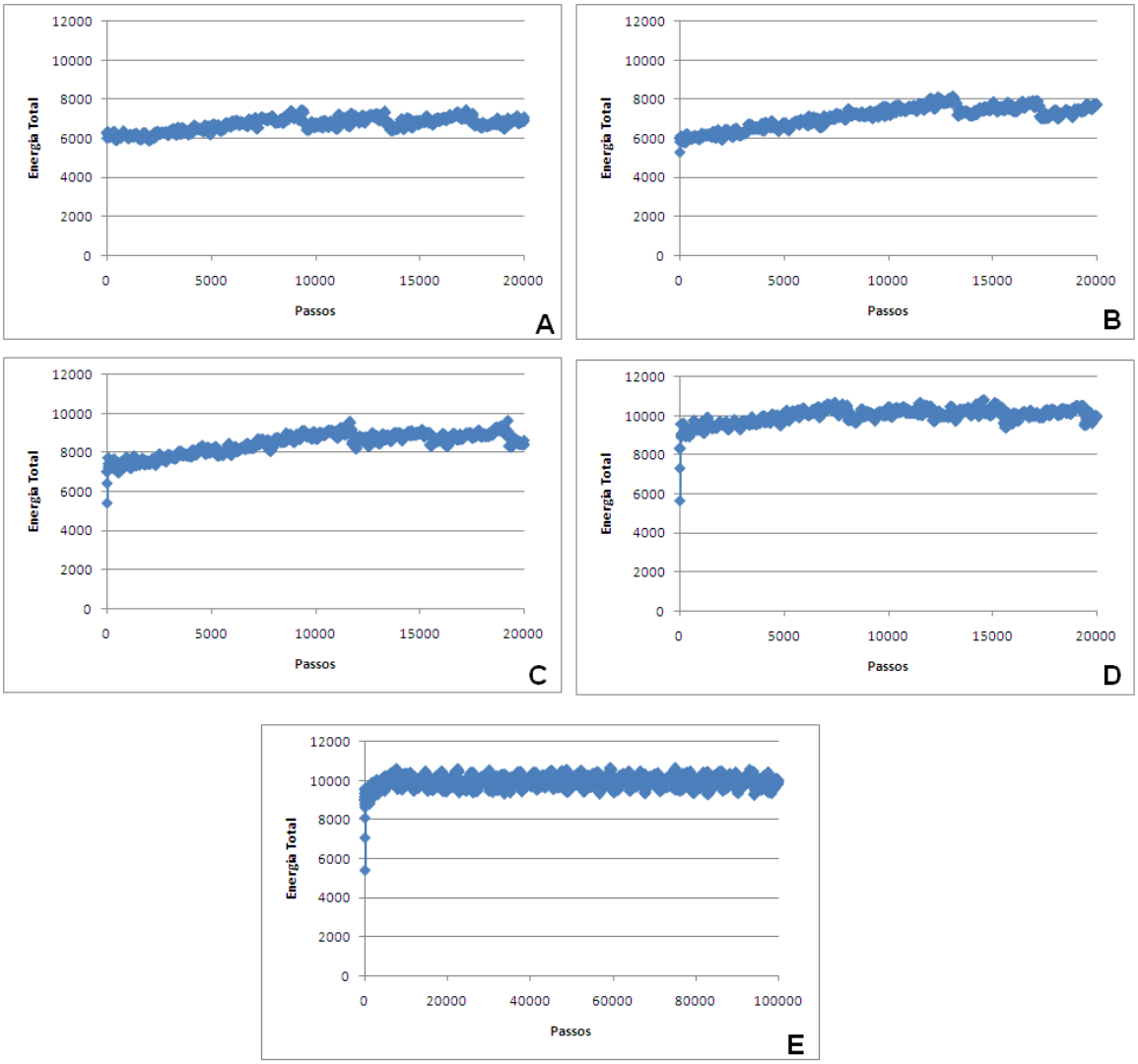


Figura 32. Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2-MTX versus tempo. Simulação do complexo a 50 K (A), 100 K (B), 200 K (C), 300 K (D), 298 K (E).

Como mostram os perfis, o complexo trabalhado atingiu o equilíbrio gradativamente, tendo em vista que, apenas na dinâmica de 100 ps a 298 K, estabilizou-se completamente.

As contribuições de energia envolvidas nas simulações de DM foram: energia de deformação axial ou de estiramento, energia de deformação angular, energia de deformação torsional, energia de van der Waals, energia eletrostática, energia de ligação hidrogênio, energia de Lennard-Jones e energia de solvatação. Valores de energia total para os confôrmeros foram computados e os *frames* de menor energia mínima em cada simulação foram selecionados. Para estes, as contribuições de energia de solvatação e ligação de hidrogênio foram consideradas no

cálculo de energia total, sendo que a contribuição de energia de solvatação foi calculada com o modelo de camada implícita de hidratação descrito por Hopfinger (1973) (Tabela II).

Tabela II. Valores de energias computadas nas simulações de DM para os confôrmeros de energia mínima do complexo CPG_2-MTX

Valores de Energia (Kcal/mol)										
TEMPERATURA (k)	**Eest**	**Eang**	**Etors**	**E1,4**	**EvdW**	**Eel**	**INTERV+C**	**Esolv**	**Ehb**	**Etot**
50	2862,4	2755,6	2735,8	8690,3	-2254,8	-8641,1	588,6	-774	-57,5	-51,6
100	3111,7	3077,9	2793,8	8778,3	-2214,3	-8775,0	579,1	-705	-58,0	-51,3
200	3674,5	3687,8	2857,4	8850,9	-2011,8	-8837,9	581,9	-679	-56,6	-48,5
300	4123,2	4143,8	2976,3	8954,5	-1938,4	-8933,0	586,7	-564	-56,9	-47,6
298	3995,5	4047,7	2955,2	8935,5	-2011,3	-9225,8	571,7	-641	-57,3	-48,7

* Eest = energia de deformação axial ou estiramento; Eang = energia de deformação angular; Etors = energia torsional; E1,4 = energia de interação do tipo 1-4 ou Lennard-Jones; EvdW = energia de van der Waals; Eel = energia eletrostática; INTERV+C=soma das contribuições de energia eletrostática e de van der Waals intermoleculares; Esolv = energia de solvatação; EHb = energia de ligação de hidrogênio; Etot = energia total (potencial), corresponde à soma de todas as contribuições de energia.

A integridade estrutural dos confôrmeros de menor energia mínima da proteína, selecionados em cada simulação, foi avaliada em relação à sua estrutura cristalografada, a partir do desvio da raiz dos quadrados mínimos (*root means square deviation*- RMSD), pela sobreposição de suas estruturas. Este procedimento foi realizado com o auxílio do software *Hyperchem 7.51* (Hypercube, 2003) e mostrou que com o aumento de temperatura, houve aumento da vibração e energia com consequente desvio no RMSD do modelo (Figura 33). Ainda, mesmo ao atingir 298 K, última escala de temperatura das simulações, a proteína manteve a sua integridade estrutural, não ultrapassando 1.5 Å do desvio dos quadrados mínimos como recomenda a literatura (PASQUALOTO, FERREIRA, 2006).

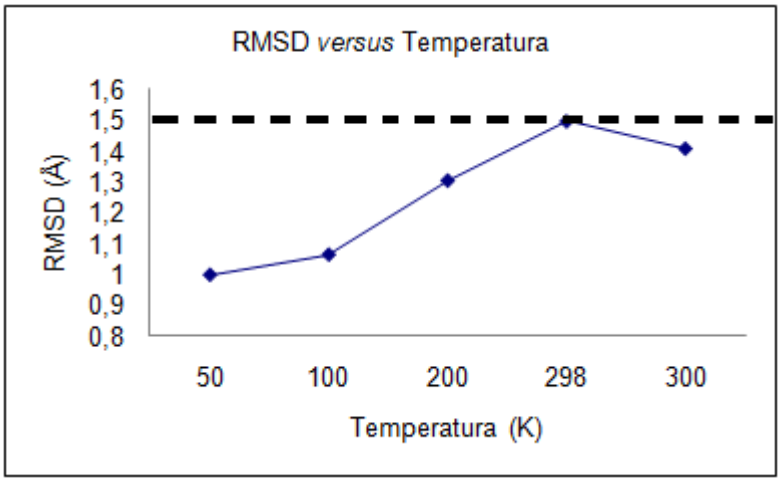


Figura 33. RMSD dos confômeros de menor energia mínima da proteína segundo a variação de temperatura.

O modo de ligação estabelecido para o MTX após as simulações de dinâmica molecular estão próximos àquele obtido nas simulações de ancoramento.

A análise das simulações de DM sugere que o MTX tende a se orientar de forma a acomodar a porção pteridina no bolso P1 adjacente ao sítio catalítico devido à formação de ligações de hidrogênio entre os nitrogênios da porção pteridina com o oxigênio carbonílico do resíduo LYS 208 e com o nitrogênio amídico e o oxigênio carbonílico do resíduo SER 210, respectivamente. Estes achados são corroborados pelas observações feitas por Rowsell (1997), nas quais o autor compara a acomodação do resíduo fenilalanina de inibidores hidroxamatos em um bolso hidrofóbico presente no sítio catalítico da protease de *Aeromonas proteolytica* (CHEVRIER *et al.*, 1996) com uma região identificada durante a cristalografia da CPG_2, que, provavelmente, equivaleria a este bolso e que acomodaria, no caso desta enzima, a pteridina do ácido fólico.

A porção glutamato do MTX, que se orienta para a região externa da estrutura protéica, interage por ligações de hidrogênio com o resíduo de Arginina 324 (ARG 324) localizado na porção (P1') e, possivelmente, com moléculas de água de adsorção da CPG_2 (Figura 34).

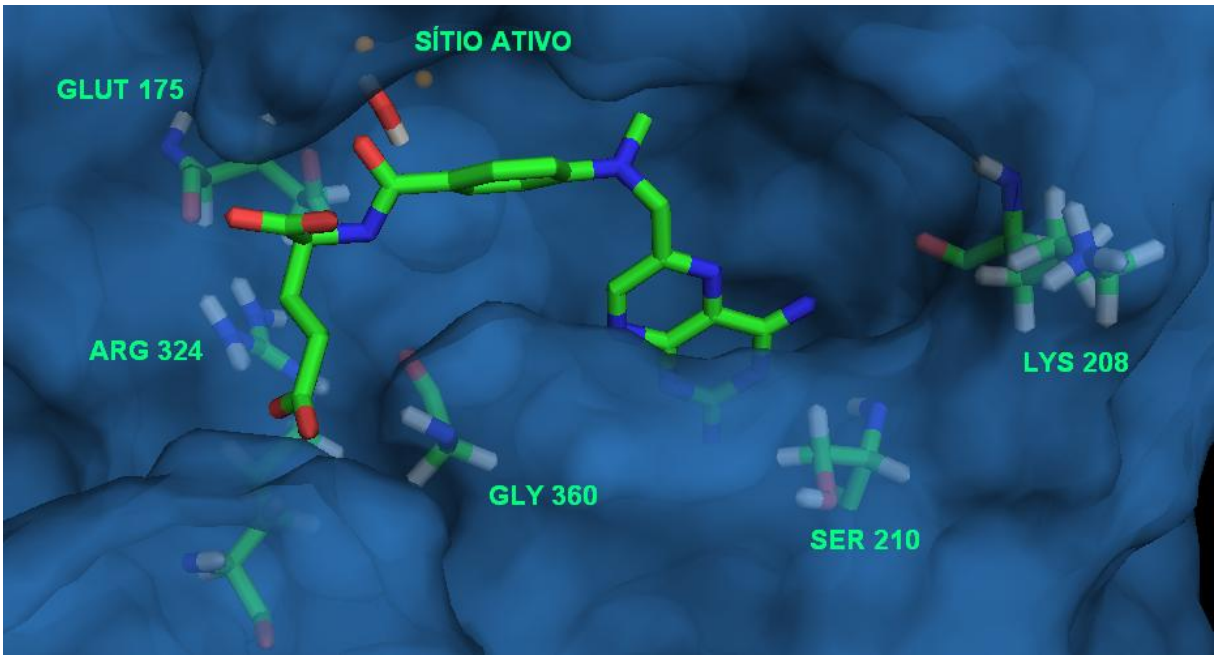


Figura 34. Representação do MTX no sítio ativo da CPG_2 após simulações de DM.
Átomos de carbono são representados em verde, nitrogênio em azul. Oxigênio em vermelho e os hidrogênios e branco. Os átomos de zinco do sítio catalítico estão representados como modelo bola-palito e na cor laranja. Modelo produzido no software *Pymol 1.1.*

Estes resultados corroboram as discussões de Rowsell (1997) sobre estudos de mutagênese da CPG_2, nos quais a ARG 324 foi substituída por um resíduo de alanina resultando em mutante com atividade catalítica diminuída para o MTX. Nas proteínas mutadas o resíduo 324 estaria demasiadamente longe do sítio ativo para desempenhar papel catalítico, o que indicaria a importância deste aminoácido no reconhecimento da porção glutamato do substrato pela enzima.

As análises do complexo também sugerem que o aminoácido glutamato 175 (GLUT 175) esteja envolvido no mecanismo catalítico desta enzima. Um dos grupos carboxílicos deste resíduo está em distância favorável para interação com o átomo de hidrogênio da amida do substrato (3,67 Å), enquanto o outro interagiria com a molécula de água do sito catalítico (Figura 35). Provavelmente este aminoácido desempenha função de ácido/base, promovendo a ativação

da molécula de água de maneira similar ao GLUT 151 na *Aeromonas proteolytica* em estudos reportados na literatura (HOLZ, BZYMEK, SWIERCZEK, 2003; ROWSELL *et al*., 1997).

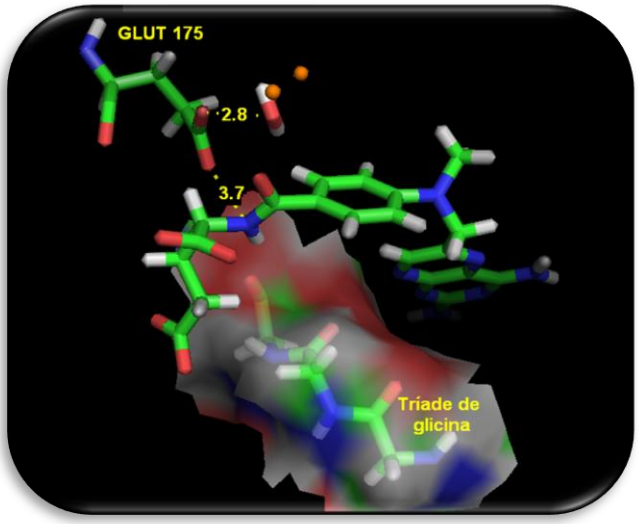


Figura 35. Proposta de interação entre o carboxilato do resíduo GLUT 175 da CPG_2 com o hidrogênio da amida do substrato. Os átomos de carbonos estão representados em verde, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, hidrogênio em branco e zinco em laranja (*Pymol 1.1).*

O anel aromático encontra-se posicionado sobre uma tríade de glicina, de caráter hidrofóbico encontrada em metalopeptidases, além de ser responsável pelo posicionamento do anel pteridínico no bolso P1. Ainda, interação eletrostática pode ser observada entre a amida formada com a porção glutamato com o oxigênio carbonílico do resíduo glicina 360 (GLY 360).

As interações moleculares e a complementaridade estérica observadas para o complexo estão em concordância com o esperado para o mecanismo catalítico da CPG_2 (HOLZ, BZYMEK, SWIERCZEK, 2003; ROWSELL *et al.,1997*)

Os resultados de ancoramento para os pró-fármacos, com ou sem agente espaçante, já mostram que estes se orientam de maneira similar ao MTX no sítio de ação da enzima em estudo (Figura 36) antes mesmo de submeter estes pró-fármacos ao tratamento por dinâmica molecular.

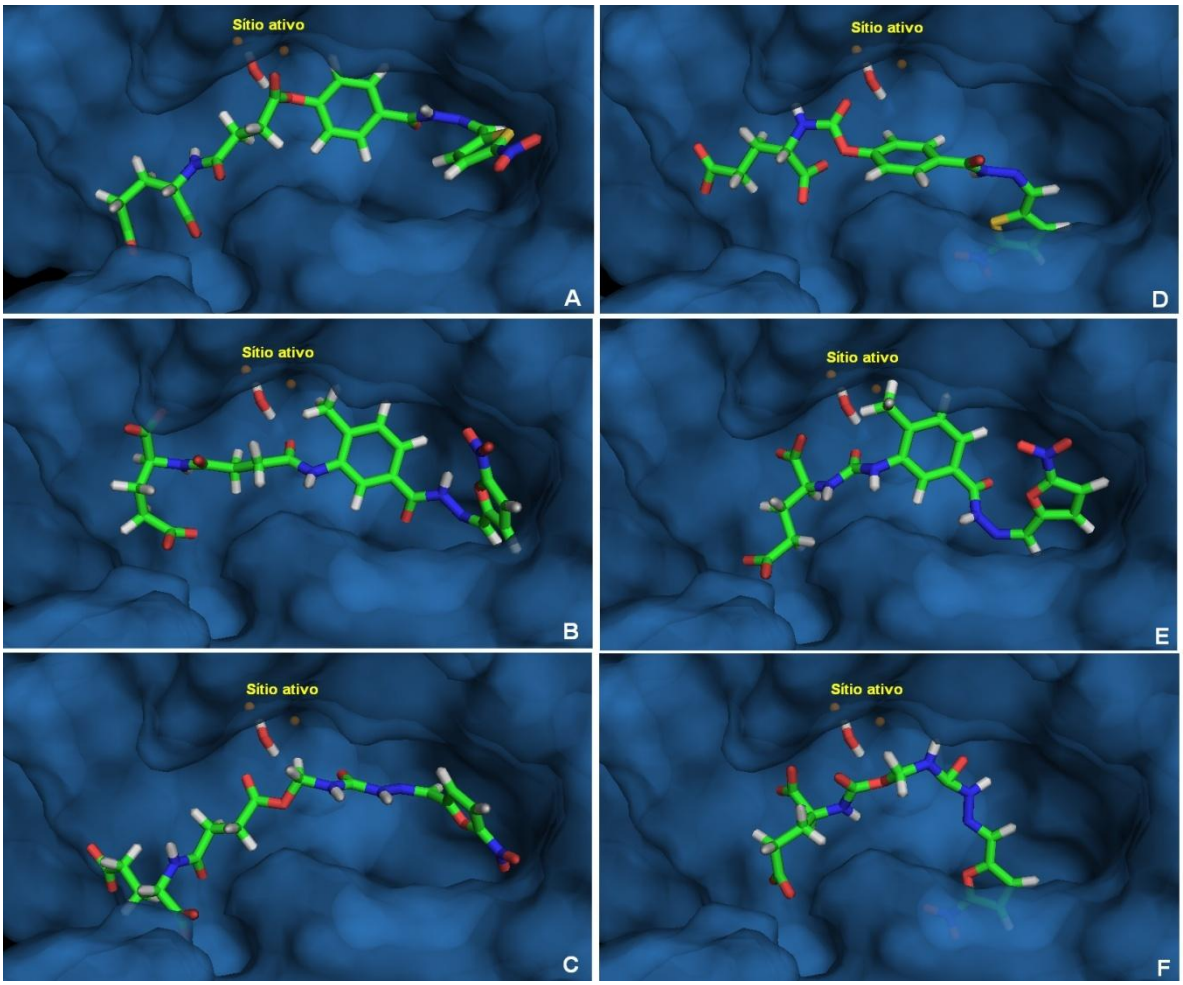


Figura 36. Orientação dos pró-fármacos ***1*** (A), ***2*** (B) ,***3*** (C) ,***4*** (D), ***5*** (E), ***6*** (F) no sítio ativo da CPG_2. Átomos de carbono são representados em verde, nitrogênio em azul. Oxigênio em vermelho e os hidrogênios e branco. Os átomos de zinco do sítio catalítico estão representados como modelo bola-palito e na cor laranja. Modelo produzido no software *Pymol 1.1.*

Nesta etapa, os confôrmeros obtidos para os pró-fármacos sem agente espaçante foram analisados a partir do mesmo critério utilizado para o MTX, ou seja, de acordo com a distância entre os átomos da proteína que participariam do processo catalítico (íon zinco 1 e oxigênio da molécula de água 3) e os átomos do substrato que também estariam envolvidos neste processo, a saber, os átomos 2 e 4 dos quadros D, E e F na Figura 37.

Para os pró-fármacos com agente espaçante, analisou-se a distância entre o átomo de zinco 1 e o átomo de oxigênio carbonílico do agente espaçante (átomo 5), bem como a distância entre o átomo de oxigênio da água de adsorção (átomo 3) e o átomo de carbono carbonílico do

agente espaçante (átomo 6). Neste caso, foram consideradas as distâncias passíveis de representarem uma interação real, ou seja, menores que 4 Å e, por esta razão, não foram tomados como ponto de ataque nucleofílico, na molécula destes pró-fármacos, a porção carbonílica formada pela ligação com o aminoácido glutamato, a qual se posiciona distante do sítio catalítico.

Para a escolha dos confôrmeros também considerou-se os ajustes no *ranking*. Vale ressaltar que, na escolha entre confôrmeros que apresentaram distâncias semelhantes e ajustes favoráveis, optou-se por aqueles que se orientavam, no sítio ativo, de maneira similar ao MTX . Os complexos selecionados serviram de *input* para as simulações de DM.

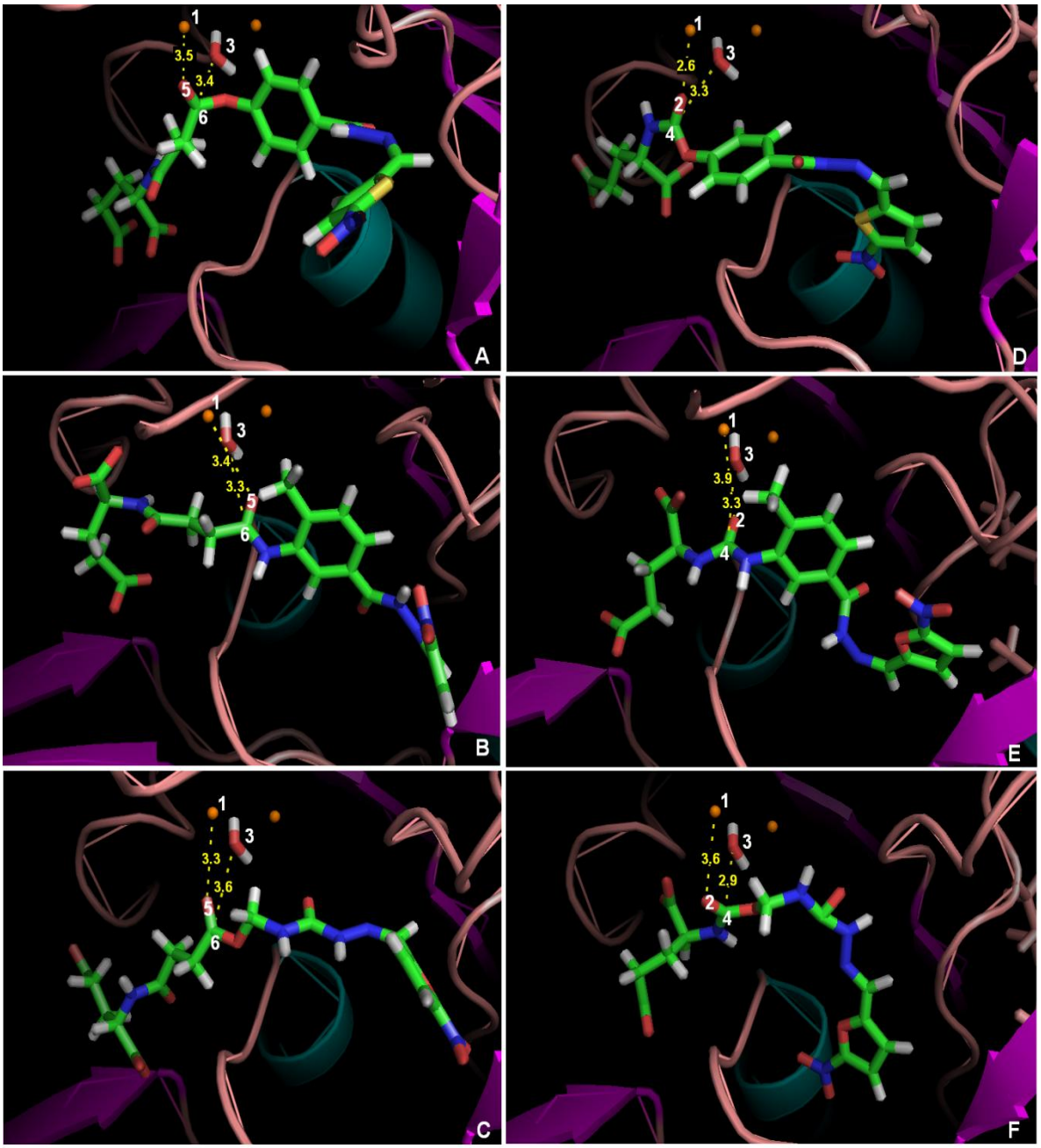


Figura 37. Representação dos pró-fármacos ***1*** (A), ***2*** (B), ***3*** (C), ***4***(D), ***5*** (E), ***6*** (F) no sítio catalítico da CPG_2. Os pontilhados amarelos mostram a distância entre os átomos 1 em relação ao 2, átomo 3 em relação ao 4, 1 em relação ao 5, bem como o átomo 3 em relação ao 6. Os átomos de carbono estão representados na cor verde, os oxigênios em vermelho, os nitrogênios em azul, os átomos de hidrogênio em branco, os de enxofre em amarelo e os de zinco em laranja. A proteína é representada na sua estrutura secundária onde folhas beta-pregueadas aparecem em rosa e alfa-hélices em verde. Modelo produzido no software *Pymol 1.1*.

O pró-fármaco ***1*** apresentou distâncias que obedeceram aos limites aceitáveis neste estudo (Tabela III). O confôrmero que apresentou as distâncias de 3,54 Å entre o átomo 1 e o átomo 5, e de 3,41 Å entre o átomo 3 e o átomo 6, valores mais próximos àqueles descritos em

literatura para outras enzimas ou substratos (KLUSÁK *et al.*, 2009; HARDING, 2001) foi escolhido para as simulações de DM (Figura 37).

Tabela III. Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 1

Ancoramento	Posição no *ranking*	Distância (Å) do átomo 1 em relação ao átomo 5	Distância (Å) do átomo 3 em relação ao átomo 6
1	1°	3,54	3,41
1	2°	3,77	3,89
1	6°	3,11	3,10
2	1°	3,54	3,41
2	4°	3,70	3,94
2	6°	3,87	3,24
2	8°	3,96	3,28
3	5°	2,92	3,77
3	7°	3,50	3,51
3	8°	3,50	3,79
4	8°	3,54	3,33
4	10°	2,98	3,47
5	2°	3,39	3,92
5	4°	3,24	3,20
5	6°	3,05	3,05
6	5°	3,11	3,84
6	6°	2,86	3,25
6	8°	2,69	3,59
7	2°	3,64	3,95
7	10°	2,84	3,70
8	1°	3,71	3,82
8	5°	3,94	3,12
8	7°	3,45	3,21
8	8°	2,85	3,84
8	9°	3,56	2,84
8	7°	3,45	3,21
9	1 °	2,47	3,16
9	5°	2,92	3,83
9	7°	3,25	3,41
9	8°	3,66	3,08
10	2°	3,68	3,56
10	4°	2,47	3,29

Dentre os confôrmeros gerados para o pró-fármaco 2, escolheu-se aquele que apresentou 3,38 Å entre o átomo 1 e o átomo 5, e de 3,32 Å entre o átomo 3 e o átomo 6.

Tabela IV. Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 2

Ancoramento	Posição no *ranking*	Distância (Å) do átomo 1 em relação ao átomo 5	Distância (Å) do átomo 3 em relação ao átomo 6
1	1°	3,81	3,58
1	4°	3,65	2,86
2	1°	3,95	3,47
2	3°	3,21	3,32
2	4°	3,92	3,29
2	5°	3,97	3,85
2	7°	2,93	3,00
3	4°	3,90	3,64
3	5°	3,85	3,18
4	2°	3,98	3,46
4	4°	3,86	3,74
4	5°	3,33	3,21
4	10°	3,69	3,48
5	4°	3,37	3,38
5	5°	3,73	3,41
5	6°	3,99	3,45
6	5°	3,58	2,79
7	8°	3,24	3,35
7	9°	3,74	3,84
7	10°	3,99	3,37
8	2°	3,38	3,32
8	5°	3,42	3,18
8	10°	3,59	3,55
9	2°	3,99	3,56
9	10°	3,87	3,16
10	4°	3,82	3,14

Em relação ao pró-fármaco ***3***, entre os confôrmeros gerados, escolheu-se o que apresentou distância de 3,33 Å entre o átomo 1 e o 5 e de 3,55 Å entre o átomo 3 e o átomo 6. Apesar de ser o que obteve o melhor ajuste, não foi o que apresentou as menores distâncias interatômicas, porém, por posicionar-se de forma similar ao MTX no sítio de ação, foi escolhido como padrão.

Tabela V. Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 3

Ancoramento	Posição no *ranking*	Distância (Å) do átomo 1 em relação ao átomo 5	Distância (Å) do átomo 3 em relação ao átomo 6
1	4°	3,29	3,32
1	7°	3,40	3,72
2	1°	3,33	3,55
2	7°	3,02	3,17
3	3°	3,60	3,71
3	7°	3,32	3,64
4	8°	2,64	3,08
4	9°	2,70	3,05
4	10°	3,23	3,56
5	1°	3,18	2,95
6	9°	3,39	3,25
6	10°	3,35	3,02
7	2°	2,87	3,96
7	3°	3,16	2,83
7	10°	3,46	3,24
8	1°	3,80	3,04
8	3°	3,54	3,81
8	5°	3,37	3,45
8	6°	3,31	2,66
8	8°	2,95	2,97
8	10°	3,17	3,65
9	9°	3,07	3,08
9	10°	3,33	3,59
10	7°	3,27	3,19
10	10°	3,99	3,46

Para o pró-fármaco ***4***, dentre os confôrmeros analisados (Tabela VI), selecionou-se o que apresentou distâncias de 2,64 Å entre o átomo 1 e o átomo 2, e de 3,28 Å entre o átomo 3 e o átomo 4 (Figura 37). Este confôrmero foi energeticamente mais favorável e com distâncias próximas àquelas descritas em literatura (KLUSÁK e*t al*.,2009; HARDING, 2001).

Tabela VI. Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 4

Ancoramento	Posição no *ranking*	Distância (Å) do átomo 1 em relação ao átomo 2	Distância (Å) do átomo 3 em relação ao átomo 4
1	7°	3,06	3,92
2	3°	3,18	3,22
3	3°	3,43	3,60
3	5°	3,96	3,31
3	7°	3,77	3,79
4	8°	3,96	2,97
5	2°	3,73	3,98
5	5°	3,66	3,23
6	8°	3,90	3,57
7	4°	3,23	2,96
8	1°	2,64	3,28

Para o ***5,*** apenas dois confôrmeros gerados obedeceram às distâncias previamente estabelecidas (Tabela VII). O escolhido (Figura 37), com distância de 3,26 Å entre o átomo 1 e o átomo 2, e de 3,70 Å entre o átomo 3 e o 4, foi o que apresentou melhor posicionamento no *ranking*.

Tabela VII. Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 5

Ancoramento	Posição no *ranking*	Distância (Å) do átomo 1 em relação ao átomo 2	Distância (Å) do átomo 3 em relação ao átomo 4
1	4°	3,84	3,93
2	1°	3,26	3,70

Em relação ao ***6***, maior número de confôrmeros foi gerado (Tabela VIII). Entre eles, escolheu-se aquele com distância de 3,57 Å entre o átomo1 e o átomo 2 e de 2,89 Å entre o átomo 3 e o átomo 4. Este apresentou distâncias passíveis de clivagem e melhor ajuste em relação aos demais.

Tabela VIII. Resumo dos parâmetros utilizados na escolha do confôrmero para a estrutura do pró-fármaco 6

Ancoramento	Posição no *ranking*	Distância (Å) do átomo 1 em relação ao átomo 2	Distância (Å) do átomo 3 em relação ao átomo 4
1	2°	2,97	2,97
2	8°	3,77	2,93
3	1°	3,93	3,52
3	3°	3,08	2,88
3	6°	3,86	3,35
3	9°	3,27	2,87
4	5°	2,92	2,60
4	6°	3,71	2,90
4	7°	3,72	3,36
4	8°	3,45	3,55
5	1°	3,48	2,95
5	2°	3,81	3,14
5	7°	3,98	3,66
6	2°	3,82	3,18
6	5°	3,58	3,73
7	1°	3,81	3,50
7	2°	3,83	3,20
7	5°	3,63	2,95
7	7°	3,25	2,92
8	1°	3,57	2,89
8	4°	3,78	3,00
8	8°	3,99	3,88
9	6°	3,84	3,10
9	8°	3,65	2,86
10	9°	3,50	2,86
10	10°	3,38	3,30

A partir do ancoramento dos pró-fármacos foi possível propor o modo de ligação dos mesmos ao sítio ativo da CPG_2. Estes confôrmeros foram então utilizados como *input* para as simulações de DM.

4.1.4.1. Dinâmica molecular dos pró-fármacos

As simulações de DM empregadas para os pró-fármacos foram processadas seguindo-se a mesma metodologia utilizada para o MTX. Todos os complexos apresentaram perfis conformacionais parecidos, entre si, para cada uma das temperaturas estudadas (Figuras 38 a 43).

As tabelas com as energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima dos complexos pró-fármacos–CPG_2 são apresentadas em seguida aos gráficos de DM e seguem a seguinte legenda:

* Eest = energia de deformação axial ou estiramento; Eang = energia de deformação angular; Etors = energia torsional; E1,4 = energia de interação do tipo 1-4 ou Lennard-Jones; EvdW = energia de van der Waals; Eel = energia eletrostática; INTERV+C=soma das contribuições de energia eletrostática e de van der Waals intermoleculares; Esolv = energia de solvatação; EHb = energia de ligação de hidrogênio; Etot = energia total (potencial), corresponde à soma de todas as contribuições de energia.

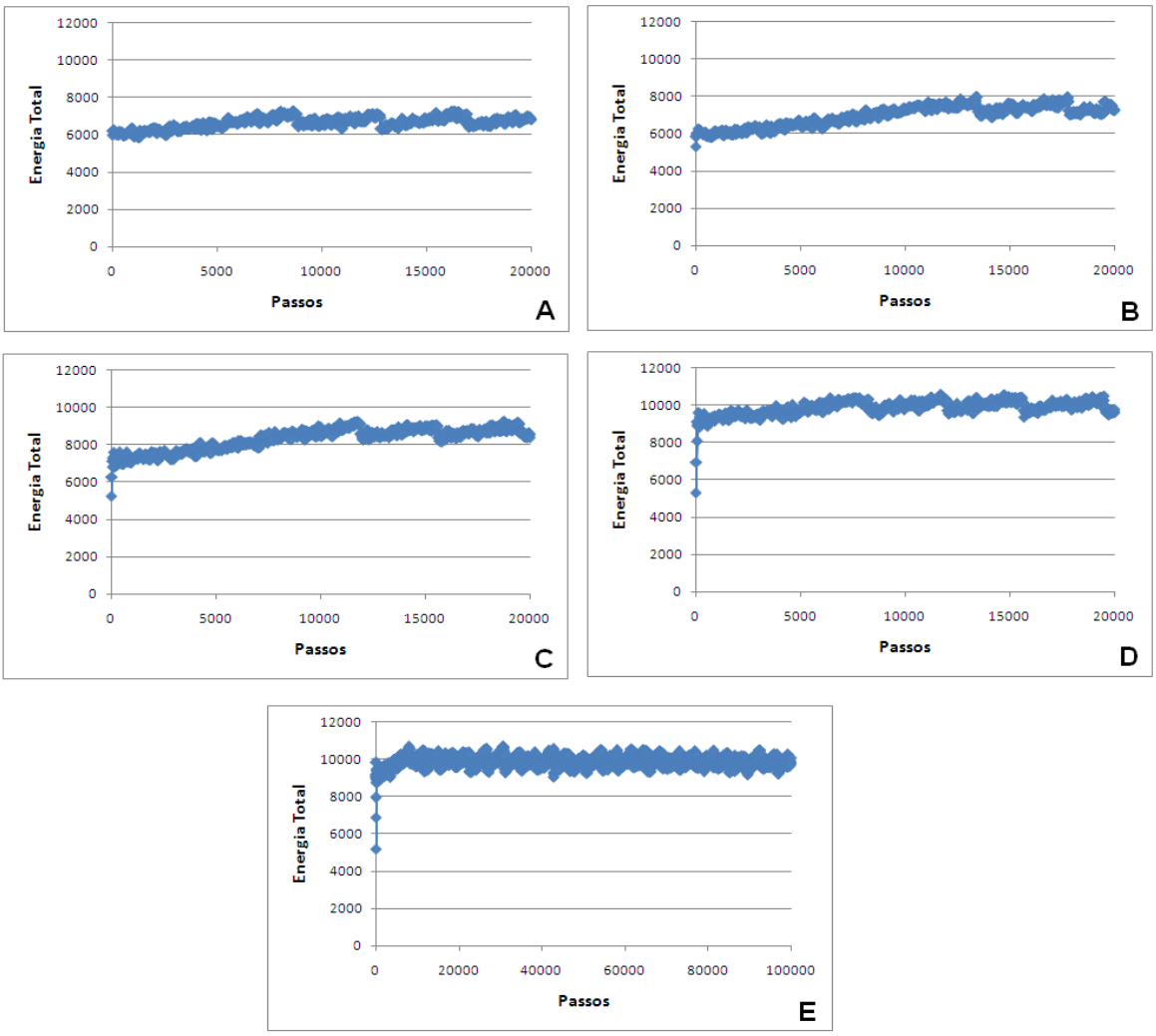


Figura 38. Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2- pró-fármaco **1** versus tempo . Simulação do complexo a 50 K (A), 100 K (B), 200 K(C), 300 K (D), 298 K(E).

Tabela IX. Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2-pró-fármaco ***1***

Valores de Energia (Kcal/mol)										
TEMPERATURA (k)	**Eest**	**Eang**	**Etors**	**E1,4**	**EvdW**	**Eel**	**INTERV+C**	**Esolv**	**Ehb**	**Etot**
50	2918,1	2737,7	2693,2	8684,2	-2276,2	-8711,5	582,4	-844,9	-56894,7	-51111,8
100	3098,8	3012,0	2759,4	8722,5	-2204,6	-8805,3	586,0	-793,9	-57180,0	-50805,2
200	3621,2	3585,0	2916,8	8904,9	-2092,9	-8863,5	584,4	-647,4	-57308,2	-49299,9
300	3996,0	3986,8	3009,7	8983,3	-1938,2	-8909,9	575,2	-699,5	-56061,3	-47058,1
298	4069,4	4150,4	2969,3	8929,8	-2066,5	-9259,6	570,2	-586,0	-57.559,0	-48782,0

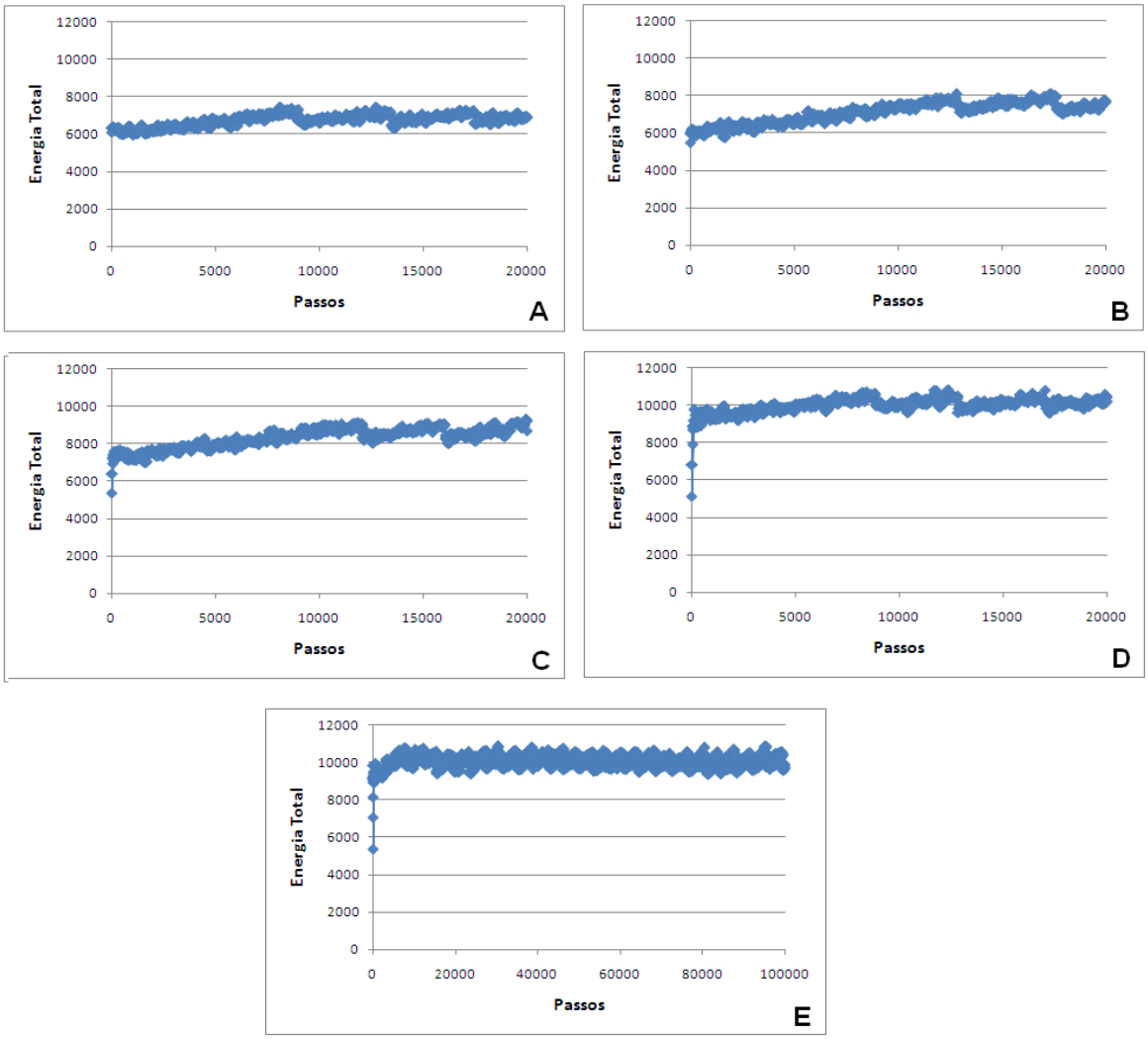


Figura 39. Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2–pró-fármaco ***2*** versus tempo. Simulação do complexo a 50 K (A), 100 K (B), 200 K(C), 300 K (D), 298 K(E).

Tabela X. Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2-pró-fármaco ***2***

Valores de Energia (Kcal/mol)										
TEMPERATURA (k)	**Eest**	**Eang**	**Etors**	**E1,4**	**EvdW**	**Eel**	**INTERV+C**	**Esolv**	**Ehb**	**Etot**
50	2926,9	2757,8	2731,7	8672,1	-2287,1	-8827,6	592,1	-787,3	-58120,2	-52341,4
100	3089,9	2971,6	2765,3	8712,6	-2235,8	-8691,7	594,5	-736,2	-57742,0	-51271,9
200	3522,7	3547,4	2888,2	8852,9	-2115,7	-8666,9	582,7	-702,8	-57471,0	-49562,4
300	4091,9	4113,8	3012,3	8964,7	-2024,9	-8876,7	579,8	-601,8	-57329,2	-48069,7
298	4124,5	4045,3	2912,9	8931,5	-2054,6	-9354,2	571,18	-696,0	-57056,0	-48576,0

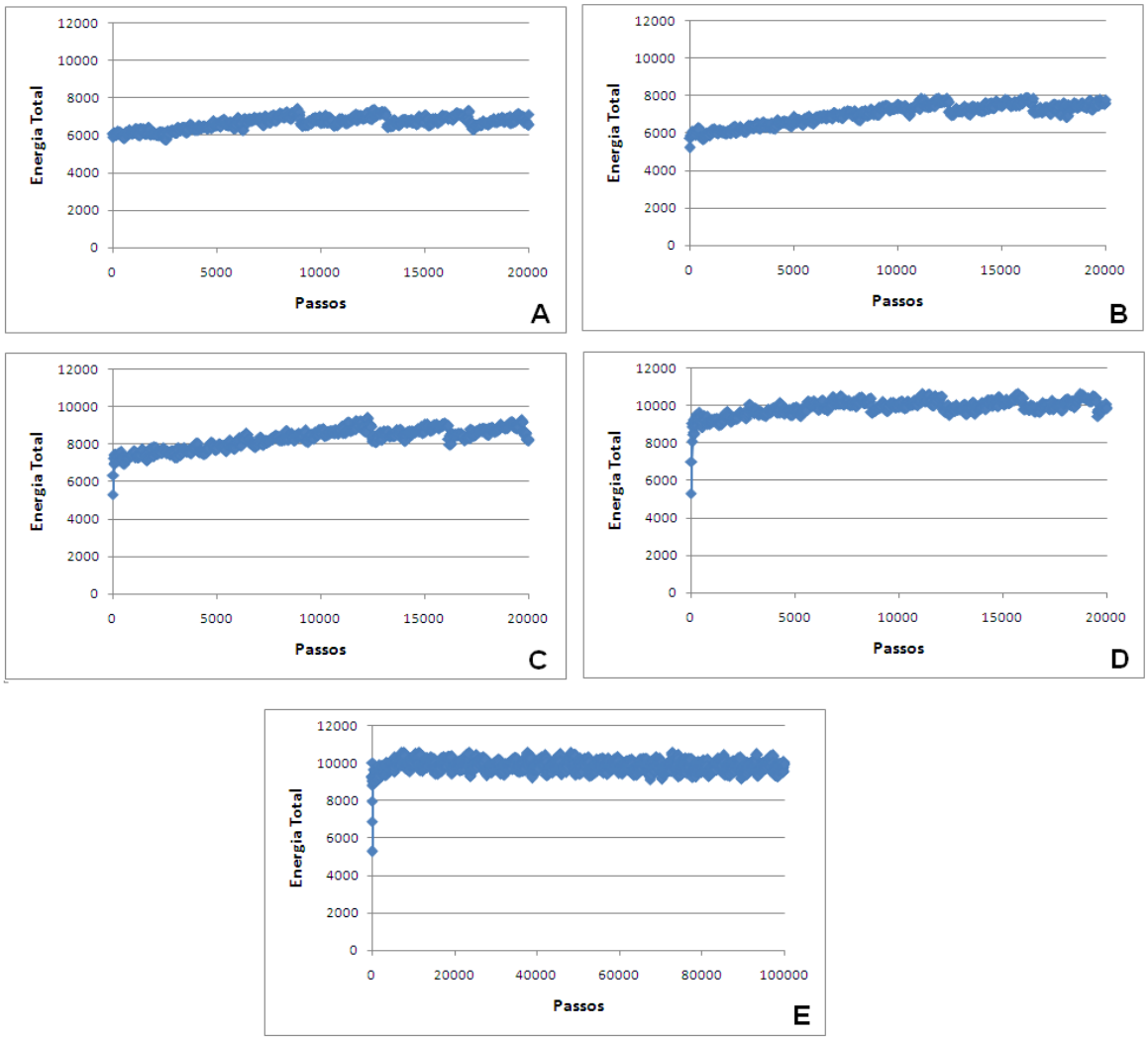


Figura 40. Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2-pró-fármaco ***3*** versus tempo. Simulação do complexo a 50 K (A), 100 K (B), 200 K(C), 300 K (D), 298 K(E).

Tabela XI. Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2-pró-fármaco ***3***

Valores de Energia (Kcal/mol)										
TEMPERATURA (k)	**Eest**	**Eang**	**Etors**	**E1,4**	**EvdW**	**Eel**	**INTERV+C**	**Esolv**	**Ehb**	**Etot**
50	2926,7	2817,7	2724,5	8705,4	-2285,4	-8805,7	618,6	-789,7	-57161	-51249,7
100	3160,7	3038,1	2797,4	8814,8	-2222,6	-8916,1	611,4	-718,3	-57150	-50585,2
200	3668,6	3619,2	2912,2	8873,9	-2132,0	-8959,7	609,1	-594,6	-57551,0	-49554,4
300	4219,9	4152,1	2982,2	8930,5	-2019,6	-9065,4	597,0	-645,4	-57413,9	-48262,6
298	4155,8	4058,4	2986,3	8981,2	-2053,3	-9305,7	548,8	-637,0	-57,949,0	-49214,0

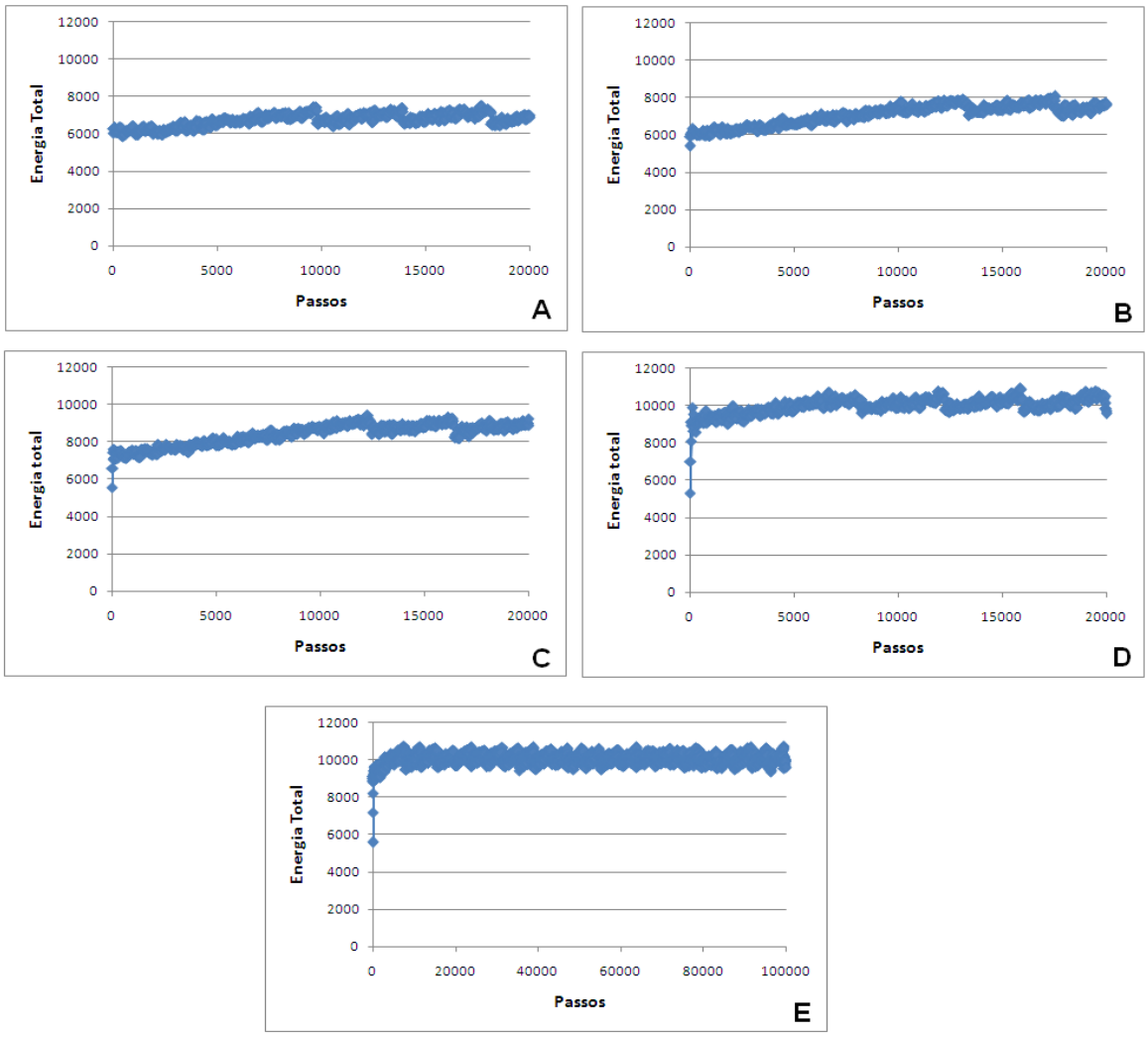


Figura 41. Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2-pró-fármaco ***4*** versus tempo. Simulação do complexo a 50 K (A), 100 K (B), 200 K(C), 300 K (D), 298 K(E).

Tabela XII. Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2–pró-fármaco ***4***

Valores de Energia (Kcal/mol)										
TEMPERATURA (k)	**Eest**	**Eang**	**Etors**	**E1,4**	**EvdW**	**Eel**	**INTERV+C**	**Esolv**	**Ehb**	**Etot**
50	2886,5	2699,7	2725,1	8681,9	-2290,7	-879,1	544,3	-818,1	-56902,4	-51267,9
100	3057,6	2954,7	2758,0	8765,9	-2274,7	-8825,4	562,2	-767,7	-56791,9	-50561,3
200	3692,6	3648,1	2901,5	8885,5	-2164,1	-8892,5	567,5	-600,2	-57701,1	-49662,6
300	4025,6	3942,9	3037,5	8940,7	-2036,3	-9053,9	521,8	-558,3	-57304,7	-48484,7
298	4062,7	4033,8	2973,7	8926,8	-2080,8	-9392,6	549,9	-590,0	-56841,0	-48358,0

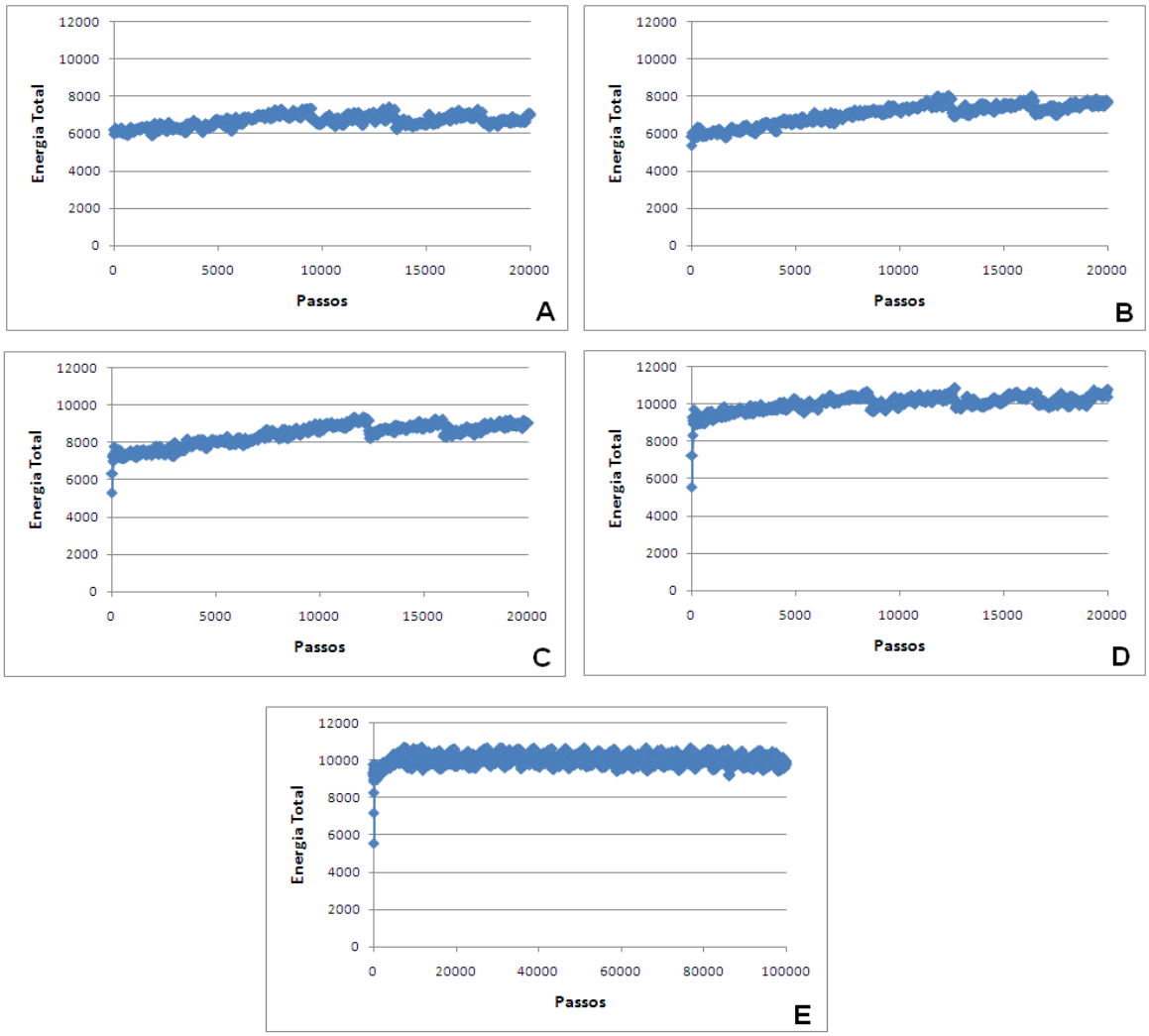


Figura 42. Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2-pró-fármaco ***5*** versus tempo. Simulação do complexo a 50 K (A), 100 K (B), 200 K(C), 300 K (D), 298 K(E).

Tabela XIII. Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2-pró-fármaco ***5***

	Valores de Energia (Kcal/mol)									
TEMPERATURA (k)	**Eest**	**Eang**	**Etors**	**E1,4**	**EvdW**	**Eel**	**INTERV+C**	**Esolv**	**Ehb**	**Etot**
50	2926,7	2817,4	2724,5	8705,4	-2285,4	-8805,7	618,6	-789,7	-57161,5	-51249,7
100	3160,7	3038,1	2797,0	8814,8	-2222,5	-8916,1	611,4	-718,3	-57150,3	-50585,2
200	3668,6	3619,2	2912,2	8873,9	-2132,0	-8959,7	609,1	-594,6	-57551,0	-49554,4
300	4219,9	4152,1	2982,2	8930,5	-2019,6	-9065,4	597,0	-645,4	-57413,9	-48262,6
298	4155,8	4058,4	2986,3	8981,2	-2053,3	-9305,7	548,8	-637,0	-57949,0	-49214,0

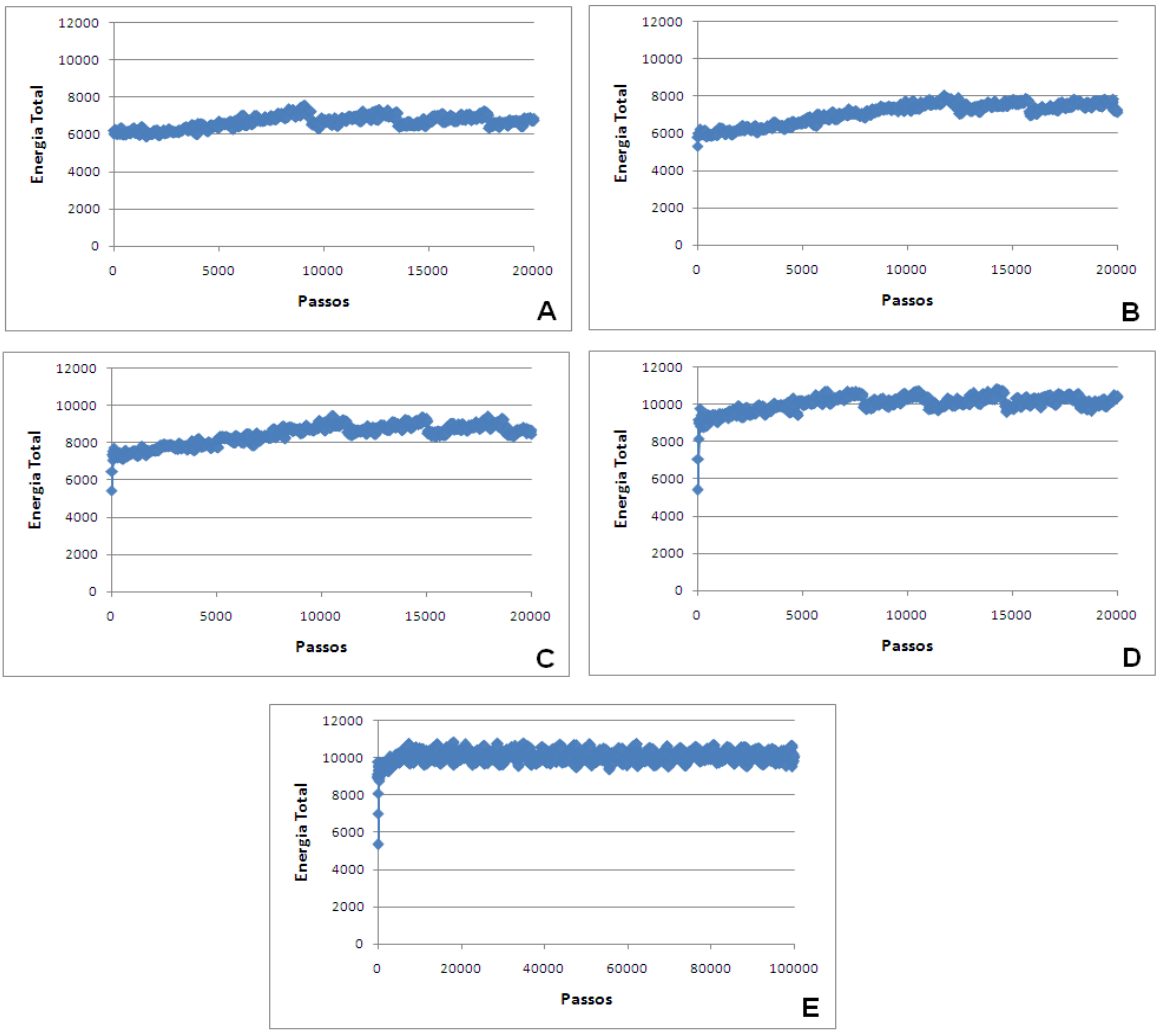


Figura 43. Gráfico de variação de energia do complexo CPG_2-pró-fármaco ***6*** versus tempo. Simulação do complexo a 50 K (A), 100 K (B), 200 K(C), 300 K (D), 298 K(E).

Tabela XIV. Valores de energias computadas nas simulações de DM para o confôrmero de energia mínima do complexo CPG_2-pró-fármaco ***6***

Valores de Energia (Kcal/mol)										
TEMPERATURA (k)	**Eest**	**Eang**	**Etors**	**E1,4**	**EvdW**	**Eel**	**INTERV+C**	**Esolv**	**Ehb**	**Etot**
50	2878,5	2812,3	2756,2	8638,4	-2283,8	-8715,7	515,5	-908,2	-57024,0	-51331,0
100	3055,5	3029,1	2812,9	8720,4	-2225,7	-8807,5	535,2	-862,9	-57051,7	-50794,9
200	3524,4	3567,4	2911,4	8809,4	-2143,2	-8767,4	519,7	-677,4	-57700,0	-49955,4
300	4071,1	4124,1	3020,3	8993,5	-1979,6	-9058,2	528,8	-622,7	-56153,9	-47076,7
298	4083,7	4007,4	2995,6	8921,6	-2040,5	-9350,4	507,0	-691,0	-56722,0	-48289,0

Como mostram todos os perfis, os complexos trabalhados, assim como o MTX, atingiram o equilíbrio gradativamente, tendo em vista que, apenas na dinâmica de 100 ps a 298 K, estabilizaram-se completamente. Da mesma forma que para o MTX, os valores de energia total para cada um dos confôrmeros de menor energia mínima, selecionados em cada simulação, foram computados (Tabelas IX a XIV) e a integridade estrutural dos mesmos foi avaliada em relação à sua estrutura cristalografada, a partir do RMSD.

Os resultados indicaram que, mesmo ao atingir 298 K, todos os modelos mantiveram sua integridade estrutural, conforme mostrado na Figura 44, sendo que em nenhuma das simulações os valores de desvio dos quadrados mínimos ultrapassaram, de forma significativa, 1,5 Å.

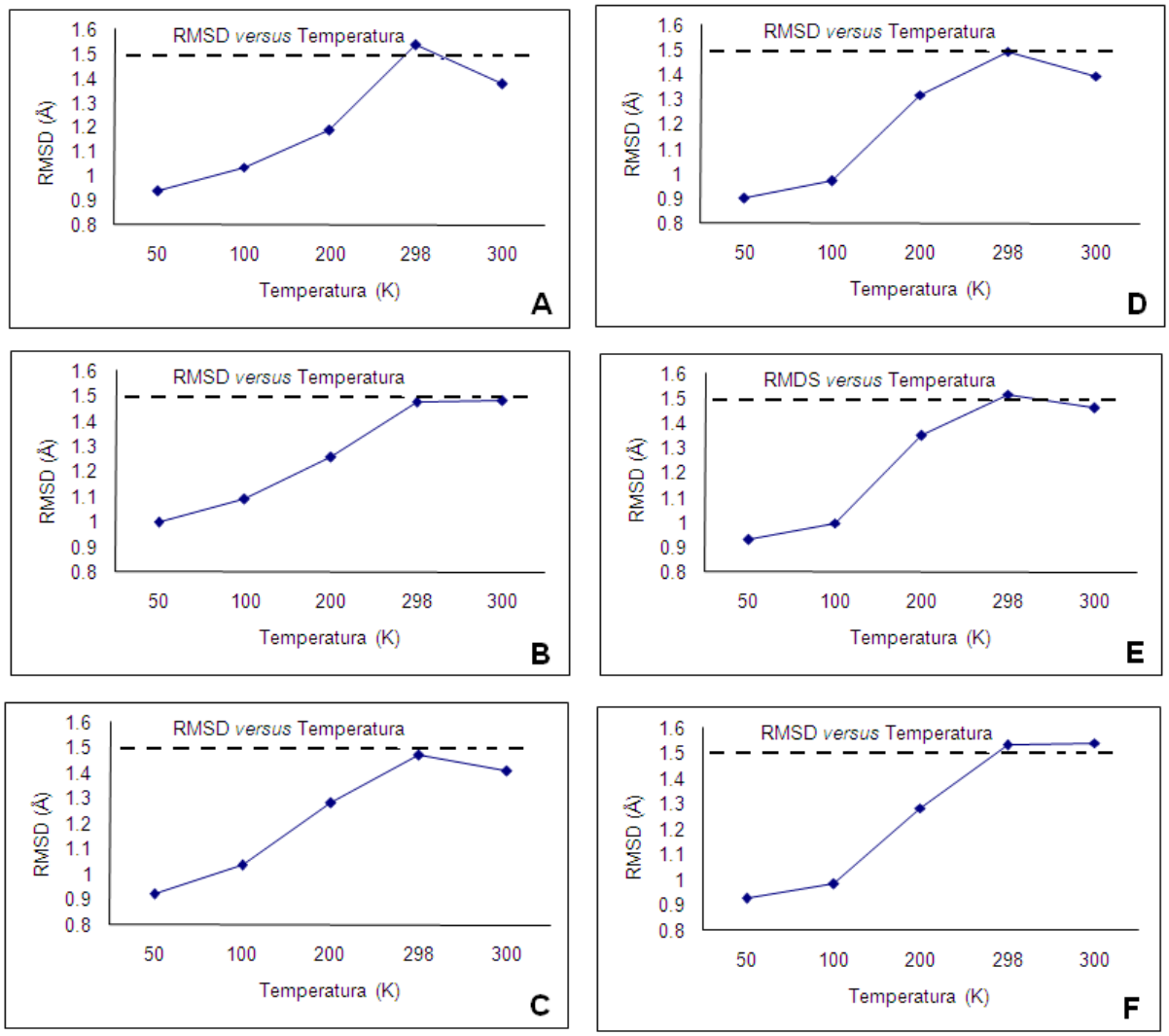


Figura 44. RMSD dos confôrmeros de menor energia mínima da proteína segundo a variação de temperatura para ao pró-fármacos ***1***(A), ***2*** (B), ***3*** (C), ***4***(D), ***5*** (E), ***6*** (F).

As simulações de DM dos pró-fármacos ***1***, ***2*** e **3**, com agente espaçante, indicaram que apesar destes se posicionarem de maneira similar ao MTX no sítio de ação da CPG_2, há perda de interações auxiliares para o processo de clivagem destas estruturas.

A presença do agente espaçante, o ácido succínico, tende a afastar significativamente a porção glutamato do sítio ativo (Figura 45).

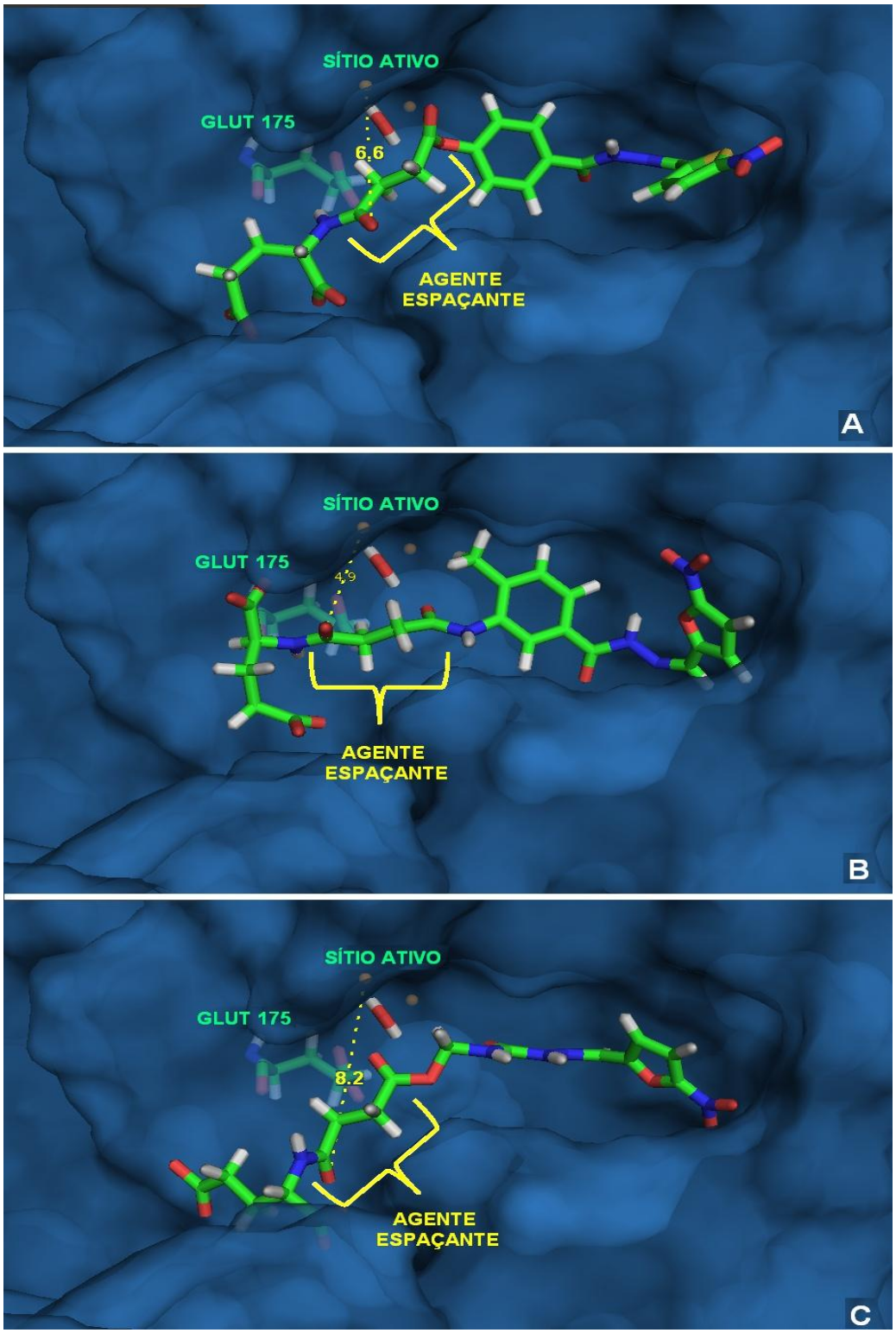


Figura 45. Pró-fármacos ***1*** (A), ***2*** (B) e ***3*** (C) no sítio ativo da CPG_2. A presença do agente espaçante afasta a porção glutamato do sítio catalítico. Átomos de carbono são representados em verde, nitrogênio em azul. Oxigênio em vermelho e os hidrogênios e branco. Os átomos de zinco do sítio catalítico estão representados como modelo bola-palito e na cor laranja. Modelo produzido no software *Pymol 1.1.*

Nos substratos da CPG_2 é a ligação amida com a porção glutamato destes compostos que dá a especificidade pela enzima. Como visto para o MTX, o carbono carbonílico desta ligação é o eletrófilo atacado pela molécula de água de adsorção enquanto o hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida interage com um GLU175 da proteína, que funciona como aceptor de prótons durante a catálise.

No caso destes pró-fármacos com agente espaçante ambas as interações são perdidas devido ao distanciamento evidenciado pelas DMs.

Ligações do tipo amida (pró-fármaco 2) ou éster (pró-fármacos 1 e 3) são colocadas próximas ao átomo de zinco e da molécula de água do sítio catalítico. Segundo Stauffer e Zeffren (1970), estes tipos de funções poderiam ser clivadas por peptidases, o que nos leva a crer que estas posições poderiam ser passíveis de ataque pela enzima.

Ainda assim, a especificidade dada pelo transportador seria perdida e, desta forma, o objetivo do projeto estaria comprometido. Optou-se, desta forma, pelo enfoque nos pró-fármacos construídos pela ligação direta com o transportador (sem agente espaçante), os quais acredita-se, funcionariam como substratos melhores desta enzima.

O pró-fármaco ***4***, assim como MTX, posiciona-se de forma a encaixar o anel tiofênico da estrutura no bolso P1 da CPG_2. Este encaixe é favorecido devido à formação de ligações de hidrogênio entre o grupo nitro ligado a este anel e os aminoácidos Treonina 213 (THR 213) e Treonina 361 (THR 361) (Figura 46).

A porção glutamato, orientada para a parte externa da proteína, interage com o resíduo ARG 324 por um de seus carboxilatos. O átomo de hidrogênio da amida desta porção interage com o resíduo GLUT 176.

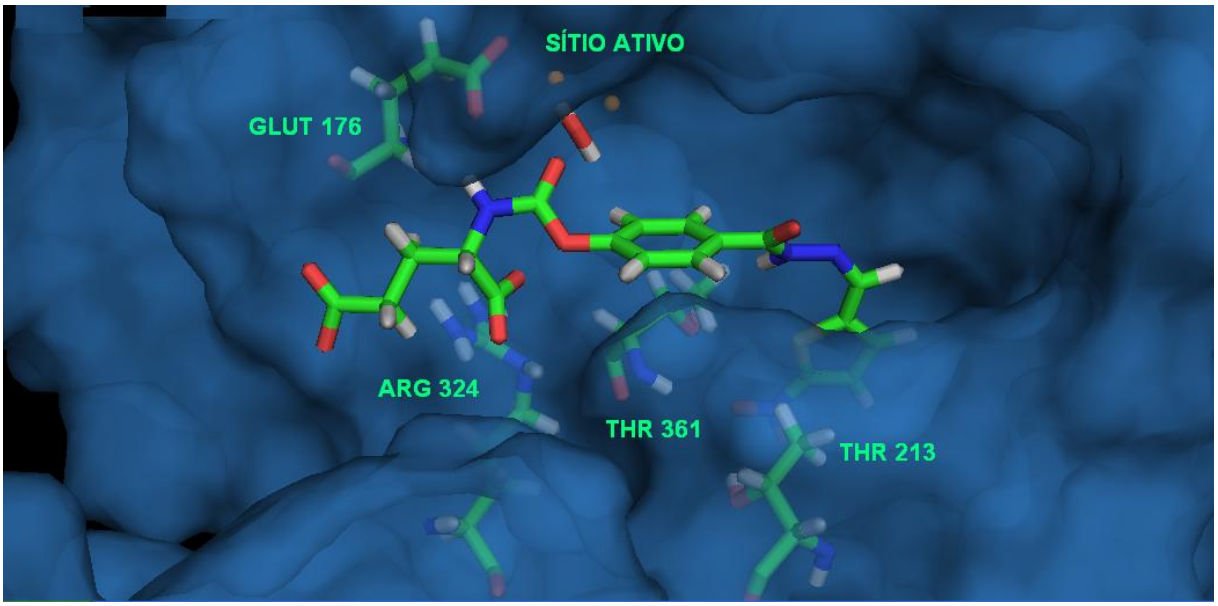


Figura 46. Representação do pró-fármaco ***4*** no sítio ativo da CPG_2 após simulações de DM. Átomos de carbono são representados em verde, nitrogênio em azul. Oxigênio em vermelho e os hidrogênios e branco. Os átomos de zinco do sítio catalítico estão representados como modelo bola-palito e na cor laranja. Modelo produzido no software *Pymol 1.1.*

A literatura descreve o GLUT 175 como possível ponto de interação da enzima com o substrato. Neste caso, contudo, a análise dos resultados mostra que o GLUT 176, vizinho ao GLUT 175, parece estar envolvido nas mesmas interações de hidrogênio que auxiliariam no processo catalítico da enzima.

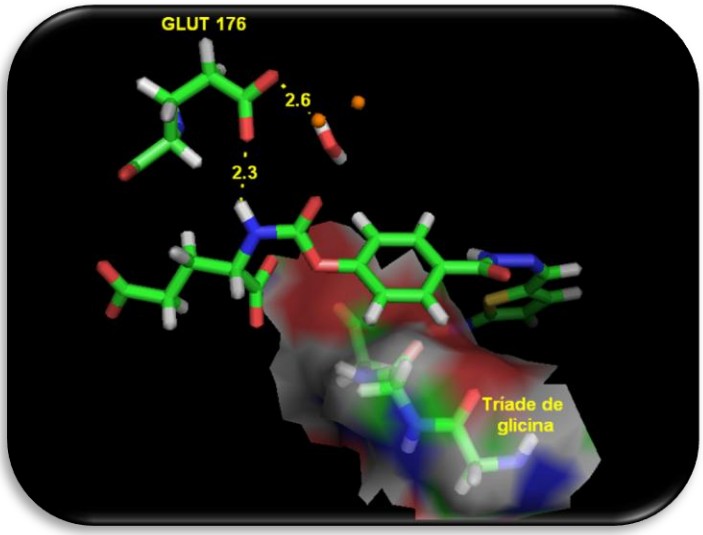


Figura 47. Possível interação entre o carboxilato do resíduo GLUT 176 da CPG_2 com o hidrogênio da amida do substrato. Os átomos de carbonos estão representados em verde, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, hidrogênio em branco e zinco em laranja (*Pymol 1.1).*

Levando em consideração que o processo de reconhecimento e clivagem do substrato ocorreria de forma dinâmica, conclui-se que estas interações poderiam ser realizadas por ambos os aminoácidos (GLUT 175 e 176).

As simulações de DM do pró-fármaco **5** indicaram que, apesar desta estrutura posicionar-se da mesma maneira similar ao MTX no sítio ativo da CPG_2, não há acomodação de seu anel furânico no bolso P1. Este posicionamento ocorre devido à formação de ligações de hidrogênios entre o grupo nitro ligado a este anel com resíduos que se localizam ao redor deste bolso: tirosina 384 (TYR 384), treonina 202 (THR 202) e serina 203 (SER 203). A porção glutamato, por sua vez, interage com os resíduos ARG 324 e HIS 385 (Figura 48).

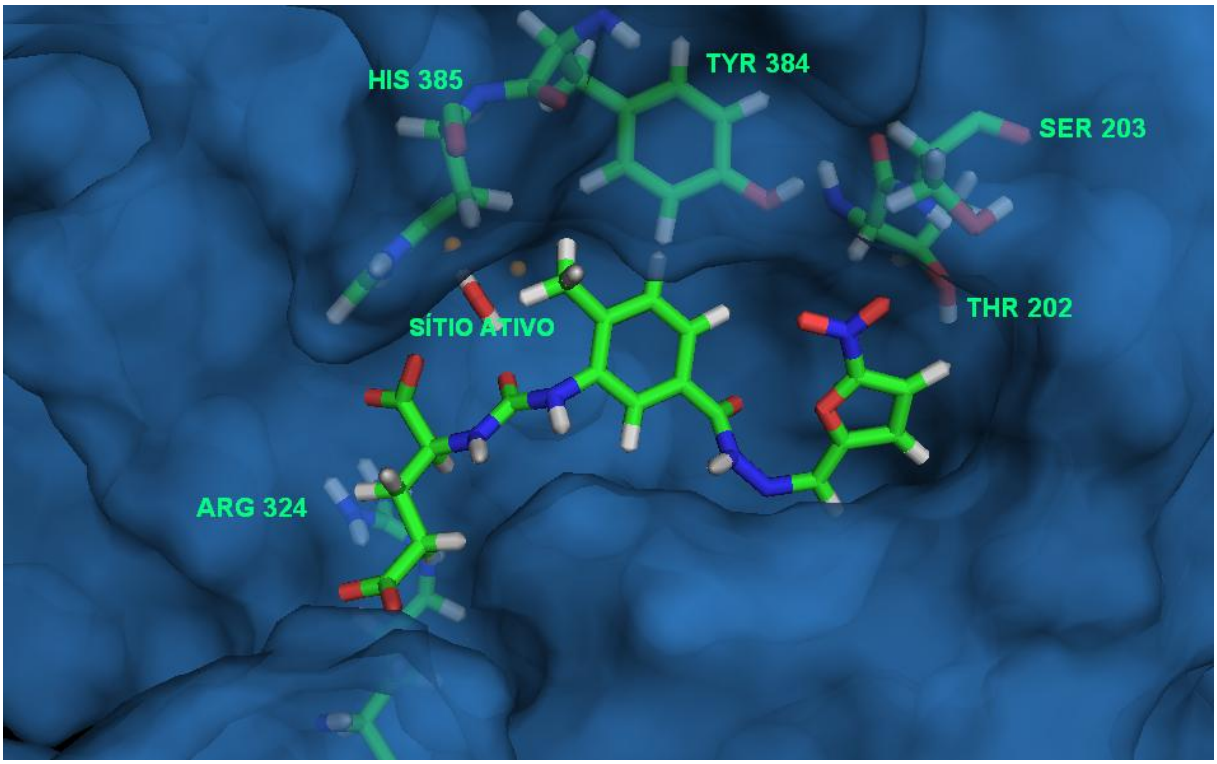


Figura 48. Representação do pró-fármaco ***5*** no sítio ativo da CPG_2 após simulações de DM. Átomos de carbono são representados em verde, nitrogênio em azul. Oxigênio em vermelho e os hidrogênios e branco. Os átomos de zinco do sítio catalítico estão representados como modelo bola-palito e na cor laranja. Modelo produzido no software *Pymol 1.1.*

O hidrogênio da porção amida encontra-se a uma distância de 5,0 Å do oxigênio carboxílico do resíduo GLUT 175 que, provavelmente, atuaria como aceptor de próton no processo de catálise (Figura 49). Neste caso o anel aromático manteve-se sobre a tríade de glicina.

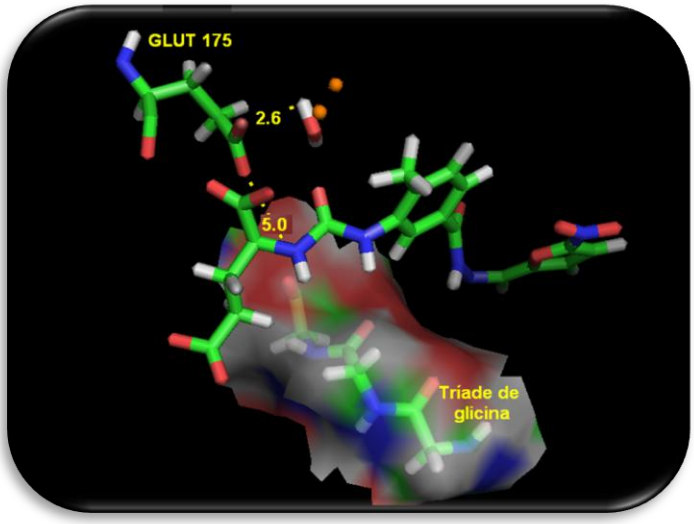


Figura 49. Possível interação entre o oxigênio do resíduo GLUT 175 da CPG_2 com o hidrogênio amídico do substrato. Os átomos de carbonos estão representados em verde, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, hidrogênio em branco e zinco em laranja (*Pymol 1.1).*

Já o pró-fármaco ***6***, encaixa-se de forma a acomodar o anel furânico no bolso P1 da CPG_2, o qual interage, por ligações de hidrogênio, com os aminoácidos treonina 361 (THR 361) e treonina 213 (THR 213) por intermédio do grupo nitro e do oxigênio furânico. Os carboxilatos da porção glutamato, orientados para a outra extremidade do sítio ativo, interagem com o aminoácido ARG 324, GLY 360 e histidina 385 (HIS 385) (Figura 50). O nitrogênio da amida, por sua vez, interage com resíduo GLY 360.

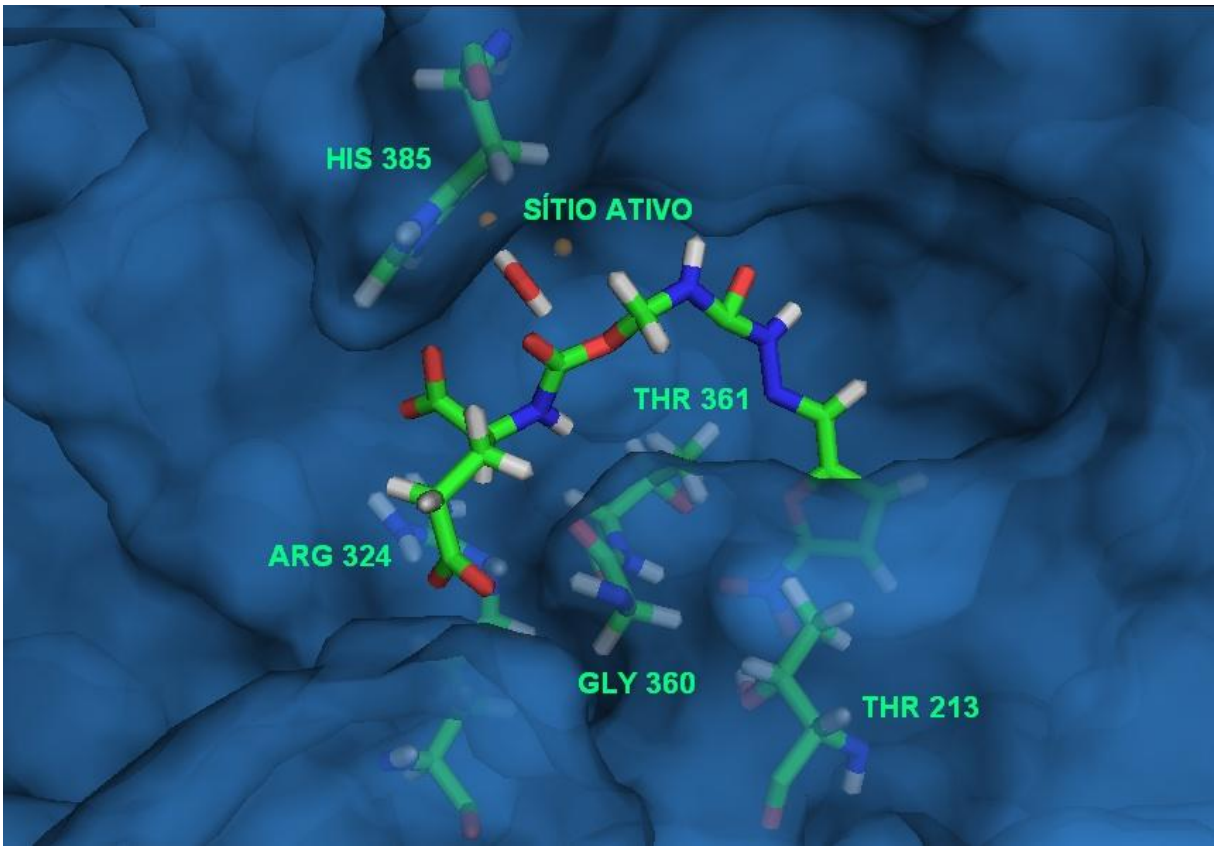


Figura 50. Representação do pró-fármaco ***6*** no sítio ativo da CPG_2 após simulações de DM. Átomos de carbono são representados em verde, nitrogênio em azul. Oxigênio em vermelho e os hidrogênios e branco. Os átomos de zinco do sítio catalítico estão representados como modelo bola-palito e na cor laranja. Modelo produzido no software *Pymol 1.1.*

O resíduo GLUT 175 encontra-se à distância de 2,88 Å do hidrogênio da amida, permitindo, assim, que desempenhe sua provável função catalítica (Figura 51). Contudo a ausência de um anel aromático sobre a tríade de glicina, característica presente em todos os substratos desta enzima como, por exemplo, no metrotrexato, no ácido fólico e em substratos (KHAN *et a*l, 1999; DOWELL *et al*, 1996), poderia levar a menor seletividade pela CPG_2.

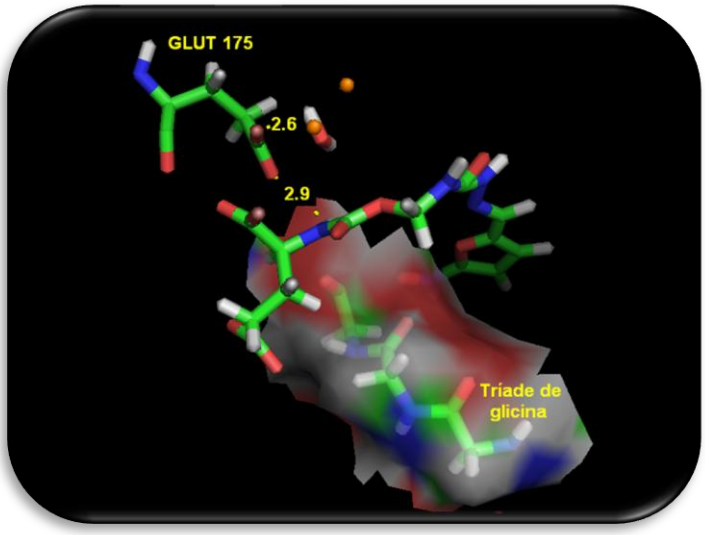


Figura 51. Possível interação entre o oxigênio do resíduo GLUT 175 da CPG_2 com o hidrogênio amídico do substrato.Os átomos de carbonos estão representados em verde, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, hidrogênio em branco e zinco em laranja (*Pymol 1.1).*

Por fim, vale comentar que, embora discutidos de forma particular para cada complexo analisado, o posicionamento dos anéis heterocíclicos ligados ao grupo nitro dos pró-fármacos parece variar mesmo entre os diferentes confôrmeros avaliados e que este pode ou não se acomodar no sítio P1 da enzima de acordo com as interações de hidrogênio passíveis de serem estabelecidas. Estas, por sua vez, variam conforme a dinâmica da molécula no sítio ativo da enzima.

4.2. SÍNTESE

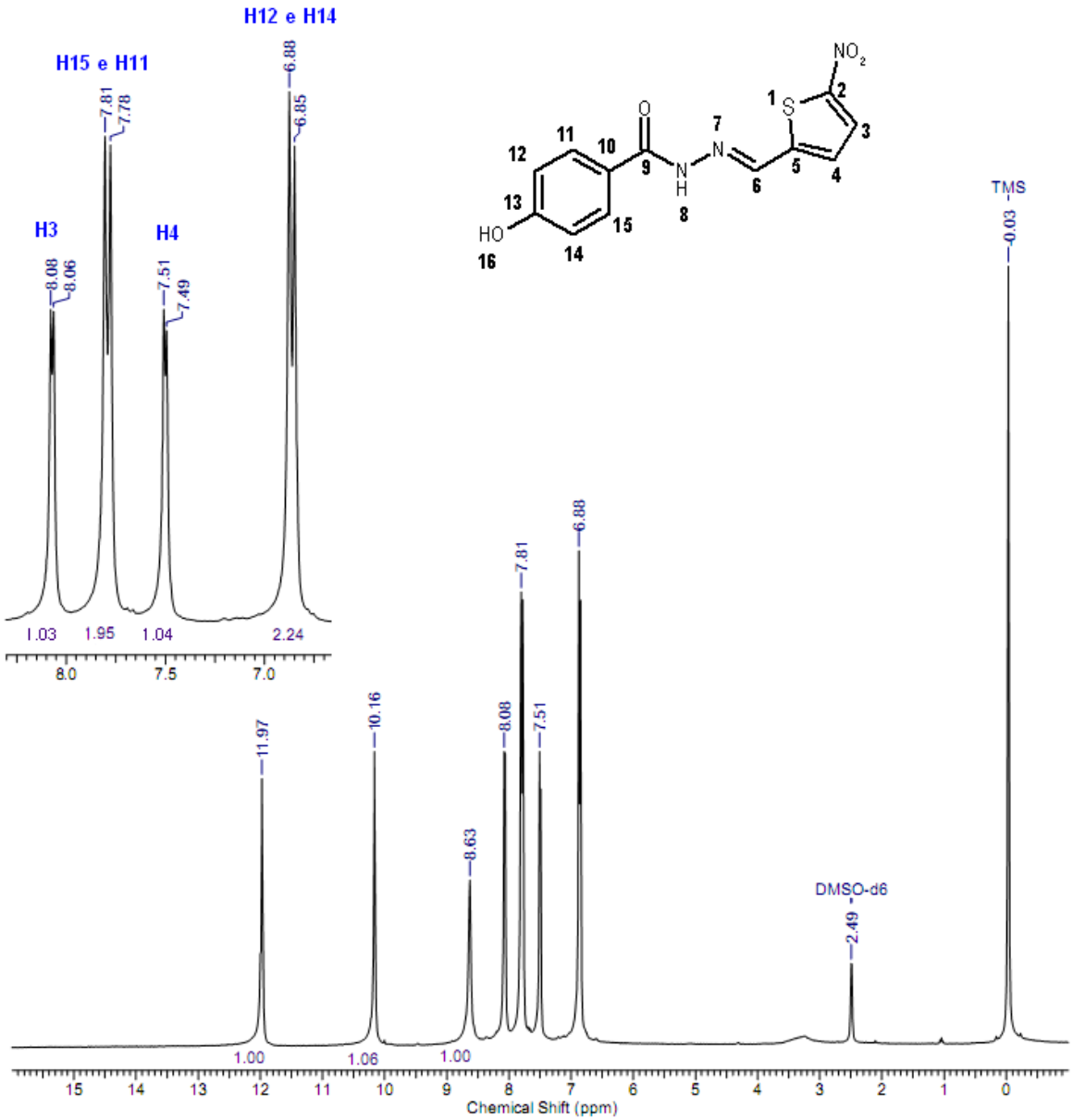
A princípio, a rota sintética proposta para a obtenção destes derivados partia do derivado mono ou dissubstituído do ácido benzóico, material de partida mais acessível comercial e economicamente, bem como o de estrutura mais simples quando se considera a retrossíntese destes análogos. A partir destes derivados, obter-se-iam os respectivos ésteres metílicos, por meio de esterificação clássica, os quais seriam, então, submetidos à reação com hidrato de hidrazina para obtenção de hidrazidas intermediárias. Estas benzidrazidas seriam, por fim, acopladas ao núcleo nitro heterocíclico (tiofênico no caso de ***1*** e furânico para ***2***) por meio de reação com os respectivos aldeídos nitrados (Esquema 1).

A etapa de esterificação, contudo, não foi necessária para ambos os derivados.

Para o composto ***1***, a 4-hidroxibenzidrazida foi gentilmente cedida pelos colaboradores do laboratório LAPEN do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e, portanto, a rota sintética constou, apenas, da reação de acoplamento desta benzidrazida ao 5-nitro-2-tiofeno carboxaldeído.

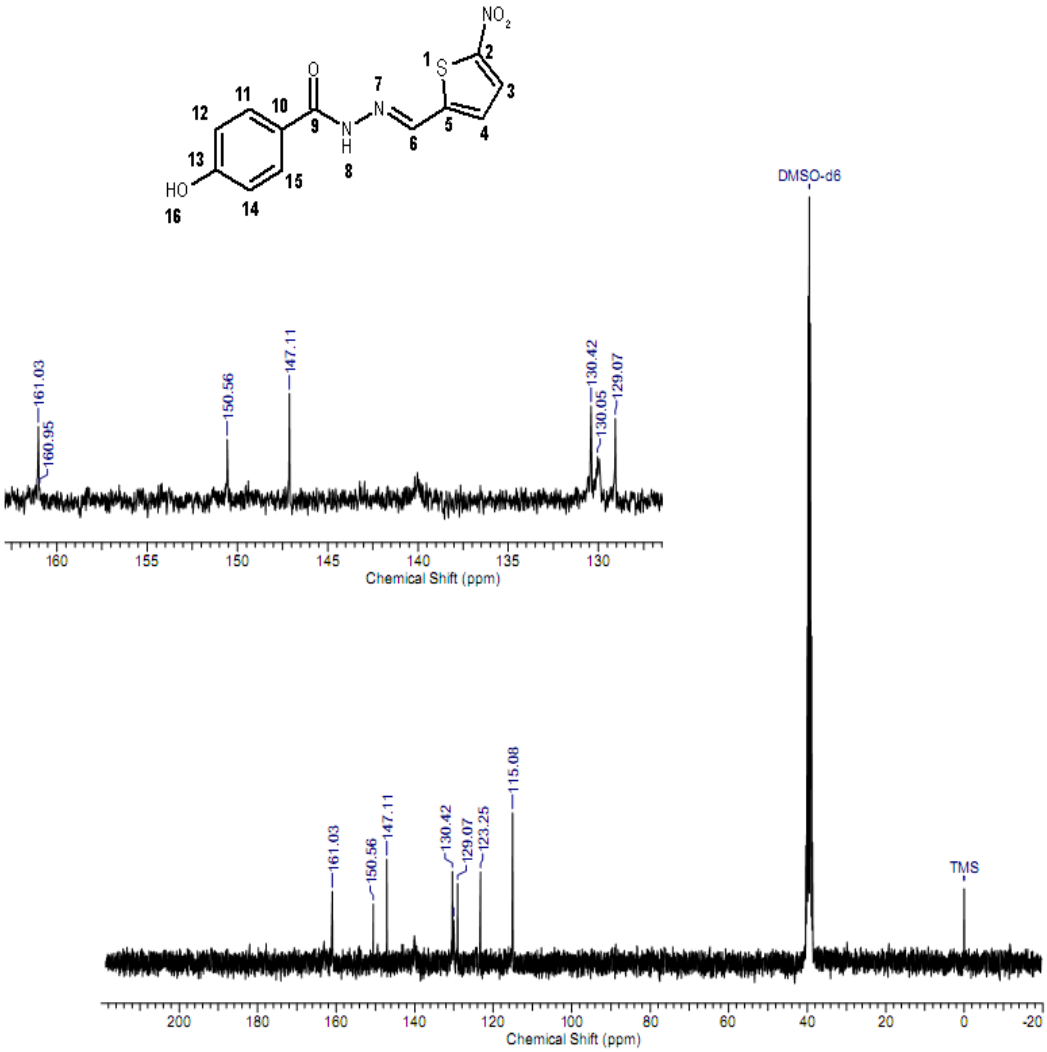
Esta reação ocorre rapidamente, sendo observada a formação do produto desejado após aproximadamente 30 minutos. Este é obtido como precipitado insolúvel em água e com alto grau de pureza, não havendo necessidade de qualquer método de purificação.

O composto foi caracterizado, após seco em bomba de alto vácuo, por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-^{1}H), carbono (RMN-^{13}C) e por espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV) (Espectros 1, 2 e 3, respectivamente).



Espectro 1. RMN-^{1}H do 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2-ilmetileno)benzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz).

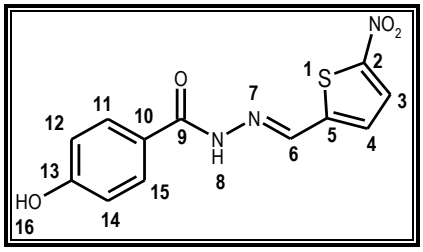
δ, ppm	Multiplicidade	Integral	Atribuição	J (Hz)
6,88	dubleto	2 H	H_{12} e H_{14}	8,43
7,51	dubleto	1 H	H_4	4,03
7,81	dubleto	2 H	H_{11} e H_{15}	8,43
8,08	dubleto	1 H	H_3	4,03
8,63	singleto	1 H	H_6	---
10,16	singleto	1 H	OH	---
11,97	singleto	1 H	H_8	---

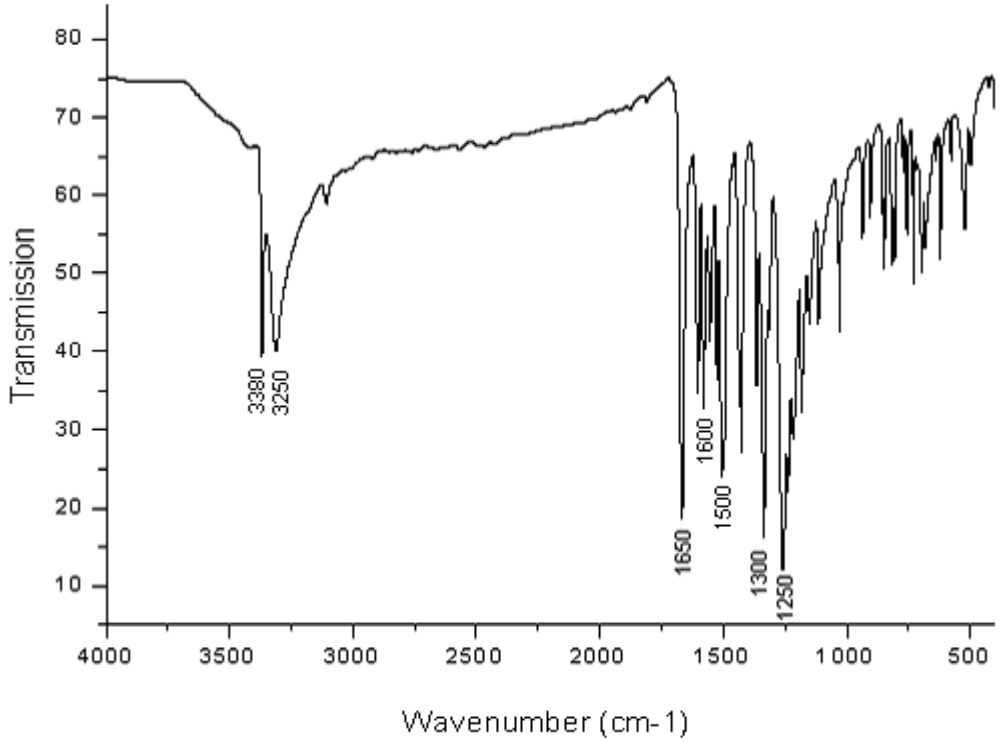


Espectro 2. RMN-^{13}C do 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2-ilmetileno)benzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz).

δ, ppm	Atribuição
115,08	C_{12} e C_{14}
123,25	C_4
129,07	C_{11} e C_{15}
130,05	C_{10}
130,42	C_3
140,04	C_2
147,11	C_6
150,56	C_5
160,95	C_{13}
161,03	C_9

Faixa de Fusão (°C)	250-252
Rendimento (%)	90





Espectro 3. Espectro de infravermelho do 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2ilmetileno)benzidrazida (KBr, 500-4000 cm^{-1}).

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
3380	ν OH fenólico
3250	ν NH amida
1650	ν C=O
1600	ν C=N
1500	ν NO assimétrico do NO_2
1438	ν CH do anel tiofênico
1300	ν NO simétrico do NO_2

Todos os deslocamentos químicos referentes a hidrogênios da estrutura do composto ***1*** são visualizados no espectro de RMN-^{1}H obtido. Os hidrogênios aromáticos simétricos H_{11} e H_{15}, por exemplo, correspondem ao dubleto em 7,81 ppm, indicando sua maior desproteção quando comparados aos hidrogênios simétricos H_{12} e H_{14}, que aparecem como dubleto em campo mais alto, 6,88 ppm. Esta maior desproteção nuclear ocorre devido à proximidade destes hidrogênios à carbonila hidrazídica, forte grupo retirador de elétrons. A constante de acoplamento de 8,43 Hz, aproximadamente, confirma estas atribuições. Os hidrogênios do anel heterocíclico são visualizados como dubletos de menor constante de acoplamento (J= 4,03) em 7,51 e 8,08 ppm para H_4 e H_3, respectivamente. Mesmo hidrogênios mais difíceis de serem visualizados como os da hidroxila fenólica (OH, 10,16 ppm) e do nitrogênio hidrazídico (NH, 11,97 ppm) estão presentes no espectro.

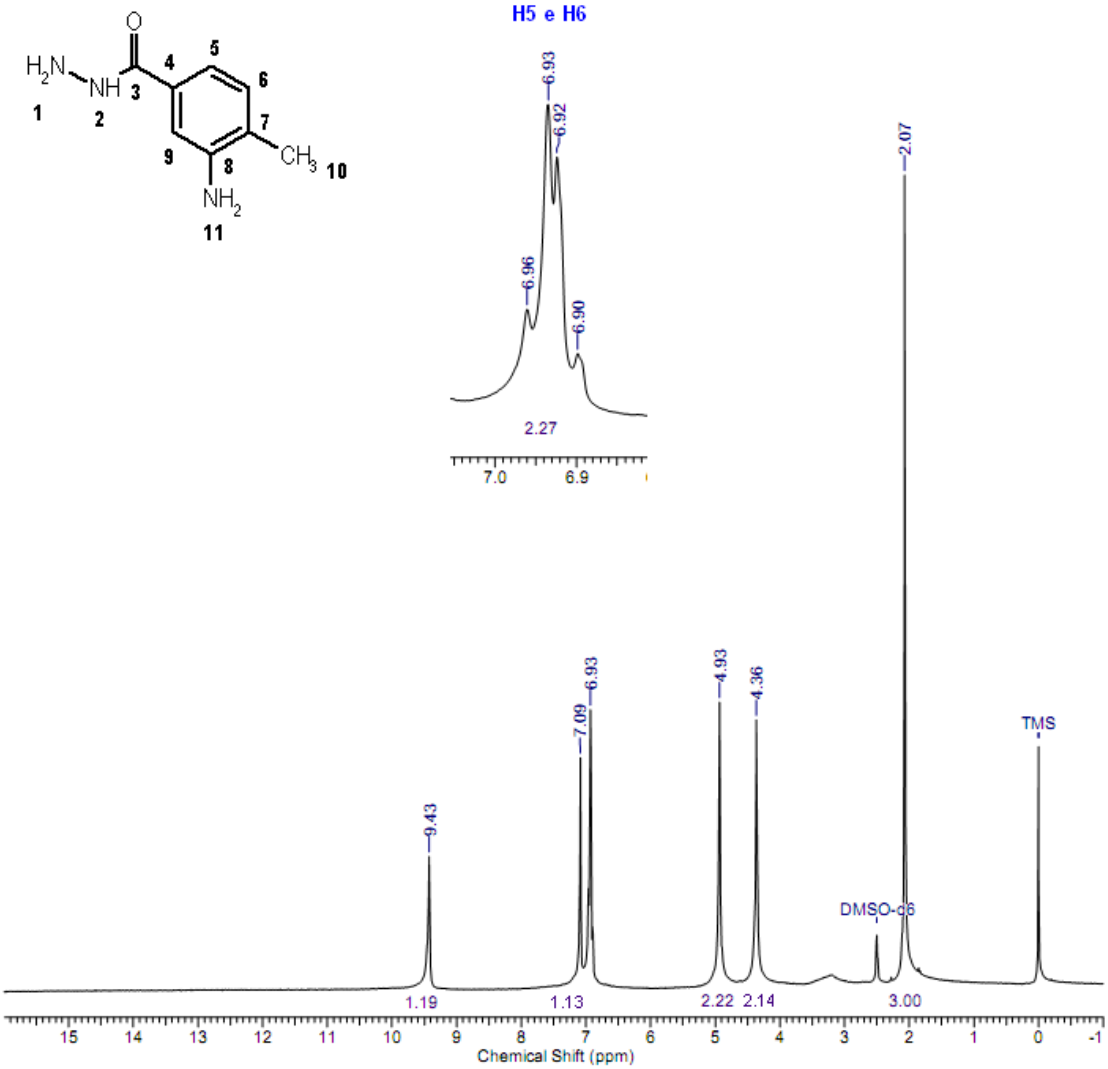
O espectro de RMN-^{13}C (Espectro 2) corrobora os achados do espectro de hidrogênio. Os carbonos aromáticos simétricos C_{12} e C_{14}, por exemplo, correspondem ao sinal em 115,05 ppm Já os carbonos simétricos C_{11} e C_{15} aparecem em campo mais baixo, 129,07 ppm, dada sua maior desproteção nuclear devido à proximidade destes carbonos à carbonila hidrazídica. Os carbonos do anel heterocíclico são visualizados em 123,25 ppm para C_4 e 130,42 ppm para C_3. Os deslocamentos em 140,04 e 150,56 ppm correspondem aos C_2 e C_5, respectivamente. Por fim, o carbono C_{10} apresenta-se como um sinal em δ 130,05 e o carbono C_9 em 161,03 ppm, como esperado para carbonos carbonílicos envolvidos em função hidrazida.

Já o espectro de infravermelho identifica a presença de grupos funcionais importantes como o grupo nitro (1500 e 1300 cm^{-1}), NH hidrazídico (3380 cm^{-1}) e a hidroxila fenólica (3250 cm^{-1}).

Os espectros de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e IV também atestam, ainda, a alta pureza do composto obtido, não sendo possível identificar sinais ou bandas estranhas às do composto desejado.

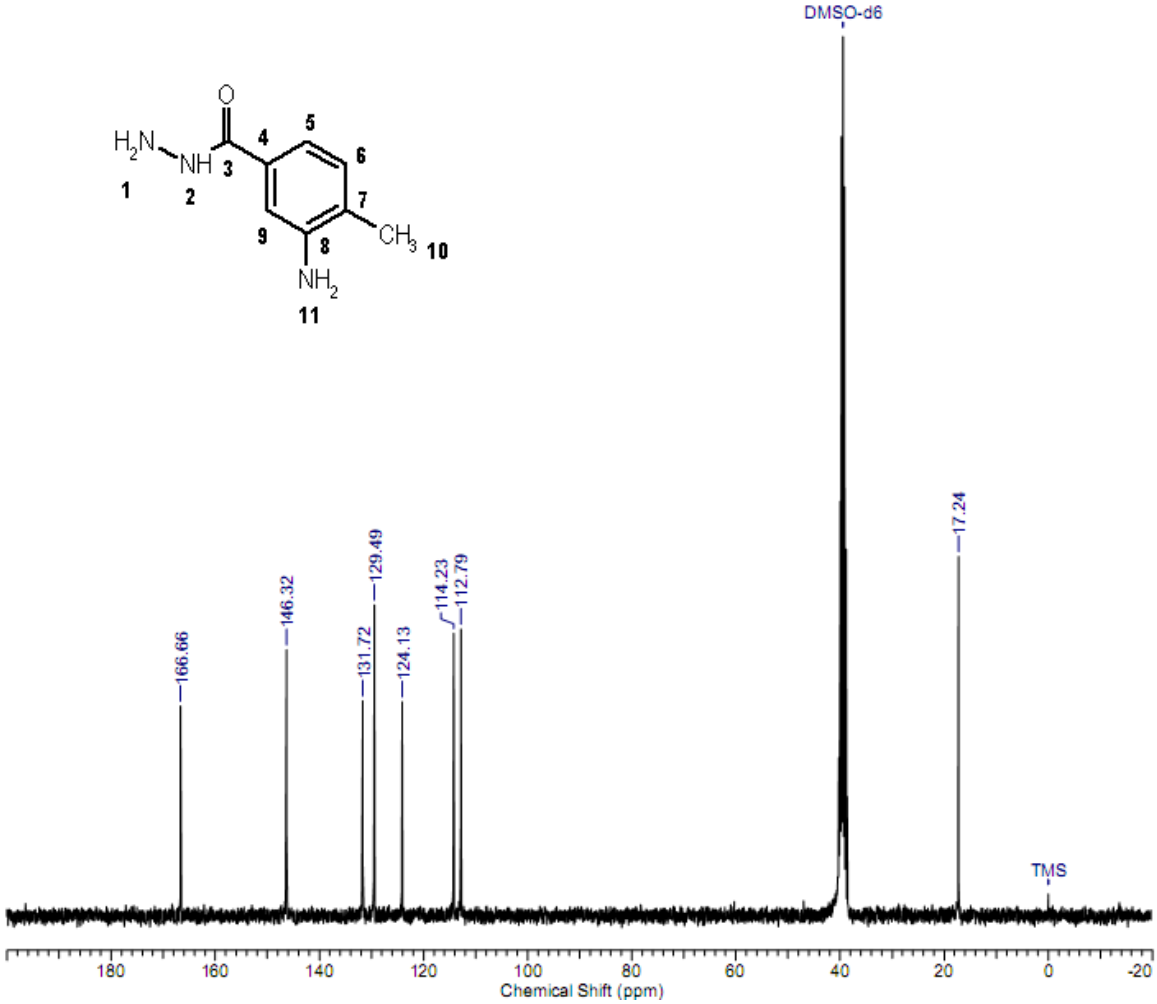
Para a obtenção do composto **2**, partimos da estrutura do éster metílico do ácido 3-amino-4-metilbenzóico, disponível comercialmente, portanto foram necessárias apenas 2 etapas sintéticas: uma etapa intermediária para a obtenção da benzidrazida e outra de acoplamento a seu respectivo aldeído nitrado que, neste caso, corresponde ao 5-nitro-2-furaldeído.

A etapa de obtenção da hidrazida ocorre a partir da reação de seu respectivo éster metílico com hidrato de hidrazina a 80% em meio aquoso, sob aquecimento e refluxo a 60 °C por 1 hora. O produto obtido, solúvel em água, é resfriado em banho de gelo e após sua precipitação, o sólido branco obtido é separado por filtração sob pressão reduzida. O composto, após seco em dessecador contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo, foi caracterizado por RMN-^{1}H e RMN-^{13}C.



Espectro 4. RMN-^{1}H da 3-amino-4-metilbenzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz).

δ, ppm	Multiplicidade	Integral	Atribuição
2,07	singleto	3 H	H_{10} (CH_3)
4,36	singleto	2 H	H_1 ($NH_{2\ hidrazida}$)
4,93	singleto	2 H	H_{11} ($NH_{2\ aromático}$)
6,90 – 6,96	multipleto	2 H	H_5 e H_6
7,09	singleto	1 H	H_9
9,43	singleto	1 H	H_2 (NH)



Espectro 5. RMN-^{13}C da 3-amino-4-metilbenzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz).

δ, ppm	Atribuição
17,24	C_{10}
112,79	C_4
114,23	C_5
124,13	C_7
129,49	C_6
131,72	C_9
146,32	C_8
166,66	C_3

Faixa de Fusão (°C)	130-132
Rendimento (%)	72

No espectro 4, é possível verificar os sinais correspondentes aos hidrogênios da estrutura da benzidrazida dissubstituída como, por exemplo, a presença dos singletos em 4,36 e 9,43 ppm que se referem aos hidrogênios H_1 e H_2 da função hidrazida.

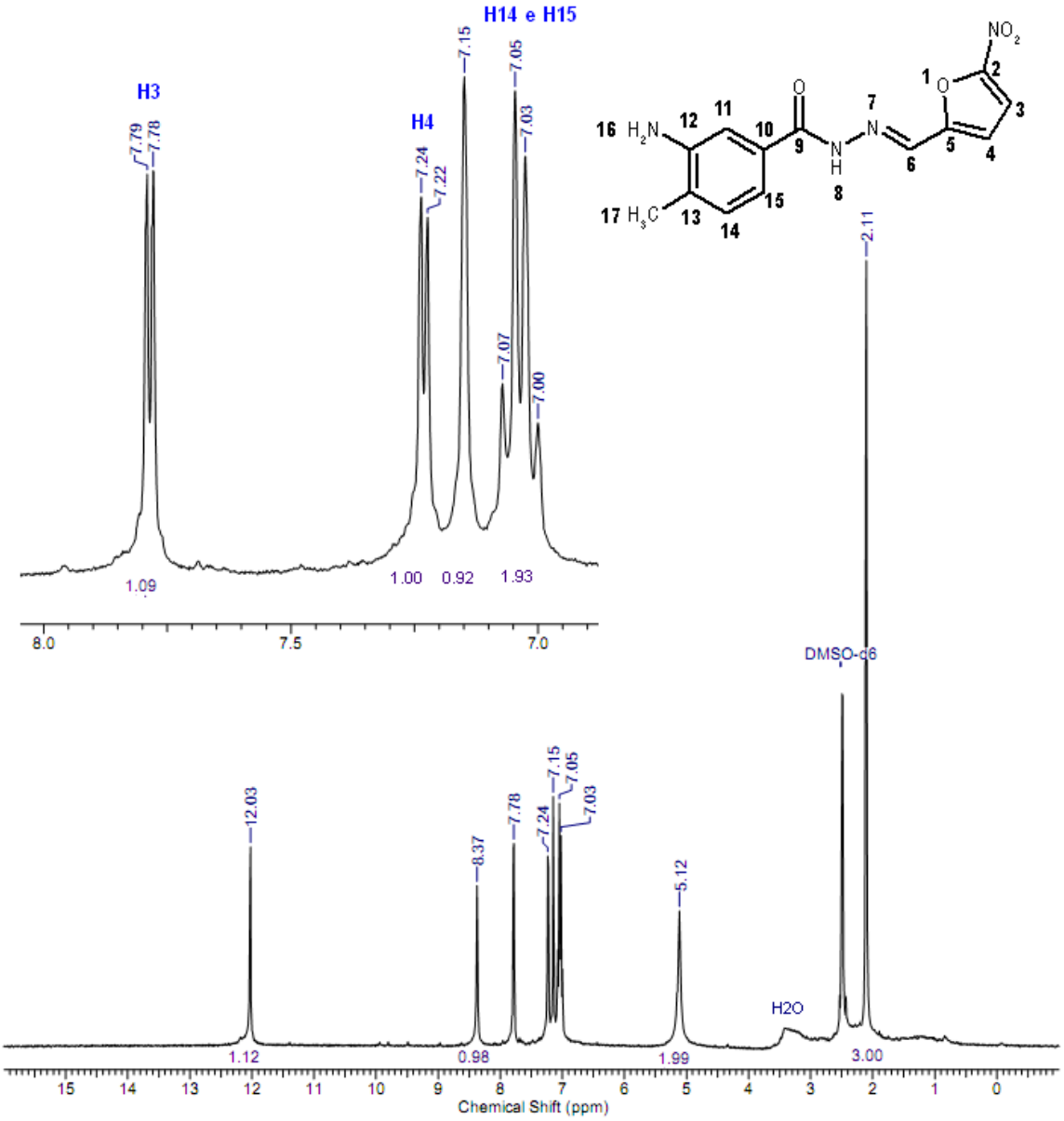
Os hidrogênios representados por singletos em 2,07 e 4,93 ppm correspondem à metila e à amina aromática, respectivamente. Já os prótons H_5 e H_6 do anel aromático são visualizados como um multipleto na região de 6,90 e 6,96 ppm (18,72 para J). Neste caso, não foi possível calcular a constante de acoplamento para estes hidrogênios.

O singleto referente ao H_9 do anel aromático apresenta deslocamento químico em campo mais baixo em relação aos outros hidrogênios aromáticos (H_5 e H_6), podendo ser visualizado em 7,09 ppm.

No espectro de RMN-^{13}C (Espectro 5) é possível observar deslocamentos químicos referentes a metila C_{10} em 17,24 ppm. Os sinais de ressonância relativos aos carbonos aromáticos C_5 e C_6 são visualizados em 114,23 e 129,49 ppm, respectivamente. Já os sinais em 131,72 e 124,13 ppm caracterizam os carbonos C_9 e C_7 do anel aromático. O sinal referente ao carbono C_4 aparece na região de 112,79 ppm e ao carbono C_8 em 146,32 ppm. O deslocamento em δ 166,66 corresponde ao carbono carbonílico C_3 e sua alta desproteção deve-se ao fato de ser parte de uma função hidrazida, que apresenta átomos fortemente retiradores de elétrons ligados diretamente ao carbono carbonílico em questão.. Uma vez caracterizada a benzidrazida dissubstituída, partiu–se para a reação de acoplamento com o nitro heterocíclico, etapa sintética rápida e fácil.

Adicionou-se a hidrazida ao 5-nitro-2-furaldeído, previamente solubilizado em solução alcoólica, em proporção equimolar, para formar o produto final ***2***. Em aproximadamente 30 minutos de reação foi possível observar a formação de um precipitado avermelhado, o qual é isolado por filtração a vácuo em funil de Büchner e seco em bomba de alto vácuo.

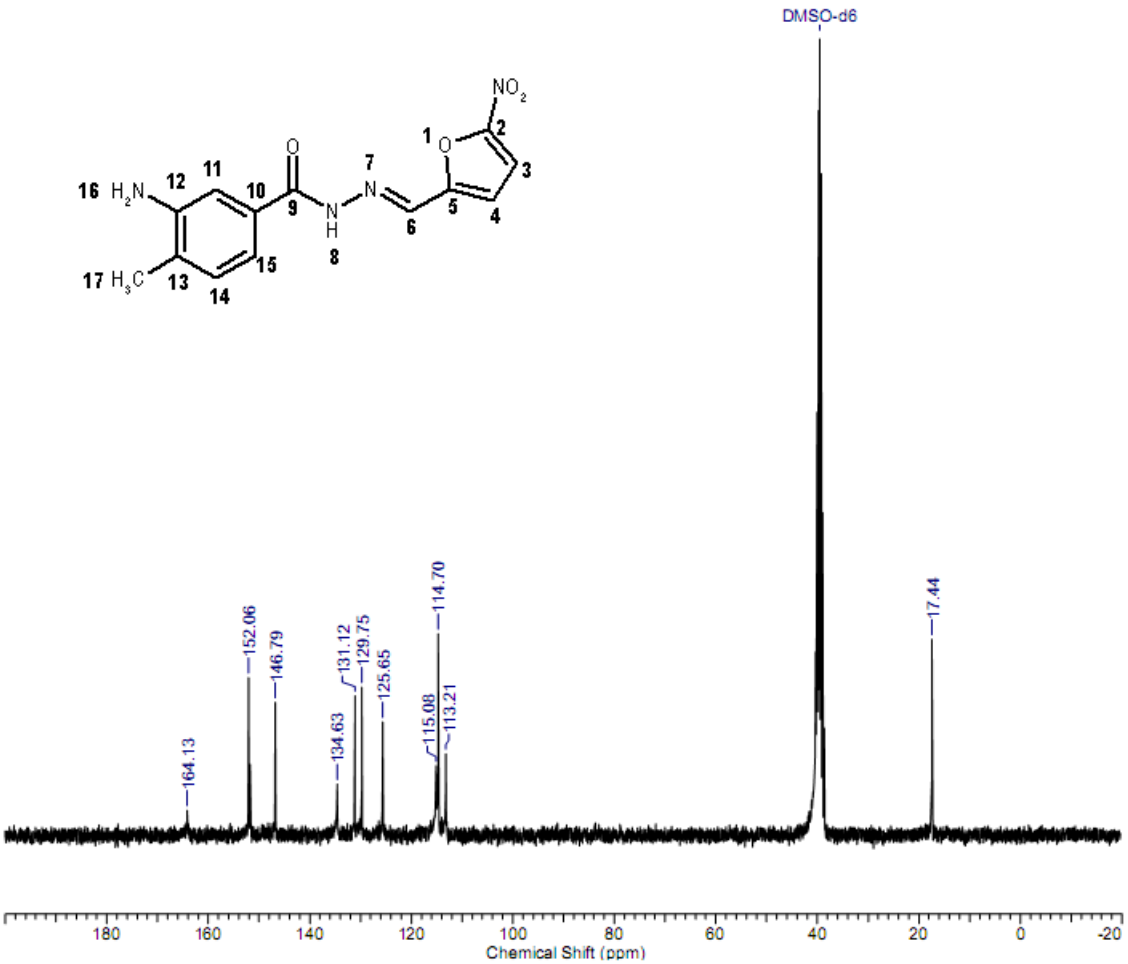
Os espectros de RMN-^{1}H e RMN-^{13}C deste produto apresentaram deslocamentos químicos que atestam a obtenção do composto ***2*** e seu alto grau de pureza.



Espectro 6. RMN-^{1}H da 3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz)

δ, ppm	Multiplicidade	Integral	Atribuição	J (Hz)
2,11	singleto	3 H	H_{17} (CH_3)	---
5,12	singleto	2 H	H_{16} (NH_2)	---
7,00-7,07	multipleto	2 H	H_{14} e H_{15}	---
7,15	singleto	1 H	H_{11}	---

7,24	dubleto	1 H	H_4	3,93
7,78	dubleto	1 H	H_3	3,93
8,37	singleto	1 H	H_6	---
12,03	singleto	1 H	NH_8	---



Espectro 7. RMN-^{13}C da 3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida (DMSO-d_6, 300 MHz).

δ, ppm	Atribuição
17,44	C17
113,21	C13 e C12
114,70	C11
115,08	C10
125,65	C14
129,75	C15
131,12	C6
134,63	C5
146,79	C3
151,78	C2
152,05	C4
164,13	C9

Faixa de Fusão (°C)	235-237
Rendimento (%)	85

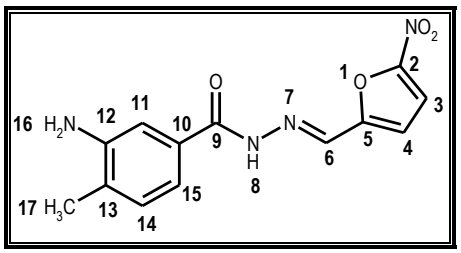
Os sinais de ressonância, relativos aos hidrogênios do anel heterocíclico, podem ser visualizados como dubletos em 7,24 e 7,78 ppm para H_4 e H_3, respectivamente. O sinal correspondente ao H_3 apresenta maior deslocamento químico, quando comparado ao H_4, devido à sua vizinhança com o grupo NO_2 que lhe proporciona maior desproteção nuclear.

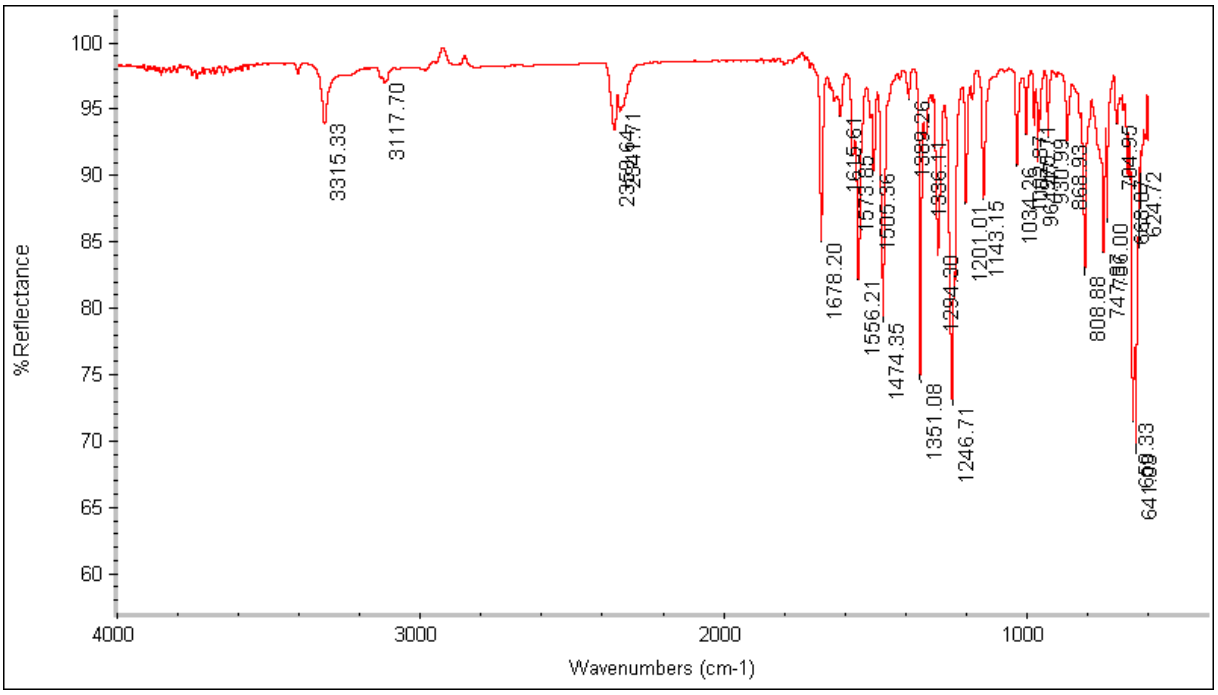
Os sinais dos hidrogênios aromáticos H_{14} e H_{15} aparecem como multipleto entre 7,00 e 7,07 ppm. Por outro lado, o singleto mais deslocado, em δ 7,15, caracteriza o H_{11} do anel aromático.

O hidrogênio H_8, correspondente ao hidrogênio da função hidrazida, aparece como um singleto em δ 12,03.

O espectro de RMN-^{13}C (Espectro 7) corrobora os achados do espectro de hidrogênio. Os deslocamentos químicos referentes aos carbonos C_4 e C_3 podem ser observados em 152,05 e 146,79 ppm, respectivamente. Já os sinais em δ 125,65 e 129,75 caracterizam os carbonos aromáticos C_{14} e C_{15}. O carbono carbonílico da função hidrazida, C_9, pode ser visualizado em 164,13 ppm e o sinal em δ 114,70 corresponde ao carbono aromático C_{11}.

No espectro de IV (Espectro 8), correspondente ao nitroderivado 4-hidroxi(5–nitrotiofen-2 ilmetileno)benzidrazida, foi possível identificar absorções relativas a estiramento de NH hidrazídico (3315 cm^{-1}), grupo nitro NO assimétrico e simétrico (1505 e 1336 cm^{-1}) e a amina aromática (3315 cm^{-1}).





Espectro 8. Espectro de infravermelho do 3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida (KBr, 500-4000 cm^{-1}).

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
3315	ν NH amina aromática
3117	ν NH amida
2359	ν CH Metila
1678	ν C=O
1615	ν C=N
1505	ν NO assimétrico do NO_2
1474	ν CH do anel tiofênico
1336	ν NO simétrico do NO_2

Uma vez obtidos os nitroderivados partiu-se, então, para a primeira etapa de obtenção dos pró-fármacos. Em um primeiro momento, reações para a ligação destes ao agente

espaçante, o ácido succínico, foram realizadas. Variações de condições como: temperatura, proporções de reagentes e presença e tipo de agentes acoplantes ou catalisadores foram realizadas (Tabela XV):

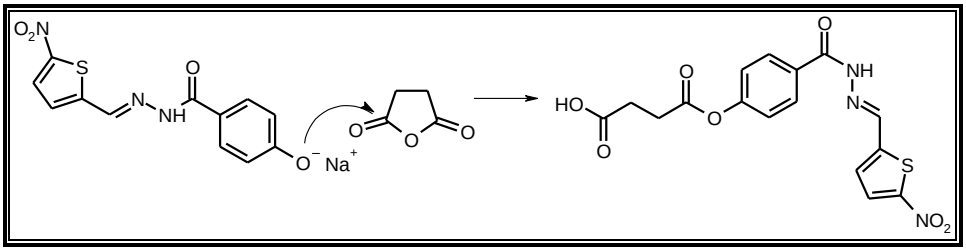
Tabela XV: Estudos de síntese do succinil 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2-ilmetileno)benzidrazida

Experimento	Reagentes	Proporção molar (mmol)	Solvente	Condições de reação
1	Fenolato sódico do nitroderivado ***1*** Anidrido succínico	2 2	$CHCl_3$:THF (1:1)	Agitação, T.A. 4 h, refluxo 19 h
2	Fenolato sódico do nitroderivado ***1*** Anidrido succínico	2 2	$CHCl_3$:THF (1:1)	Agitação, refluxo, atmosfera inerte, 8 h
3	Nitroderivado ***1*** Ácido succínico Dicicloexilcarbodiimida Dimetilaminopiridina	4 4 4 0,4	THF	Agitação, refluxo, 23 h
4	Nitroderivado ***1*** Ácido succínico *N*,*N*- carbonildiimidazol Dimetilaminopiridina	4 4 4 0,4	THF	Agitação, T.A., atmosfera inerte, 24 h

T.A.: Temperatura ambiente

Para a obtenção do hemissuccinato do composto ***1*** foi proposta, a princípio, a utilização da hidroxila fenólica como agente nucleofílico. O poder nucleófilo de fenóis, contudo, é sabidamente menor que de seus respectivos fenolatos sódico ou potássico. Por esta razão, o composto ***1*** foi previamente transformado em seu sal sódico, o fenolato de sódio, pela reação com etóxido de sódio recém-produzido e em meio alcoólico na proporção equimolar de 1:1. Este fenolato, então, foi utilizado na reação com anidrido succínico sob diferentes condições reacionais.

Num primeiro momento, a reação de succinoilação seguiu as condições descritas por Greene e colaboradores (1981), conforme mostra o esquema 3.

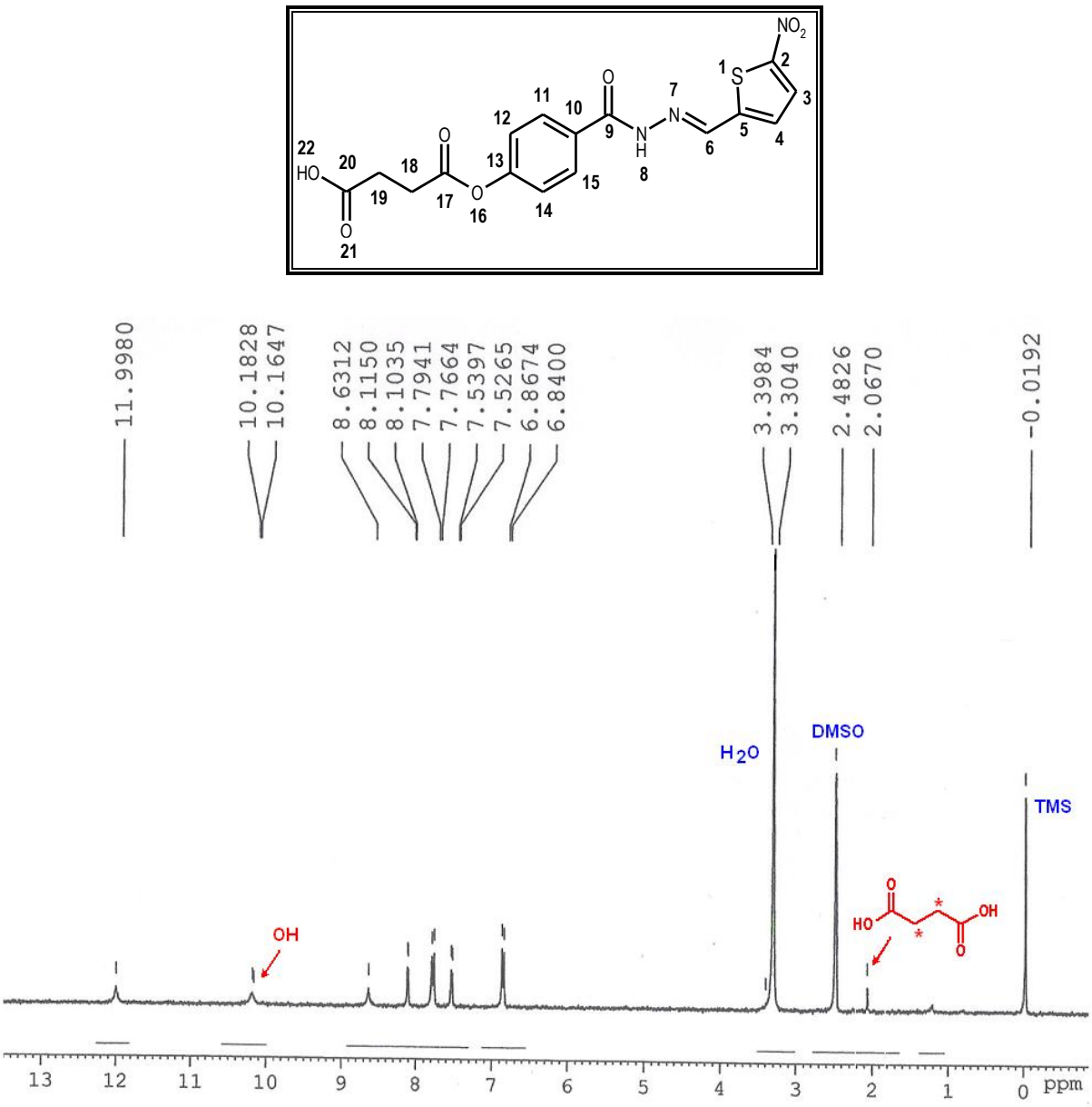


Esquema 3. Mecanismo reacional da succinoilação do nitroderivado ***1***.

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD; clorofórmio: metanol, 10:1), porém, como já observado por Rando (2005), compostos nitroderivados exibem particular dificuldade de eluição em placas de sílica, dada sua grande afinidade por este material. Assim, não foi possível constatar alterações das distâncias percorridas pela amostra da mistura reacional e do material de partida utilizado como padrão (alteração de Rf) dentro de um intervalo de 4 horas. Aumentou-se, então, a temperatura e o tempo de reação. Contudo, mesmo após um período de 19 horas a cromatografia não indicou a presença do produto desejado.

Produto sólido foi obtido por filtração, porém as análises de RMN-^{1}H e IV constataram a ausência do hemissuccinato. Estes espectros apresentaram deslocamentos químicos e bandas típicos do material de partida, nitroderivado ***1***.

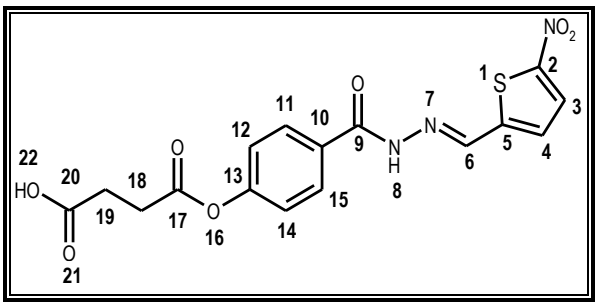
Além dos sinais correspondentes à estrutura química do material de partida (dubletos em 6,85, 7,53, 7,78 e 8,10 ppm do Espectro 9) também é possível verificar a presença do hidrogênio da hidroxila fenólica em 10,17 ppm, o qual deveria ter desaparecido caso a reação houvesse ocorrido. Também, é possível visualizar, pelo mesmo espectro, a presença de ácido succínico livre, caracterizado pelo singleto em 2,06 ppm, em conformidade com o reportado na literatura (SDBS, 2009).

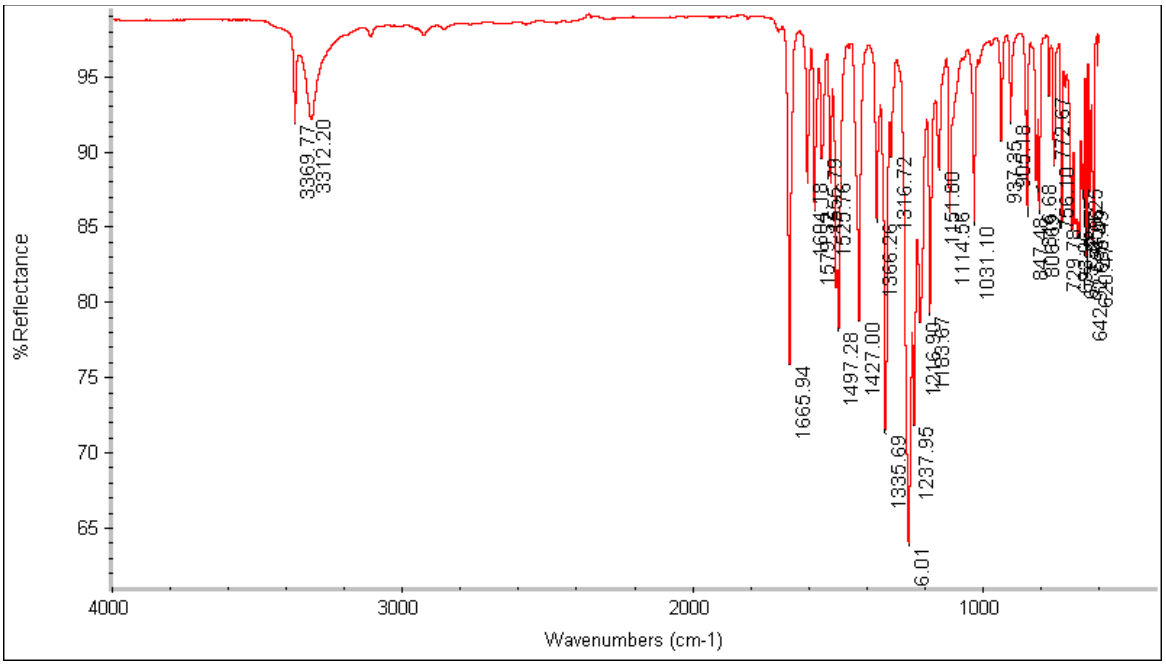


Espectro 9. RMN-^{1}H da reação de succinoilação do nitroderivado 1 (DMSO-d_6 300 MHz)

Nova tentativa de succinoilação foi então realizada aplicando-se novas condições reacionais, a saber, temperatura de refluxo (THF: clorofórmio, ambos anidros) e atmosfera inerte. Atmosfera de argônio foi utilizada com o intuito de preservar a integridade do anidrido succínico. Novamente a reação foi acompanhada por CCD, porém não foi observada qualquer alteração de Rf.

Esta abordagem, tampouco, levou à obtenção do produto desejado, conforme mostra o espectro de IV obtido.





Espectro 10. Espectro na região do infravermelho obtido após reação pela metodologia 2 de obtenção de hemissuccinato do nitroderivado ***1*** (KBr, 500-400 cm^{-1}).

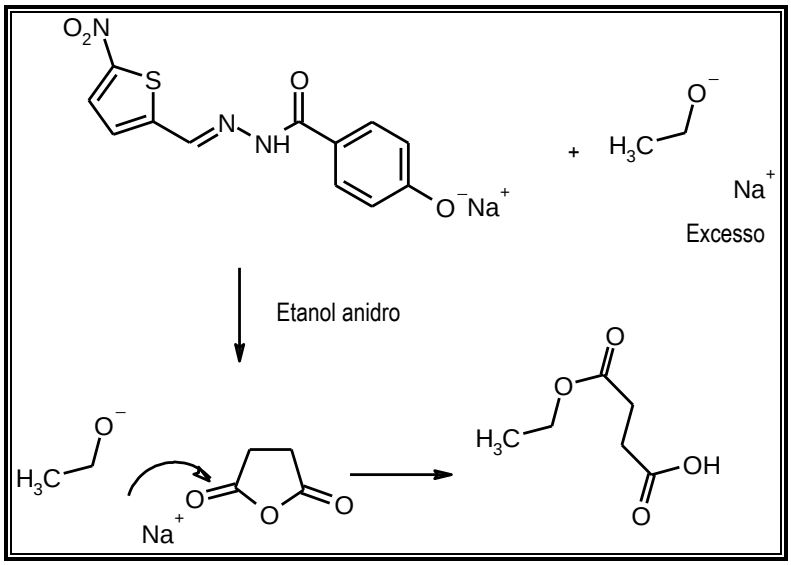
cm^{-1}	Grupo funcional
3369	ν NH amida
3312	ν OH fenólico
1665	ν C=O
1604	ν C=N
1525	ν NO assimétrico do NO_2
1427	ν CH do anel tiofênico
1335	ν NO simétrico do NO_2

Bandas características do nitroderivado ***1*** como os estiramentos da hidroxila fenólica 3312 cm^{-1}), do NH hidrazídico (3369 cm^{-1}) bem como do C=O da carbonila (1665 cm^{-1}) são visíveis pelo espectro. De maior relevância, contudo, é a ausência de bandas intensas referentes aos estiramentos das carbonilas do éster e do ácido da estrutura de um hemissuccinato.

Uma possibilidade é que esta succinoilação esteja sendo desfavorecida pela etapa de produção do fenolato sódico. Etóxido de sódio foi utilizado em proporção equimolar ao nitroderivado ***1***. Contudo, há a possibilidade de que um excesso deste reagente ou parte do mesmo que não tenha reagido completamente com a hidroxila fenólica, possa funcionar como contaminante do fenolato.

Quando da adição deste reagente ao anidrido succínico para a etapa de succinoilação, o etóxido de sódio contaminante reagiria como nucleófilo tanto ou mais potente que o próprio fenolato em questão.

Esta reação paralela acabaria por, não só competir com o ataque do fenolato, como também por diminuir as concentrações de anidrido succínico do meio. Este último deve estar sob a forma de anidrido para exibir eletrofilicidade suficiente para reagir com o fenolato do nitroderivado ***1*** produzindo o hemissuccinato desejado.



Esquema 4. Hipótese do mecanismo de reação entre o etóxido de sódio e o anidrido succínico.

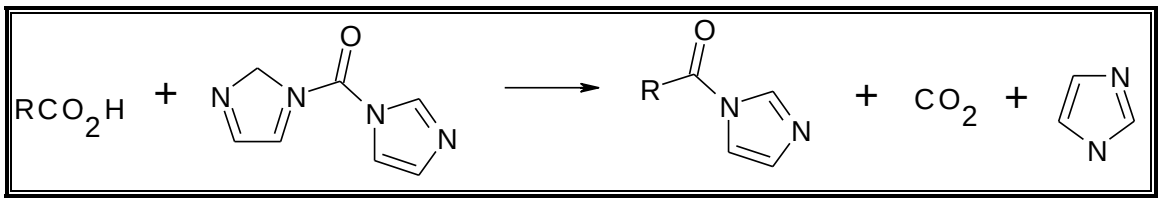
Pela segunda abordagem proposta, o nitroderivado já obtido foi succinoilado com auxílio de agentes acoplantes como o DCC e o CDI.

Estes agentes visam aumentar a reatividade do carbono carbonílico do ácido succínico e/ou do anidrido succínico para que estes reajam mesmo quando utilizando reagentes nucleofílicos fracos, como o caso do fenol presente no nitroderivado 1. Para esta etapa do projeto, elegemos como agentes condensantes a dicicloexilcarbodiimida (DCC) e o *N,N'*-carbonildimidazol (CDI).

Assim, o composto ***1*** foi submetido à reação de succinoilação na presença do agente condensante DCC. A reação procedeu com a prévia ativação das carbonilas do ácido succínico pelo DCC, por meia hora, seguida da adição do nitroderivado monossubstituído juntamente com um aceptor de prótons e reagente de acilação, no caso, a dimetilaminopiridina (DMAP). A reação, mantida sob refluxo por 23 horas, foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, porém, não foi possível observar a formação de nenhuma alteração que indicasse a formação do produto esperado. Sendo assim, a reação foi interrompida e o precipitado suspenso foi filtrado em funil de Büchner e seco em dessecador com pentóxido de fósforo. O composto isolado foi caracterizado por RMN-^{1}H, porém não apresentou os sinais referentes aos metilenos da cadeia do hemissuccinato. O espectro revelou, apenas, deslocamentos químicos de prótons referentes ao material de partida, o nitroderivado ***1***.

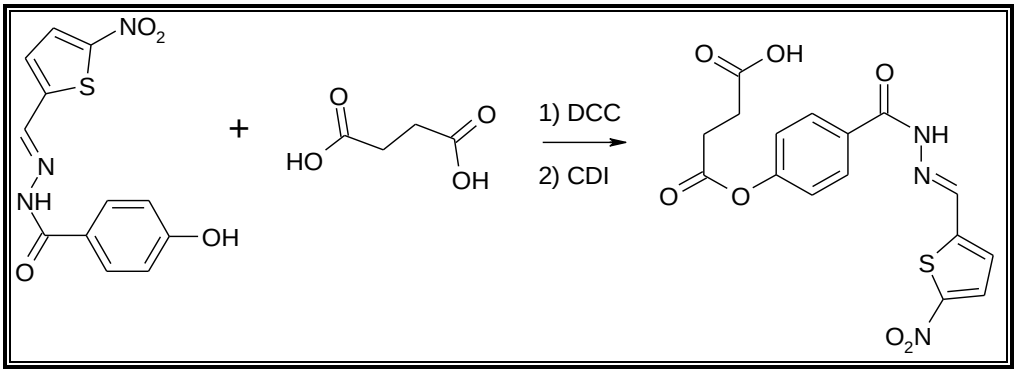
Visto que com esta metodologia não foi possível realizar a succinoilação do nitroderivado ***1***, partiu-se para uma segunda tentativa, porém, desta vez, utilizando-se como agente acoplante o carbonildiimidazol (CDI). Este reagente é bastante utilizado em síntese de peptídeos e apresenta mecanismo reacional muito parecido ao dos cloretos de acila.

O CDI pode ativar ácidos carboxílicos para posterior conjugação com outros nucleófilos. Nesta reação, ácidos carboxílicos reagem com CDI para formar *N*-acilimidazóis, intermediário altamente reativo. Posteriormente, este intermediário pode reagir com aminas para formar ligações amídicas ou com hidroxilas para formação de ésteres. Com o ataque do agente nucleófilo ocorre a liberação de um grupo imidazólico e de CO_2 (HERMANSON, 2008).



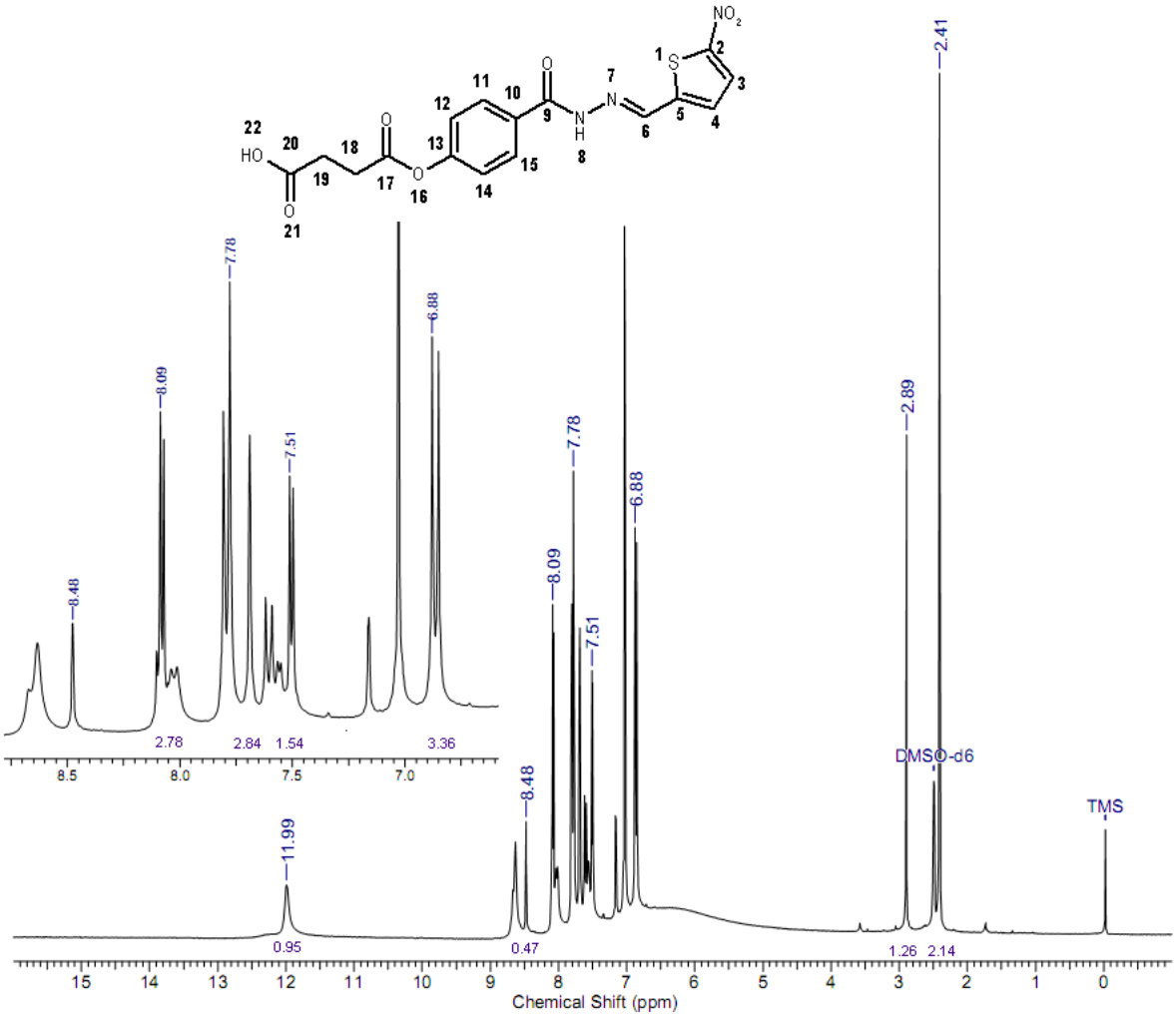
Esquema 5. Mecanismo reacional do agente acoplante *N*, *N'*-carbonildiimidazol

Nesta nova tentativa, ácido succínico, agente espaçante do pró-fármaco planejado, previamente solubilizado em THF anidro, foi mantido sob agitação na presença de CDI por 1 hora, na proporção de 1:1. Após este período adicionou-se o composto ***1*** em proporção equimolar e DMAP.



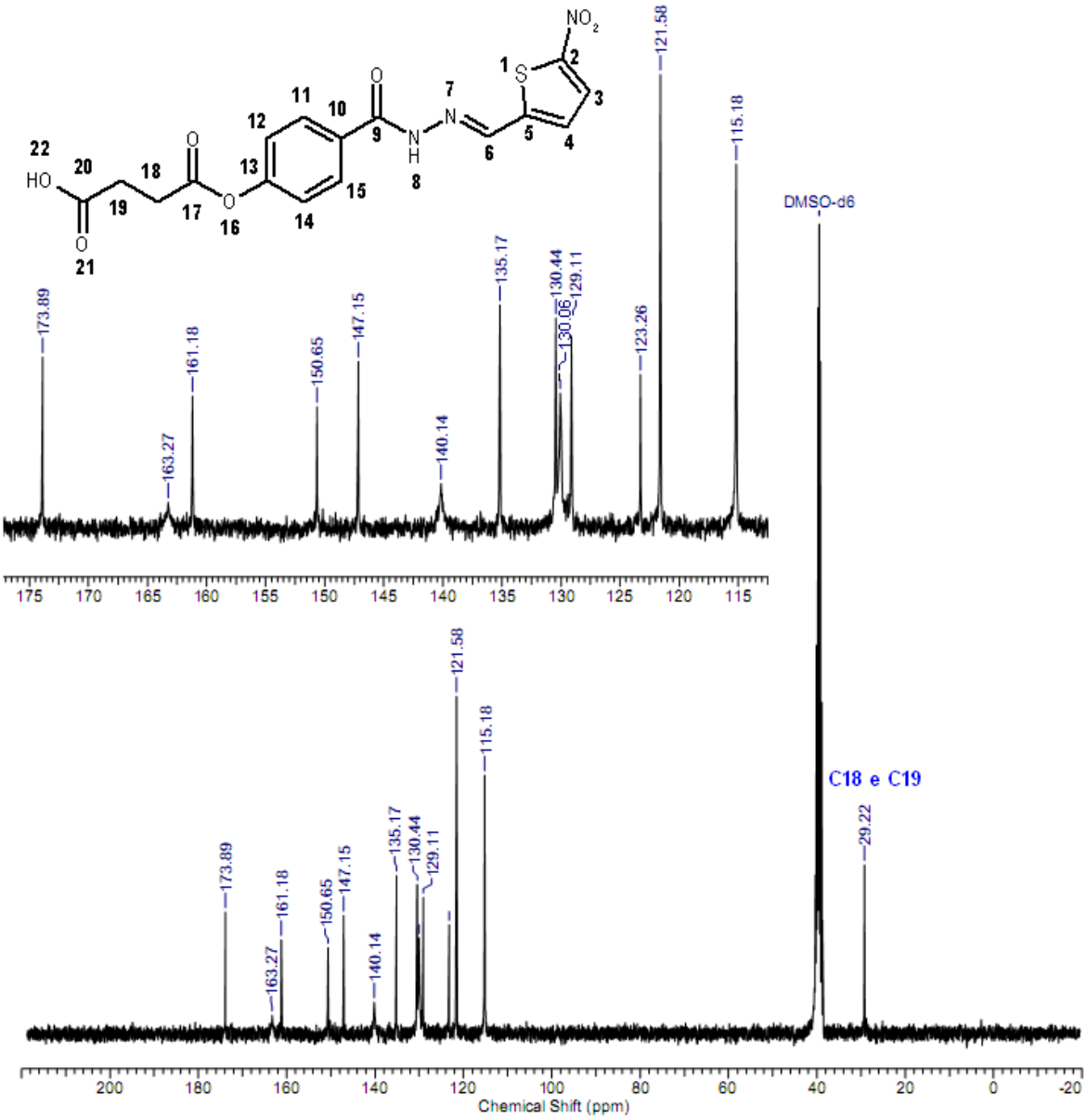
Esquema 6. Reação de acoplamento do ácido succínico ao nitroderivado ***1*** a partir da utilização de agentes acoplante e condensante.

A reação, mantida à temperatura ambiente, foi acompanhada por CCD. Após 4 horas de reação, foi possível observar a formação de mancha diferente da obtida para o material de partida, indicando a formação de um novo composto. O precipitado, de cor amarelo claro, foi filtrado sob pressão reduzida e seco em bomba de vácuo. O sólido seco obtido foi caracterizado por RMN-'H, RMN-^{13}C e infravermelho.



Espectro 11. Espectro de RMN-^{1}H do hemissuccinato do composto ***1*** (DMSO-d_6, 300 MHz).

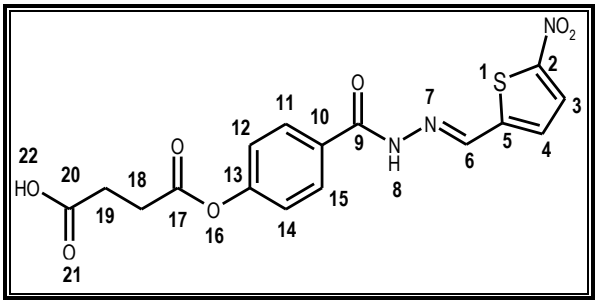
.δ, ppm	Multiplicidade	Integral	Atribuição	J (Hz)
2,41	singleto	2 H	H_{19}	---
2,89	singleto	2 H	H_{18}	---
6,88	dubleto	2 H	H_{12} e H_{14}	8,65
7,51	dubleto	1 H	H_4	4,57
7,78	dubleto	2 H	H_{11} e H_{15}	8,65
8,09	dubleto	1 H	H_3	4,57
8,48	singleto	1 H	H_6	---
11,99	singleto	1 H	H_8	---

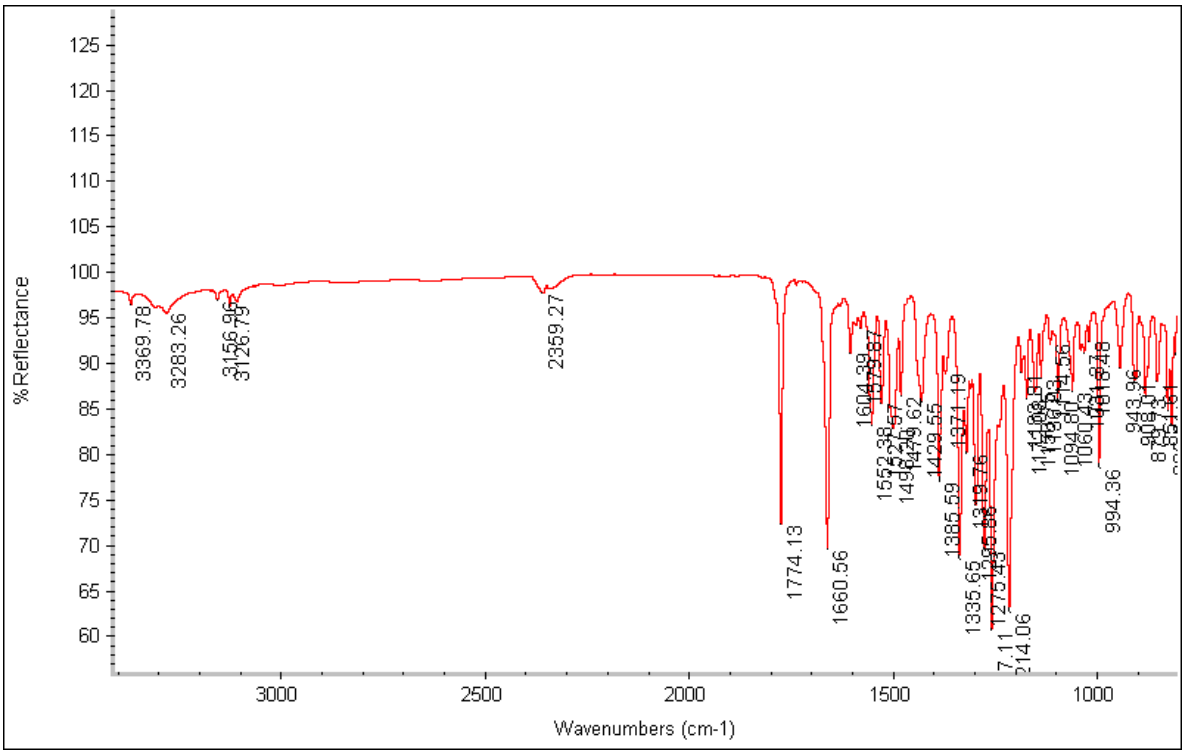


Espectro 12. Espectro de RMN-^{13}C do hemissuccinato do composto ***1*** (DMSO-d_6, 300 MHz).

δ, ppm	Atribuição	δ, ppm	Atribuição
29,22	C_{18} e C_{19}	135,17	Imidazol
115,18	C_{12} e C_{14}	140,14	C_2
121,58	Imidazol	147,15	C_6
123,26	C_4	150,65	C_5
129,11	C_{11} e C_{15}	161,18	C_9 e C_{17}
130,06	C_{10}	163,27	C_{13}
130,44	C_3	173,89	C_{20}

Faixa de Fusão (°C)	202-223°C
Rendimento (%)	55





Espectro 13. Espectro na região do infravermelho do hemissuccinato do nitroderivado ***1.***

cm^{-1}	Grupo funcional
3369	ν NH amida
1774	ν C=Ode éster alifático
1660	ν C=O do ácido e da hidrazida
1604	ν C=N
1527	ν NO assimétrico do NO_2
1429	ν CH do anel tiofênico
1335	ν NO simétrico do NO_2

Conforme mostram os espectros 11, 12 e 13, alguns sinais e bandas características indicam a formação do hemissuccinato. No espectro de RMN-^{1}H (Espectro 11), deslocamentos químicos referentes aos prótons metilênicos H_{18} e H_{19} podem ser observados em 2,41 e 2,89 ppm. O sinal relativo ao próton H_{19} apresenta-se em campo mais baixo em relação ao $H_{18,}$ ou seja mais desprotegido, devido à proximidade da função ácido carboxílico. Os deslocamentos químicos em 121,58 e 135,17 ppm, que não correspondem ao produto esperado, podem ser atribuídos aos carbonos do heterociclo imidazol, subproduto da reação com CDI.

O espectro de RMN-^{13}C (Espectro 12) corrobora os achados do espectro de hidrogênio. Os carbonos aromáticos simétricos C_{11} e C_{15}, por exemplo, correspondem ao sinal em 129,11 ppm indicando sua maior desproteção quando comparados aos carbonos simétricos C_{12} e C_{14} que aparecem em campo mais alto, 115,18 ppm. Esta maior desproteção nuclear ocorre devido à proximidade destes carbonos à carbonila hidrazídica, grupo fortemente retirador de elétrons e em conjugação com sistema ressonante ligado ao grupo nitro. Os carbonos do anel heterocíclico são visualizados em 123,26 e 130,44 ppm para C_4 e C_3, respectivamente. O sinal em 161,18 ppm parece corresponder a duas das carbonilas existentes na estrutura: a carbonila hidrazídica e a carbonila do grupo éster. Ambas, parecem produzir sinais em regiões muito similares, daí a dedução de uma possível sobreposição de deslocamentos químicos. O carbono da carbonila do ácido carboxílico, por fim, apresenta-se como um sinal em 173,89 ppm.

O espectro no infravermelho identifica a presença de grupos funcionais importantes como o estiramento C=O de éster alifático (1774 cm^{-1}) e a banda que pode corresponder tanto ao estiramento C=O de amida (1660 cm^{-1}) quanto ao estiramento C=O de carboxilas de ácido quando formando ligações de hidrogênio intramoleculares ou quando sob a forma de carboxilato, duas situações nas quais o produto final pode, realmente, ser encontrado. O estiramento C-O de ésteres fenólicos é representado por uma banda intensa em 1214 cm^{-1}. A formação do hemissuccinato do nitroderivado ***1***, portanto, parece ter sido alcançada.

Devido a problemas na lâmpada do aparelho de infravermelho, não foi possível visualizar bandas na região de 3000 a 2840 cm^{-1} como, por exemplo, aquelas referentes aos estiramentos de CH dos carbonos metilênicos que seriam observadas nesta região.

Infelizmente, embora vários esforços tenham sido mediados na tentativa de obter maiores quantidades deste produto, não foi possível reproduzir esta reação.

Em relação à obtenção da hemissuccinamida do nitroderivado ***2***, succinoilações foram realizadas por meio das mesmas condições e metodologias empregadas para o nitroderivado ***1*** (Tabela XVI):

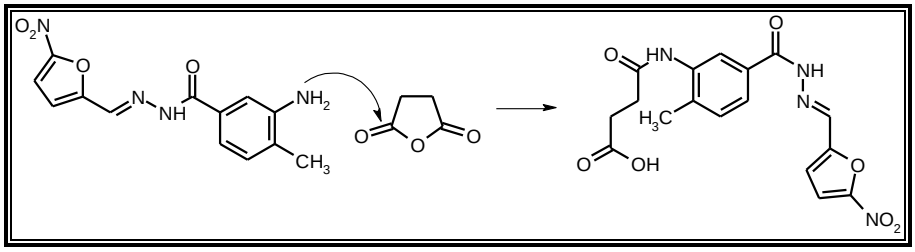
Tabela XVI: Estudos de síntese do composto 3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida

Experimento	Reagentes	Proporção molar (mmol)	Solvente	Condições de reação
1	Nitroderivado ***2*** Anidrido succínico	2 2	$CHCl_3$:THF (1:1)	Agitação, atmosfera inerte, refluxo, 23 h
2	Nitroderivado ***2*** Anidrido succínico	2 2	THF	Agitação, atmosfera inerte, refluxo, 23 h
3	Nitroderivado ***2*** Anidrido succínico	2 2,16	Metanol	Agitação, refluxo, 50 minutos
4	Nitroderivado ***2*** Ácido succínico DCC DMAP	4 4 4 0,4	THF	Agitação, refluxo, 23 h
5	Nitroderivado ***2*** Ácido succínico CDI DMAP	4 4 4 0,4	THF	Agitação, T.A., atmosfera inerte, 24 h

T.A. : Temperatura ambiente

Para a obtenção do hemissuccinato do composto ***2*** a abordagem adotada foi a reação do anidrido succínico com a amina da posição 3 do anel aromático do nitroderivado, a qual apresenta bom poder nucleofílico, sem necessidade de qualquer etapa de ativação. Várias succinoilações foram realizadas sob mesma metodologia, porém sob diferentes condições reacionais.

Também neste caso, foi adotada, como base, a metodologia de succinoilação proposta por Greene e colaboradores, porém, para aumentar a solubilidade do nitroderivado durante esta etapa, utilizou-se clorofórmio como meio reacional. Em uma segunda tentativa, utilizou-se somente THF como solvente da reação.



Esquema 7. Mecanismo reacional da succinoilação do nitroderivado ***2.***

Estas duas primeiras reações foram realizadas utilizando-se aquecimento e atmosfera inerte visando preservar a integridade do anidrido succínico. As reações também foram acompanhadas por CCD, utilizando-se como fase móvel clorofórmio e metanol (9:1), porém, tampouco foi possível observar alguma alteração de Rf que indicasse a formação de um novo produto.

A literatura descreve que é possível realizar a succinoilação de aminas aromáticas (MOORE, MILLER, 1942) mediante a utilização de excesso de anidrido succínico, em metanol anidro sob refluxo por 1 hora. Assim, em nova tentativa para a formação do hemissucinamida, adotou-se a mesma metodologia utilizada para succinoilação de sulfonamidas (MOORE, MILLER, 1942).

Nesta abordagem, o composto contendo a amina aromática é mantido sob agitação com excesso de anidrido succínico em refluxo por 1 hora.

De acordo com resultados obtidos, não foi possível verificar os sinais referentes à succinoilação do composto 3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida.

Na análise dos espectros de RMN-^{1}H, esperava–se obter sinais entre as regiões δ 2 e 3, referentes aos hidrogênios do ácido succínico conjugado ao nitroderivado. A visualização de um singleto na região de 5 ppm, referente aos hidrogênios (H_{16}) da amina aromática, presente em todos os espectros, também confirma que não houve reação entre a amina aromática e o anidrido succínico, tendo em vista que este sinal deveria desaparecer caso a reação tivesse ocorrido.

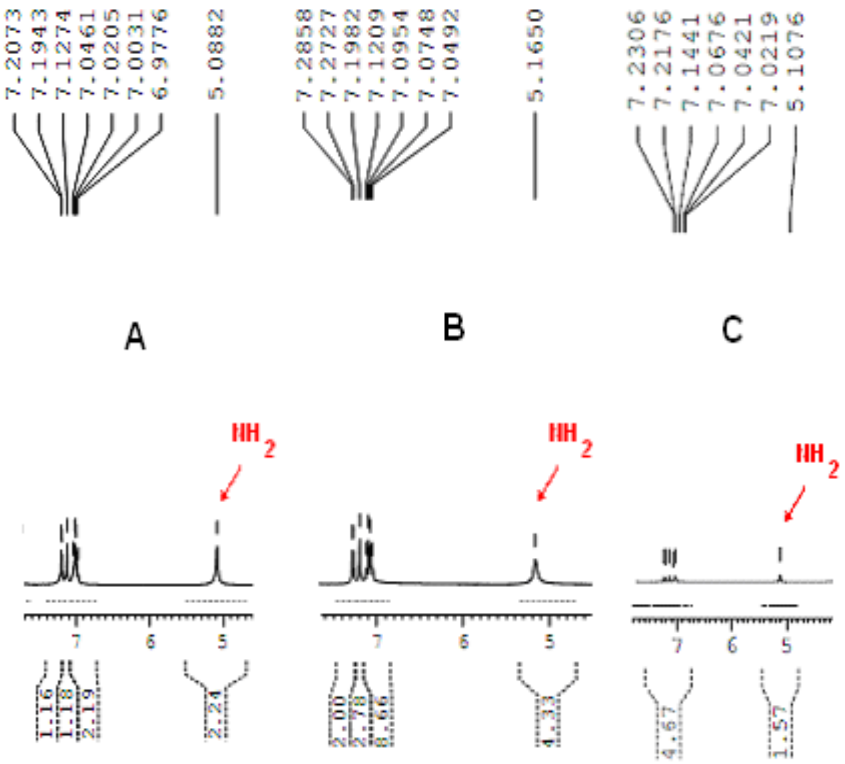
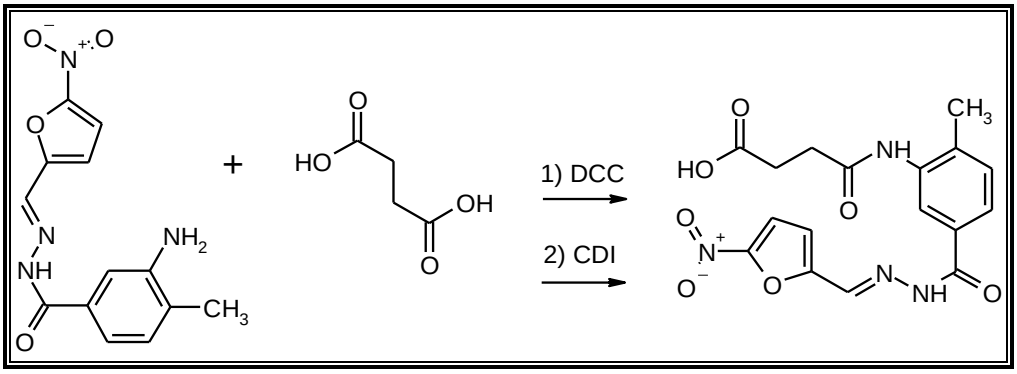


Figura 52. Espectros de RMN-1H dos sólidos obtidos pelas metodologias 1 (A), 2 (B) e 3(C) aplicadas para obtenção do hemissuccinato do composto **2**.

Tendo em vista que a partir das abordagens utilizadas não foi possível obter as hemissuccinamidas, partiu-se para a utilização de agente condensante e acoplante: DCC e CDI, respectivamente.



Esquema 8. Reação de acoplamento do ácido succínico ao nitroderivado ***2*** a partir da utilização de agentes acoplante e condensante.

A primeira metodologia, na qual se empregou agente condensante DCC, foi realizada a partir de prévia ativação das carbonilas do ácido succínico com o agente condensante, DCC, e posterior adição do nitroderivado dissubstituído e de um aceptor de prótons e reagente de acilação (DMAP). A reação, mantida sob refluxo e agitação, foi acompanhada por CCD.

O precipitado obtido, após 23 horas de reação, foi lavado com THF, filtrado em funil de Büchner e seco em dessecador contendo sílica-gel.

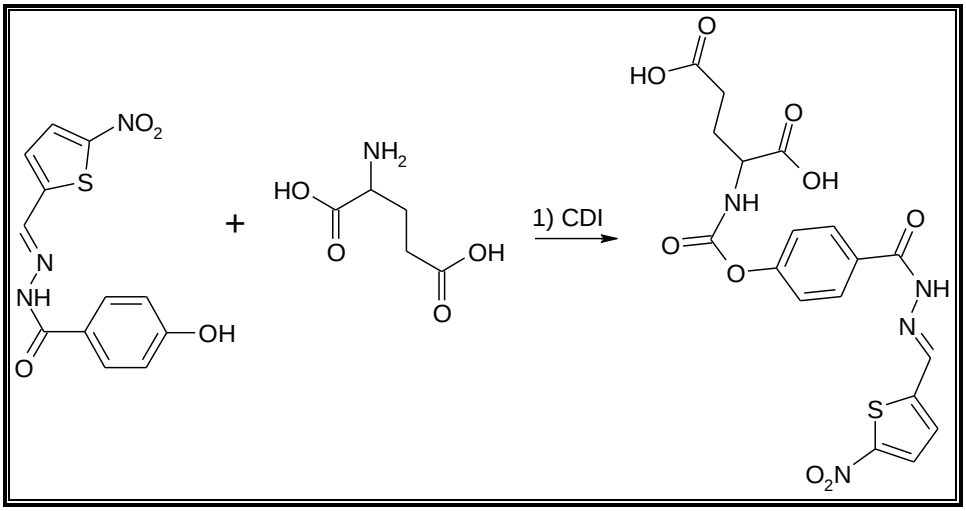
Já na segunda abordagem, partiu-se da ativação das carbonilas do agente espaçante pelo CDI. Assim como no caso do nitroderivado ***1***, o ácido succínico foi previamente solubilizado em THF anidro e mantido sob agitação e atmosfera inerte na presença de CDI por 1 hora, na proporção de 1:1. Após a ativação das carbonilas, adicionou-se o nitroderivado dissubstituído e DMAP, mantendo as mesmas condições reacionais por mais 23 horas. O precipitado, de cor vermelha, foi filtrado sob pressão reduzida e seco à pressão reduzida.

Os compostos isolados, caracterizado por RMN-^{1}H e infravermelho, tampouco apresentaram sinais que indicassem a formação do hemissuccinamida.

Tomando por base os resultados obtidos na modelagem, o projeto foi reformulado focando-se na síntese dos pró-fármacos sem agente espaçante (Figura 19). Para uma mesma metodologia, duas variações foram empregadas (Tabela XVII).

Tabela XVII: Estudos de síntese do 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2ilmetileno)benzidrazida

Experimento	Reagentes	Proporção molar (mmol)	Solvente	Condições de reação
1	Nitroderivado ***1*** *N,N*- carbonildiimidazol Ácido glutâmico DMAP	3 3 3 0,3	THF	Agitação, T.A, atmosfera inerte, 20 h
2	Fenolato sódico do nitroderivado ***1*** *N,N*- carbonildiimidazol Ácido glutâmico DMAP	2 2 2 0,2	THF	Agitação, T.A, atmosfera inerte, 22 h



Esquema 9. Reação de acoplamento do ácido glutâmico ao nitroderivado ***1.***

Nesta abordagem, o CDI foi previamente solubilizado em THF anidro para, então, adicionar ao meio reacional o nitroderivado ***1***. Estes reagentes foram mantidos sob agitação e atmosfera inerte, à temperatura ambiente, por 3 horas. Após este período, adicionou-se, então, o ácido

glutâmico e o DMAP. Estas condições reacionais foram mantidas por cerca de 20 horas e a reação foi acompanhada por CCD, empregando-se como sistema eluente: metanol/clorofórmio (1:9). O precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida e lavado com éter etílico gelado. Após seco, o sólido foi caracterizado por RMN^{1}H. No espectro puderam-se visualizar apenas deslocamentos químicos referentes ao material de partida e impurezas.

Na tentativa de aumentar a nucleofilicidade do fenol, o composto ***1***, novamente***,*** foi transformado em seu sal sódico e, após, a solubilização do CDI em THF anidro, foi adicionado ao meio reacional e mantido sob agitação à temperatura ambiente e atmosfera inerte por 4 horas. Após este período adicionou-se ao meio reacional ácido glutâmico e DMAP. O produto sólido foi obtido por filtração, contudo as análises de RMN-^{1}H não constataram a presença do pró-fármaco.

Para o composto 2 a mesma rota foi testada, porém sem sucesso.

Uma vez que as reações de succinoilação falharam tanto para o caso do composto ***1***, quanto para o composto ***2***, uma hipótese aplicável a ambos compostos foi formulada. É possível que a presença do grupo NO_2, substituinte fortemente retirador de elétrons, na extremidade oposta das moléculas exerça influência sobre a nucleofilicidade dos nitroderivados. O sistema de duplas conjugadas em toda a extensão da estrutura permitiria ressonância eletrônica tal que o poder nucleofílico tanto da amina aromática quanto da hidroxila fenólica ficariam diminuídos.

Com o propósito de verificar a influência deste grupo na reatividade das moléculas, uma nova abordagem foi testada. Um dos compostos foi sintetizado sem a presença do grupo NO_2 (derivado ***7,*** Figura 53). O produto foi caracterizado por RMN-^{1}H (Espectro 14) e prosseguiu-se, então, com a reação de succinoilação.

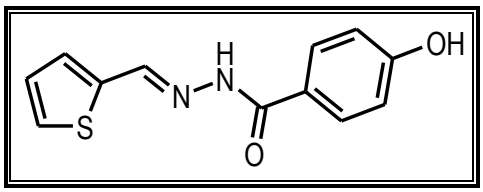
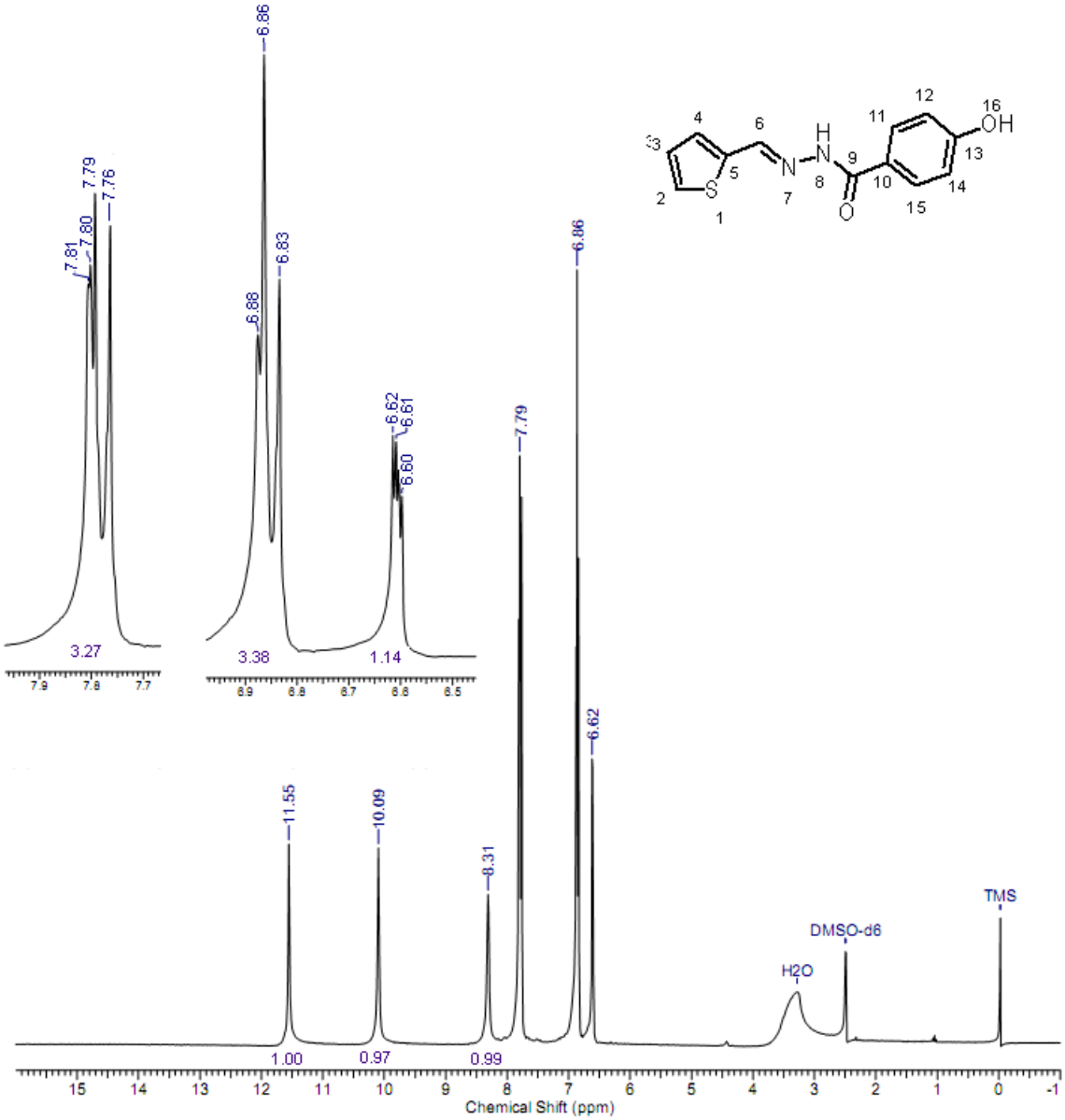


Figura 53. Composto ***7***, derivado do composto 1 sem a presença do grupo NO_2.



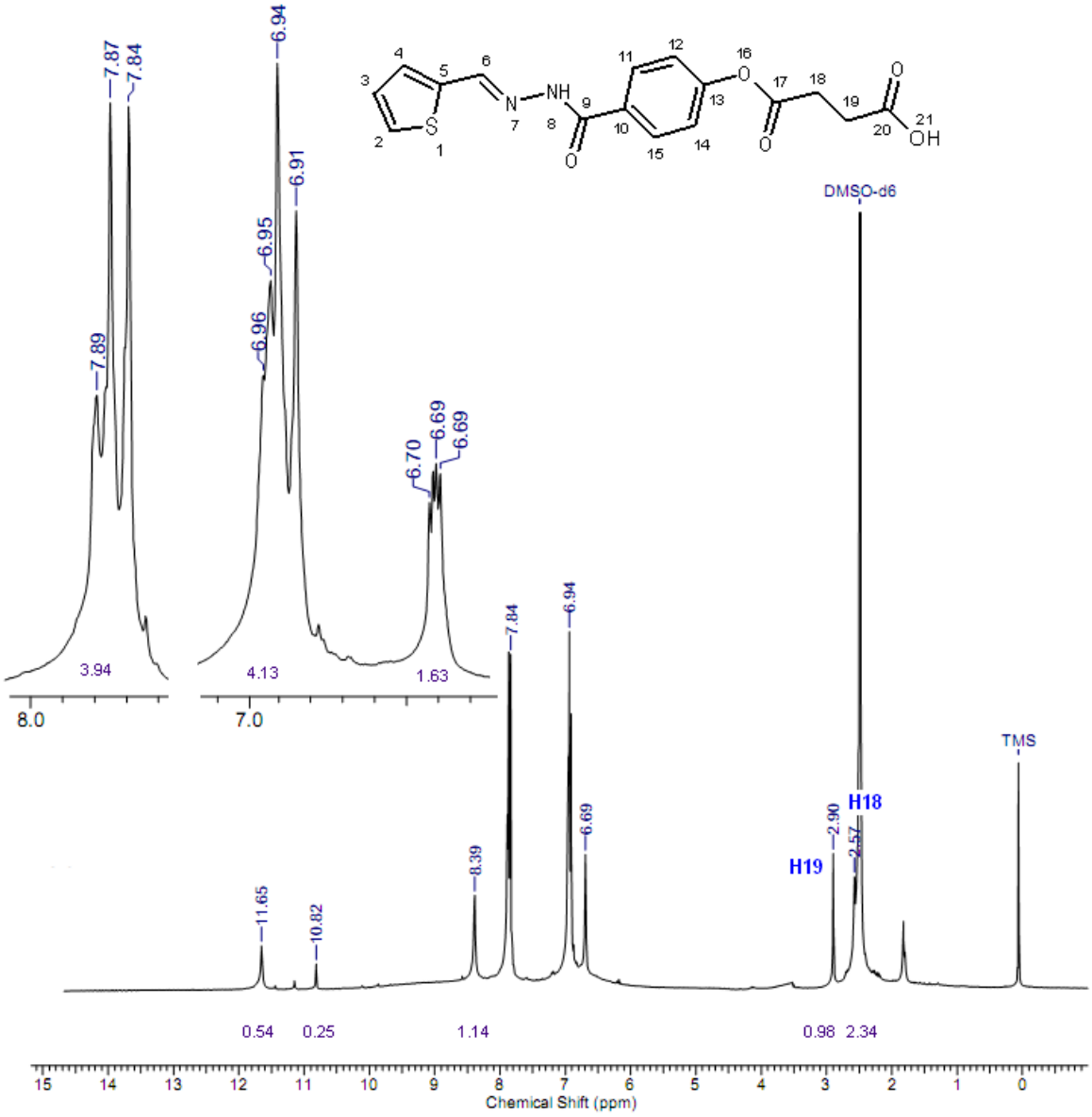
Espectro 14. Espectro de RMN-1H derivado ***7*** (DMSO-d_6, 300 MHz).

δ, ppm	Multiplicidade	Integral	Atribuição	J (Hz)
6,60-6,62	multipleto	3 H	H_2, H_3 e H_4	---
6,86	tripleto	2 H	H_{12} e H_{14}	11,44
7,79	tripleto	2 H	H_{11} e H_{15}	11,44
8,31	singleto	1 H	H_6	---
10,10	singleto	1 H	OH	---
11,55	singleto	1 H	H_8	---

Faixa de Fusão (°C)	234-240
Rendimento (%)	85

Os sinais referentes a hidrogênios da estrutura do derivado **7** podem ser visualizados no espectro de RMN-^{1}H obtido. Os hidrogênios aromáticos H_{11} e H_{15}, por exemplo, correspondem ao multipleto em 7,79 ppm. Já os hidrogênios H_{12} e $H_{14,}$ mais protegidos dada à proximidade destes com a OH fenólica e maior distância da carbonila hidrazídica retiradora de elétrons, aparecem como tripleto em campo mais alto, 6,86 ppm. Os deslocamentos químicos em 10,10 e 11,55 ppm correspondem aos prótons da hidroxila fenólica e do nitrogênio hidrazídico, respectivamente. Por fim, o multipleto em 6,60 a 6,62 ppm representa os hidrogênios do anel tiofênico não nitrado H_2, H_3 e H_4.

Partiu-se, então, para a etapa de ligação do produto ao anidrido succínico. Este composto foi obtido a partir de 30 minutos de reação, quando foi possível observar diferenças de Rf entre as distâncias percorridas pelo material de partida e pela mistura reacional desde seu ponto de aplicação na placa de CCD, indicando a formação de novo produto. O produto filtrado sob pressão reduzida e caracterizado por RMN-^{1}H apresentou deslocamentos que indicam a presença do hemissuccinato (Espectro 15).



Espectro 15. Espectro de RMN-1H do hemissuccinato do derivado **7** (DMSO-d_6, 300 MHz).

δ, ppm	Multiplicidade	Integral*	Atribuição	J (Hz)
2,57	multipleto	2 H	H_{18}	---
2,90	singleto	2 H	H_{19}	---
6,69-6,70	multipleto	3 H	H_2, H_3 e H_4	---
6,91-6,96	multipleto	2 H	H_{12} e H_{14}	**
7,84 -7,89	multipleto	2 H	H_{11} e H_{15}	**
8,39	singleto	1 H	H_6	---
10,82	singleto	1 H	$OH_{ácido}$	---
11,65	singleto	1 H	H_8	---

* Integral esperada para o espectro
** Constantes de acoplamento não calculadas devido à mistura com material de partida.

Faixa de Fusão (°C)	105-139
Rendimento (%)	não calculado***

*** a quantidade obtida foi insuficiente para cálculo de rendimento.

Conforme revela o espectro 15, além dos deslocamentos químicos correspondentes ao derivado ***7***, é possível verificar sinais referentes aos hidrogênios metilênicos H_{18} e H_{19}. O sinal em 2,90 ppm corresponde ao próton H_{19}. Já o multipleto na região de δ 2,57 é relativo ao próton H_{18} que se encontra mais protegido que o H_{19}, vizinho à função ácido carboxílico.

O espectro indica ainda, contudo, que o produto succinoilado foi obtido, mas que a reação não foi completa visto que mistura com o material de partida é claramente indicada pelas integrais obtidas neste espectro.

Estes resultados corroboram as suspeitas de que o grupo NO_2 influencia na reatividade dos nitroderivados ***1*** e ***2***, por diminuir a nucleofilicidade da hidroxila fenólica e da amina aromática presente nestas moléculas.

Com o propósito de evitar que o grupo NO_2, presente na estrutura molecular dos nitroderivados, interferisse na obtenção dos pró-fármacos, tentamos sintetizar os compostos por rota uma inversa. Embora a obtenção do intermediário sintético pareça ter sido realizada com sucesso, não foi possível isolar o produto obtido do meio reacional aquoso devido a alta polaridade da estrutura obtida. A hidrossolubidade do composto final foi tal que mesmo mediante tentativas de resfriamento brusco, não foi possível precipitá-lo. Neste caso também não foi possível rotaevaporar a hidrazina, presente no meio reacional, já que a mesma torna-se

explosiva quando aquecida a temperaturas superiores a 60°C. Ainda, dada a toxicidade deste reagente e sua alta afinidade por sílica gel, a separação por coluna cromatográfica também tornou-se complicada.

Embora várias dificuldades tenham sido encontradas na obtenção dos compostos propostos acreditamos, ainda assim, que os pró-fármacos ligados diretamente ao transportador, ácido glutâmico, possam ser obtidos a partir da utilização de reagentes como, por exemplo, o 4 nitrofenil cloroformato.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho obtivemos informações sobre o possível mecanismo catalítico da CPG_2. Tais resultados, provenientes de estudos de ancoramento e dinâmica molecular, indicam que a CPG_2 interage com o MTX em pontos críticos para seu reconhecimento e clivagem. As interações moleculares e estéricas observadas para o complexo estão em concordância com informações descritas em literatura.

O conhecimento deste mecanismo, mesmo que teórico, nos fornece importantes informações para o desenvolvimento de substratos para sistemas ADEPT de liberação de fármacos.

Informações sobre o mecanismo de clivagem dos pró-fármacos propostos neste trabalho também foram obtidas. A clivagem dos pró-fármacos conjugados diretamente ao ácido glutâmico mostra-se mais favorável do que no caso das estruturas com agente espaçante. Estes resultados foram utilizados como base para a parte sintética em andamento para pudéssemos obter apenas os compostos de maior probabilidade de reconhecimento pela enzima.

Em relação à parte sintética do trabalho, dificuldades foram encontradas na obtenção dos compostos propostos e diferentes abordagens envolvendo a utilização de agentes acoplantes e condensantes foram testadas. Embora os pró-fármacos não tenham sido obtidos, as abordagens tentadas e os resultados obtidos levaram à formulação da hipótese do grupo nitro, funcionando como forte retirador de elétrons, interfira com a reatividade do sistema como um todo.

Por fim, este trabalho propõe que a síntese destes pro-fármacos poderiam ser obtidos a partir da reação com cloroformato e acoplamento direto entre o nitroderivado e o ácido glutâmico. A rota inversa, ou seja, a obtenção do derivado não-nitrado ligado ao ácido glutâmico seguido de etapa final de nitração do sistema também pode ser uma possibilidade para obtenção dos compostos propostos.

6. PERSPECTIVAS

6. PERSPECTIVAS

Com o propósito de complementar os estudos experimentais de reatividade dos compostos com e sem o grupo nitro na estrutura, estudos de análise conformacional e análise dos orbitais naturais de ligação (NBO) estão sendo realizados.

Caso estes estudos venham a corroborar os achados experimentais, novas abordagens sintéticas devem ser realizadas para a obtenção dos pró-fármacos sugeridos. Acoplamento do correspondente não nitrado dos compostos ativos utilizados neste estudo ao transportador ácido glutâmico seguido de nitração como etapa final de obtenção do pró-fármaco é uma das possibilidades sugeridas como perspectivas deste projeto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAOUI, A. E.; SAHA, N.; SCHMIDT, F.; MONNERET, C.; FLORENT, J.C. New Taxol (paclitaxel) prodrugs designed for ADEPT and PMT strategies in cancer chemotherapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Amsterdam, v.14, p.5012–5019, 2006.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREADY, J. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. *Medicinal Research Reviews*, New York, v.26, n°5, p.531-568, 2006.

ARGOLO, A.M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. *Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil*. 1° Edição. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2007. p.1-26.

BAGSHAWE, K.D.; SHARMA, S.K.; SPRINGER, C.J.; ROGERS, G.T. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). A review of some theoretical, experimental and clinical aspects. *Annals of Oncology,* London, v.5, p.879-891, 1994.

BAGSHAWE, K.D.; BEGENT, R.H.J. First clinical experience with ADEPT. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Amsterdam, v. 22, p.365-367, 1996.

BAGSHAWE, K.D. Antibody directed enzymes revive anti-cancer prodrugs concept. *British Journal of Cancer*, London, v.56, p.531-532, 1987.

BATISTA, R.S.A.; MAIA, G.J.C.; GOMES, A.P.; BATISTA, R.S.; COLTA, R.M.M. A moléstia de Chagas e os direitos sociais: reflexões contemporâneas. *Revista Ciência & Saúde Coletiva da Associação Brasileira de Pós-Graduação em Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: http://www.cienciaesaudecoletiva.com.br/artigos/artigo_int.php?id_artigo=851 Acesso em: 17 de Setembro de 2010.

BEGENT, R.H.J.; BAGSHAWE, K.D. Biodistribution studies. *Advanced Drug Delivery Reviews,* Amsterdam, n°22, p.325-329, 1996.

BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; Z., FENG, Z.; GILLIAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Research*, Oxford, v.28, p.235-242, 2000.

BEZERRA, R.J.S.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v.40, n°2, p.139-149, 2004.

BISUGO, M.C.; ARAÚJO, M. F.L.; H TANIGUCHI, H.H.; ACUNHA, E.; A SANTOS, A.A.; SPESSOTO JUNIOR, M.; KANETO , C. N.; CAMARGO , C.V.; POLIZEL, M. A., VIGILATO, M. A.; NEGREIROS, C. M.; OKAGIMA, M.; GONÇALVES, N. M.; LUNDSTEDT, L.P.; ANDRADE, A.M.; LIMA, V.MF.; TOLEZANO, E J. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz,* São Paulo*,* v.66, p.185-193, 2007.

BLAU, L.; MENEGON, R.F.; CHIN, M.C. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. *Química Nova, S*ão Paulo, v.29, n°6, p.1307-1317, 2006.

BLAU, L. *Obtenção de pró-fármaco potencialmente antichagásico para uso em sistema ADEPT*. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo, 2005. p.1-9.

BERMAN, J.D. Biochemistry of pentostan resistant *Leishmania*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* Deerfield Beach, v.40, p.159-164, 1989.

BOCEDI, A.; GRADONI, L.; MENEGATTI, E.; ASCENZI, P. Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Amsterdan, v.315, p.710-718, 2004.

Ministério da Saúde. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 5° Edição: manual de orientação. Distrito Federal, 2000. p.7–29.

Ministério da Saúde. *Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção Leishmania-HIV*. 49° Edição: manual de orientação. Distrito Federal, 2004. p. 5-23.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M.B. *Trypanossoma cruzi e a doença de Chagas*. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.1-74.

BRENER, Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. *In* CANÇADO, J.R. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte: Imprensa Oficial de Minas Gerais, 1968. p.510-516.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.; BUXTON, I.; BLUMENTHAL, D. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 11˚ Edição. New York: McGraw-Hill, 2006. p. 683-689

BULTINCK, P.; WINTER, H.; LANGEBAEKER, W.; TOLLENAERE, J.P. *Computational medicinal chemistry for drug discovery*. New York: Marcel Dekker, 2004. p.406.

CAMANDAROBA, E.L.P.; LIMA, C.M.P.; ANDRADE, S.G. Oral transmission of Chagas disease: importance of Trypanosoma cruzi biodeme in the intragastric experimental infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v.44, p.97-103, 2002.

CARNEIRO DE FRANÇA, F.F.A. *Dicionário terapêutico Guanabara.* Edição.2004/2005. Rio de Janeiro:Guanabara-Koogan, 2004. p.513-517.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.; BERNARDES, L. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Química Nova,* São Paulo, v.26, p.428-438, 2003.

CAZZULO, J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design*, Sharjah, v.7, n°12, p.1143-1156, 2001.

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S.B.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington DC, v.45, n°7, p.2023-2029, 2001.

CHEVRIER, B., D´ORCHYMONT, H.; SCHALK, C.; TARNUS, C., MORAS, D.. The structure of the *Aeromonas proteolytica* aminopeptidasecomplexed with a hydroxamate inhibitor. Involvement in catalysis of Glu151 and two zinc ions of the co-catalytic unit. *European Journal of Biochemistry*, London, v.237, p.393-398, 1996.

CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. *Química Nova, São Paulo,* v.22, p.75-83, 1999.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002. p.39-111.

COSTA-FILHO, A.V.; LUCAS, I.C.; SAMPAIO, R.N.R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por Leishmania (Leishmania) amazonensis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v.*41, n°4, p.424-427, 2008.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas´disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.97, n°1, p.3-24, 2002.

COURA, J.R.; FERREIRA, L.F.; SILVA, J.R. Experiências com nitrofurazona na fase crônica da doença de Chagas. *Hospital*, v.62, p.957-964, 1962.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research,* New Delhi, v.123. p.399-410, 2006.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,* São José do Rio Preto, v.28, n°2, p.81-87, 2006.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A.; SILVA, J.J.N.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; ANDRICOPOLU, A.D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, São Paulo, v.32, n°9, p.2444-2457, 2009.

LAGHOUATI, S.; VASSAL, G. Glucarpidase: a method of rescue from high dose methotrexate. *European Journal of Oncology Pharmacy*, Villejuif Cedex, v.2, n°1, p.20-22, 2008.

DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of American trypanosomes. *Journal of Biochemical Toxicology,* New York, v.7, p.159-204, 1985.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-Biological Interactions,* Amsterdam, v.73, p.1-27, 1990.

DOWELL, R.I.; SPRINGER, C.J.; DAVIES, D.H.; HADLEY, E.M.; BURKE, P.J.; BOYLE, F.T.; MELTON, R.G.; CONNORS, T.A.; BLAKEY, D.C.; MAUGER, A.B. New Mustard Prodrugs for Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy: Alternatives to the Amide Link. *Journal of Medicinal Chemistry*, New York, v.39, p.1100-1105, 1996.

FERREIRA, H.O. Fase aguda da doença de Chagas. *O Hospital*, v.61, p.307-311, 1962.

FERREIRA, H.O. Forma aguda da doença de Chagas tratada pela nitrofurazona. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,* São Paulo, v.3, p.287-289, 1961.

Ferreira H.O.; Prata A.; Rassi A. Administração prolongada de nitrofurazona no tratamento da doença de Chagas aguda. *O Hospital*, v.63, p.139-139,1963.

FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas. Disponível em: http: www.fiocruz.br/chagas. Acesso em: 10 de Novembro de 2009.

FLORENT, J.C.; DONG, X.; GAUDEL, G.; MITAKU, S.; MONNERET, C.; GESON, J.P.; JACQUESY, J.P.; MONDON, M.; RENOUX, B.; ANDRIANOMENJANAHARY, S.; MICHEL, S.; KOCH, M.; TILLEQUIN, F.; GERKEN, M.; CZECH, J.; STRAUB, R.; BOSSLETR, K. Prodrugs of anthracyclines for use in antibody-directed enzyme prodrug therapy**.** *Journal of Medicinal Chemistry*, New York, v.41, p.3572-3581, 1998.

FORSYTHE, K.H.; HOPFINGER, A.J. The influence of solvent on the secondary structure of poly (L-alanine) and poly (L-proline). *Macromolecules*, Washington DC, v.6, p.423-437, 1973.

FRANCO, M.A. Antimony oxidation states in antileishmanial drugs. *The American journal of tropical medicine and hygiene,* Deerfield Beach, v.52, p.435-37, 1995.

FRIEDLOS, F.; LEHOURITIS, P.; OGILVIE, L.; HEDLEY, D.; DAVIES, L.; BERMUDES, D.; KING, I.; MARTIN, J.; MARAIS, R.; SPRINGER, C.J. Attenuated SalmonellaTargets Prodrug Activating Enzyme Carboxypeptidase G2 to Mouse Melanoma and Human Breast and Colon Carcinomas for Effective Suicide Gene Therapy. *Clinical Cancer Research*, Philadelphia, v.14, n°13, p.4259-4266, 2008.

FRIIS, G.J.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P., LILJEFORS, T., MADSEN, U. *A textbook of drug design and development.* 2°Edição. Amsterdam: Harwood Academic, 1996. p.351-385.

GADELHA, A.A.M. *Avaliação do desempenho do Kit Eie – Recombinante – Chagas – Biomanguinhos frente ao ELISA convencional e ao teste de hemaglutinação indireta*. Recife: Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p.1–2.

GHAFFARIFAR, F.; JORJANI, O.; MIRSHAMS, M.; MIRANBAYGI, M.H.; HOSSEINI, Z.K. Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. *Eastern Mediterranean Health Journal,* Cairo*,* v.12, n°6, p.902 -908, 2006.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo,* v.7, n°3, p.338-349, 2004.

GREENE, T.W. *Protective groups in organic synthesis*. New York: John Wiley & Sons, 1981.

GRINGAUZ, A. *Introduction do medicinal chemistry: how drugs act and why.* New York: Wiley-VCH, 1997. p.265-230.

GUERRA, J.A.O.; RIBEIRO, J.A.S.; COELHO, L.I.A.R.C.; BARBOSA, M.G.V.; PAES, M.G. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.22, n°11, p.2319-2327, 2006.

HARDING, M.M. Geometry of metal ligand interactions in proteins. *Acta Crystallographica*, Denmark, v.57, p.401- 411, 2001.

HAY, S.; EVANS, R.M.; LEVY, C.; LOVERIDGE, E.J.; WANG, X.; LEYS, D.; ALLEMANN, R.K.; SCRUTTON, N.S Are the catalytic properties of enzymes from piezophilic organisms pressure adapted? *Chembiochem*: *a European Journal of chemical biology,* Weinheim*, v.10, n°14, p. 2348-2353,* 2009.

HEDLEY, D.; OLGIVIE, L.; SPRINGER, C. Carboxypeptidase G2-based gene-directed enzyme–prodrug therapy: a new weapon in the GDEPT armoury. *Nature Cancer Reviews*, London, v.7, p.870-879, 2007.

HERMANSON, G.T**.** *Bioconjugate techniques*. 2° Edição. New York: Academic Press, 2008. p.946-948.

HOLZ, R.C.; BZYMEK, K.P.; SWIERCZEK, S. Co-catalytic metallopeptidases as pharmaceutical targets. *Current Opinion in Chemical Biology,* Amsterdam, v.7, p.197–206, 2003.

HUEB, M.F.D. *Doença de Chagas*: *indicadores cognitivos, de transtorno orgânico cerebral, de uso de álcool e qualidade de vida*. São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006. p.20-23.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro, v.102 (Suppl. I), p.95-97, 2007.

KHAN, T.H.; AMOOQUAYE, E.A.; SEARLE, F.; BROWNE, P.J.; OSBORN, H.M.I.; BURKE, P.J. Novel Inhibitors of Carboxypeptidase G2 (CPG2): Potential Use in Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry,* New York, v.42, p.951-956, 1999.

KLUSÁK, V.; BAINKA, C.; PLECHANOVOVÁ, A.; MLCOCHOVÁ, P.; KONVALINKA, J.; RULÍSEK, L.; LUBKOWSKI, J. Reaction Mechanism of Glutamate Carboxypeptidase II Revealed by Mutagenesis, X-ray Crystallography, and Computational Methods. *Biochemistry*, Washington DC, v.48, p.4126–4138, 2009.

LAGHOUATI, S.; VASSAL, G.; DEMIRDJIAN, S. Glucarpidase: a method of rescue from high dose methotrexate. *European Journal of Oncology Pharmacy*, Praga, v.2, p.20-22, 2008.

LEU, Y. L; ROFFLER, S.R.; WANGCHERN, J. Design and Synthesis of Water-Soluble Glucuronide Derivatives of Camptothecin for Cancer Prodrug Monotherapy and Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT). *Journal of Medicinal Chemistry*, New York, v.42, p.3623 3628, 1999.

NAMBA, M.; SILVA, V.B.; SILVA, C.H.T.P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, São Paulo, v.33, n°4, p.13-24, 2008.

NICULESCU-DUVAZ, D.;NICULESCU-DUVAZ, I.; FRIEDLOS, F.; MARTIN, J.; LEHOURITIS, P.; MARAIS, R.; SPRINGER, C.J. Self-Immolative Nitrogen Mustards Prodrugs Cleavable by Carboxypeptidase G2 (CPG2) Showing Large Cytotoxicity Differentials in GDEPT. *Journal of Medicinal Chemistry*, New YorK, v.46, p.1690-1705, 2003.

NICULESCU-DUVAZ, I.; SPRINGER, C. J. Antibody-directed enzyme prodrug therapy(ADEPT): a review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Amsterdam, v.26, p.151–172, 1997.

MASTERSON, L.; SPANSWICK, V.; HARTLEY, J. A.; BEGENT, R.H.; HOWARDA, P.W.; THURSTONA, D.E. Synthesis and biological evaluation of novel pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine prodrugs for use in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Amsterdam, v.16; p. 252–256, 2006.

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; VASQUEZ, P.I.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, M. GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology*, New York, v.146, p.601–620, 2007.

MAYER, M.L.; OLSON, R.; GOUAUX, E. Mechanisms for ligand binding to GluR0 ion channels: crystal structures of the glutamate and serine complexes and a closed apo state. *Journal of Molecular Biology*, Cambridge, v.311, p.815-836, 2001.

MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafio e perspectivas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Itapema, v.23, suplemento I, p.41-44, 2004.

MEYER, I.F; KANESHIMA, E.N.; KANESHIMA, A.M.S. Alterações do sistema digestivo desencadeadas pelo quadro infeccioso do Trypanosoma cruzi . *CESUMAR*, Maringá, v.8, n°1, p.11-23, 2006.

MICHAEL, P.N.; CHESTER K.A.; MELTON, R.G.; ROBSON, L.; NICHOLAS, W.; BODEN, J.A.; PEDLEY, B.R.; BEGENT, R.H.J.; SHERWOOD, R.F.; MINTON, N.P. In vitro and in vivo characterisation of a recombinant carboxypeptidase GZ::anti-CEA scFv fusion protein. *Immunotechnology,* London, v.2, p.47-57, 1996.

MINTON, N.P.; ATKINSON, T.; SHERWOOD, R.F. Molecular Cloning of the Pseudomonas Carboxypeptidase G2 Gene and Its Expression in Escherichia coli and Pseudomonas putida. *Journal of Bacteriology,* Washington DC, v.156, n°3, p.1222-1227, 1983.

MOORE, M.L.; MILLER, C.S. Dicarboxylic Acid Derivatives of Sulfonamides. *Journal of the American Chemical Society*, Washington DC, v.64, n°7, p.1572-1576, 1942.

MORGON, N.H.; COUTINHO,K. *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. São Paulo: Livraria da física, 2007. p.489-497.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas´disease with nitrofuran compounds. *The Journal of Parasitology*, Danvers, v.38, p.30-40, 1952.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofuran compounds. *Antibiotics & Chemotherapy*, Basel, v.7, p.13-23, 1957.

Pan American Health Organization. Epidemiological profiles of neglected diseases and other infections related to poverty in latin America and the Caribean, 2009 Disponível em: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=1220&Itemid=1103. Acesso em: 18 de Setembro de 2010.

PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, M.M.C. Application of a Receptor Pruning Methodology to the Enoyl-ACP Reductase from Escherichia coli (FabI). *QSAR & Combinatorial Science,* Weinheim, v.25, n°7, p.629–636, 2006.

PIERCE, A.B. *Genética: Um enfoque conceitual*. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

POZAS, R.; CARBALLO, J.; CASTRO, C.; RUBIO, J. Synthesis and *in vitro* antitrypanosomal activity of novel Nifurtimox analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Amsterdan, v.15, n°1, p.1417-1421, 2005.

Programa Gaussian 03: Revision C.02. FRISCH, M. J., TRUCKS, G. W., SCHLEGEL, H. B., SCUSERIA, G. E., ROBB, M. A., CHEESEMAN, J. R., MONTGOMERY, JR., J. A., VREVEN, T., KUDIN, K. N., BURANT, J. C., MILLAM, J. M., IYENGAR, S. S., TOMASI, J., BARONE, V., MENNUCCI, B., COSSI, M., SCALMANI, G., REGA, N., PETERSSON, G. A., NAKATSUJI, H., HADA, M., EHARA, M., TOYOTA, K., FUKUDA, R., HASEGAWA, J., ISHIDA, M., NAKAJIMA, T., HONDA, Y., KITAO, O., NAKAI, H., KLENE, M., LI, X., KNOX, J. E., HRATCHIAN, H. P., CROSS, J. B., BAKKEN, V., ADAMO, C., JARAMILLO, J., GOMPERTS, R., STRATMANN, R. E., YAZYEV, O., AUSTIN, A. J., CAMMI, R.; POMELLI, C., OCHTERSKI, J. W., AYALA, P. Y., MOROKUMA, K., VOTH, G. A., SALVADOR, P., DANNENBERG, J. J., ZAKRZEWSKI, V. G., DAPPRICH, S., DANIELS, A. D., STRAIN, M. C., FARKAS, O., MALICK, D. K., RABUCK, A. D., RAGHAVACHARI, K., FORESMAN, J. B., ORTIZ, J. V., CUI, Q., BABOUL, A. G., CLIFFORD, S., CIOSLOWSKI, J., STEFANOV, B. B., LIU, G., LIASHENKO, A., PISKORZ, P., KOMAROMI, I., MARTIN, R. L., FOX, D. J., KEITH, T., AL-LAHAM, M. A., PENG, C. Y., NANAYAKKARA, A., CHALLACOMBE, M., GILL, P. M. W., JOHNSON, B., CHEN, W., WONG, M. W., GONZALEZ, C., POPLE, J. A. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

Programa GOLD: GOLD Suite Intuitive Protein-Ligand Docking Package, version 4.0 for Windows, The Cambridge Crystallographic Data Centre, UK, 2008.

Programa HyperChem: *HyperChem Program Release 7.5 for Windows*, Hypercube, Inc.: Gainesville, FL, 2003.

Programa *Marvin Beans*: Marvin Beans for the chemist's desktop, ChemAxon, US, 2008. Disponível em: http://www.chemaxon.com.

Programa MOLSIM: DOHERTY, D. *MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software. User's Guide*, version 3.0; The Chem21 Group Inc., 1997.

Programa PYMOL: DELANO, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. http://www.pymol.org.

RACE, P.R.; LOVERING, A.L.; GREEN, R.M.; OSSOR, A.; WHITE, S.A.; SEARLE, P.F.; WRIGHTON, C.J.; HYDE, E.I. Structural and Mechanistic Studies of *Escherichia coli* Nitroreductase with the Antibiotic Nitrofurazone: Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry,* Bethesda, v.280, n°14, p. 13256-13264, 2005.

RANDO, D.G. *Quimioterápicos potencialmente ativos em endemias tropicais e tuberculose: estudos de QSAR na série de 5-nitroderivados benzidrazídicos e o planejamento de pró-fármacos de ação prolongada*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2005.

RANDO, D.G.; SATO, D.N.; SIQUEIRA, L.; MALVEZZI, A.; LEITE, C.Q.F.; AMARAL, A.T.; FERREIRA, E.I.; TAVARES, L.C. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid [(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* Amsterdan, v.10, p.557-560, 2002.

RATH, S.; TRIVELLIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, São Paulo, v.26, n°4, p.550-555, 2003.

ROJAS, R.L.G. *Análise do transporte de glutamato e gaba em epimastigotas de* Trypanosoma cruzi. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2007. p.14-20.

ROWSELL, S.; PAUPTIT, R.A.; TUCKER, A.D.; MELTON, R.G.; BLOW, D.M.; BRICK, P. Crystal structure of carboxypeptidase G_2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy. *Structure,* London, v.5, n°3, p.337 - 347, 1997.

SHAHA, C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease Pathogenesis. The *Indian Journal of Medical Research,* New Delhi, v.123, p.233-244, 2006.

SDBS, Spectral Database for Organic Compounds. Base de dados espectrais. Código de acesso: NMRSDBS, No. 3001HSP-49-031. Disponível em: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi. Acesso em: 05 de Janeiro de 2009.

SELZER. P.M., CHEN, X., CHAN, V.J., CHENG, M., KENYON, G.L., KUNTZ, I.D., SAKANARI, J.A., COHEN, F.E., MCKERROW, J.H. *Leishmania major:* molecular modeling of cysteine proteases and prediction of new non-peptide inhibitors. *Experimental Parasitology,* New York, v.87, p.212–221, 1997.

SENKOVICH, O.; SCHORMANN, N.; CHATTOPADHAY, D. Structures of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of Trypanosoma cruzi in the folate-free state and in complex with two antifolate drugs, trimetrexate and methotrexate. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, Chester, v.65, p.704-716, 2009.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARCONDES, C.B.; GUEDES, L.A, SIQUEIRA, G.S.; BARONE, A.A.; DIAS, J.C.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J.E.; PERES, B.A.; ARRUDA JUNIOR, E.R. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v.33, p.351-357, 1991.

SILVA, L.M.R.; CUNHA, P.R. A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas – São Paulo (SP) e região: magnitude de problemas e desafios. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v.82, n°6, p.515-519, 2007.

SILVA, P. *Farmacologia*. 7° Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.1096-1098.

SILVA, T.H.A. Modelagem Molecular. *In*: ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J. *Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular*. São Paulo: Manole, 2003, p. 111-129.

SONODA, M.C. *Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2007. p.22 -24.

SPRINGER, C.J.; ANTONIW, P.; BAGSHAWE, K.D.; SEARLE, F.; BISSET,G.M.F.; JARMAN, M. Novel Prodrugs Which Are Activated to Cytotoxic Alkylating Agents by Carboxypeptidase G2. *Journal of Medicinal Chemistry*, New York, v.33, n°2, p.677-681, 1990.

SPRINGER, C.J.; NICULESCU-DUVAZ, I.; PEDLEYT, B.R. Novel Prodrugs of Alkylating Agents Derived from 2-Fluoro- and 3-Fluorobenzoic Acids for Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, New York, v.37, p.2361-2370, 1994.

STAUFFER, C.E.; ZEFFREN, E. Concerning the mechanism of ester hydrolysis by proteases. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v.243, n°13, p.3282-3284, 1970.

TESTA, B. Prodrug research: futile or fertile? *Biochemical Pharmacology,* Amsterdan, v.68, p.2097-2106, 2004.

TIETZE, L.F.; SCHUSTER, H.J.; KREWER, B.; SCHUBERT, I. Synthesis and Biological Studies of Different Duocarmycin Based Glycosidic Prodrugs for Their Use in the Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, New York, v.52, p.537–543, 2009.

TOKARSKI, J. S.; HOPFINGER, A. J. Prediction of Ligand-Receptor Binding Thermodynamics by Free Energy Force Field (FEFF) 3D-QSAR Analysis:Application to a Set of Peptidometic Renin Inhibitors. *Journal of Chemical Information and* Computer Sciences, Washington DC, v.37, p.792-811, 1997.

TORRES, F.D.; FILHO, S.P.B. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v.39, n°4, p.352-356, 2006.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, Amesterdan, v.19, n°11, p.495-501, 2003.

VALE, E.C.S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v.80, n.4, p.421-428, 2005.

VILLELA, M.M., SOUZA, J.M.B.; MELO, V.P.; DIAS, J.C.P. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em programa descentralizado: avaliação de conhecimentos e práticas de agentes municipais em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.23, n°10, p.2428-2438, 2007.

VOLPATO, J.P.; YACHNIN, B.J.; BLANCHET, J.; GUERRERO, V.; POULIN L.; FOSSATI, E.; BERGHUIS, A.M.; PELLETIER, J.N. Multiple conformers in active site of human dihydrofolate reductase F31R/Q35E double mutant suggest structural basis for methotrexate resistance. *Journal of Biological Chemistry*, Behtesda, v.284, n°30, p. 20079-20089, 2009.

WEINER, S.J.; KOLLMAN, P.A.; CASE, D.A.; SINGH, U.C.; GHIO, C. ALAGONA, G.; PROFETA, S.; WEINERL, P. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, Washington DC, v.106, p.765-784, 1984.

WERMUTH, C.G. *The practice of medicinal chemistry*. 2°Edição. London: Academic Press, 2008. p.218, 681, 682.

WERNER, A.B,; HEITMANN, I.G.; JERCIC, I.L.; JOTRÉ, L.M.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.H.; SAN MARTIN, A.M.V.; TORRES, J.H.; ZULANTAY, I.M.A. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. *Revista Chilena de Infectologia*, Santiago, v.25, n°3, p.289-292, 2008.

WESS, G.; URMANN, M.; SICKENBERGER, B. Medicinal chemistry: challenges and opportunities. *Angewandte Chemie International Edition*, Weinheim, v.40, n°18, p.3341-3350, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leihsmaniasis. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/print.html Acesso em: 17 de Setembro de 2010.

WOUTERS, M.A.; HUSAIN, A. Changes in Zinc Ligation Promote Remodeling of the Active Site in the Zinc Hydrolase Superfamily. *Journal of Molecular Biology*, Sydney, v.314, p.1191-1207, 2001.

XU, G.; MCLEOD, H.L. Strategie for enzyme prodrug cancer therapy. *Clinical Cancer Research.* Philadelphia, v.7, p.3314-3324, 2001.

ANEXO A

Relação das metodologias aplicadas nas tentativas de síntese dos pró-fármacos ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Síntese do hemissuccinato do composto ***1***

Metodologia 1 (Lui, Xie, 1987)

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 4 mmol de ácido succínico em THF anidro e, em seguida, 4 mmol de DCC. Agitou-se a mistura por 30 minutos para, então, adicionar-se 4 mmol de 4-hidroxi(5-nitrotiofen-2-ilmetileno)benzidrazida (nitroderivado ***1***) e 0,4 mmol de dimetilaminopiridina (DMAP). A reação foi mantida sob agitação e refluxo por 23 horas e acompanhada por cromatografia em camada delgada, utilizando-se como sistema eluente metanol/clorofórmio (1:9). O produto foi filtrado em bomba de vácuo, lavado com THF e então seco em bomba de alto vácuo.

Metodologia 2 (STAAB, 1962)

Em balão contendo ácido succínico (4 mmol), solubilizado em THF anidro, adicionou-se CDI (4 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora para, então, adicionar-se o nitroderivado ***1*** (4 mmol) e DMAP (0,4 mmol). A reação foi mantida sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente e acompanhou-se por CCD, utilizando como fase móvel metanol/clorofórmio (1:9). O produto obtido foi filtrado sob pressão reduzida e lavado com éter etílico gelado.

Metodologia 3

O nitroderivado ***1*** foi previamente tratado com solução alcoólica de etóxido de sódio para obtenção de seu respectivo fenolato sódico.

Em balão contendo este sal sódico (2 mmol) suspenso em clorofórmio : THF anidro na proporção equimolar de 1:1, adicionou-se o anidrido succínico (2 mmol), recém sublimado, e manteve-se a mistura reacional sob agitação por 4 horas a temperatura ambiente. Elevou-se a temperatura a 70 ^{o}C mantendo-se a reação sob refluxo por cerca de 19 horas. O sólido obtido foi filtrado a vácuo e mantido em dessecador contendo pentóxido de fósforo (Figura 10).

Metodologia 4

Em balão de fundo redondo, adaptado a condensador de refluxo, adicionou-se 2 mmol do fenolato sódico do nitroderivado ***1*** e 2 mmol de anidrido succínico recém sublimado à mistura de clorofórmio e THF na proporção molar de 1:1. A reação foi mantida sob refluxo e atmosfera inerte por 8 horas. O precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida.

Síntese do hemissuccinato do composto ***2***

Metodologia 1

Em balão contendo o 3-amino-4-metil(5-nitrofuran-2-ilmetileno)benzidrazida, nitroderivado ***2*** (2 mmol), dissolvido em solução de clorofórmio e THF na proporção molar de 1:1, adicionou-se o anidrido succínico recém sublimado (2 mmol)**.** Elevou-se a temperatura a 70 ^{o}C mantendo-se a reação por 23

horas sob atmosfera inerte. O sólido obtido foi filtrado a vácuo e mantido em dessecador contendo pentóxido de fósforo.

Metodologia 2

Em balão de fundo redondo contendo 15 mL de THF anidro, adicionou-se 2 mmol do nitroderivado ***2*** e 2 mmol de anidrido succínico sublimado. A reação foi mantida a 70° sob refluxo e atmosfera inerte por 23 horas. Filtrou-se a vácuo o produto obtido.

Metodologia 3 (MOORE, MILLER, 1942).

Transferiu-se para balão de fundo redondo 2 mmol do nitroderivado ***2*** adicionando-se, em seguida, 15 mL de metanol anidro. A solução foi mantida sob refluxo por 5 minutos e, então adicionou-se o anidrido succínico recém sublimado em excesso (2,16 mmol). Refluxou-se a mistura reacional por 50 minutos e o sólido formado foi filtrado a vácuo em funil de Buchner.

Metodologia 4 (Lui, Xie, 1987)

A um balão acoplado a condensador de refluxo, adicionou-se ácido succínico (4 mmol), DCC em proporção equimolar e 15 mL de THF anidro. A mistura mantida sob agitação por 30 minutos e, então, adicionou-se, o nitroderivado ***2*** (4 mmol) e DMAP (0,4 mmol). Manteve-se a reação sob agitação e refluxo por cerca de 23 horas e acompanhou-se por cromatografia de camada delgada, utilizando como sistema eluente: metanol: clorofórmio (1:9). O precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida e mantido em dessecador contendo sílica-gel.

Metodologia 5 (STAAB, 1962)

Transferiu-se para balão de fundo redondo 4 mmol de ácido succínico e 15 mL de THF anidro até total solubilização. Em seguida, adicionou-se CDI em proporção equimolar. A solução foi mantida sob agitação por 1 hora para, então, adicionar-se o nitroderivado ***2***. A reação foi mantida por 24 horas e o composto isolado por filtração reduzida em funil de Büchner.

Acoplamento do ácido glutâmico ao nitroderivado ***1*** succinoilado

Em balão contendo o nitroderivado ***1*** succinoilado (2 mmol), solubilizado em THF anidro, adicionou-se CDI (2 mmol). A reação foi mantida sob agitação e atmosfera inerte por 4 horas para então adicionar-se o ácido glutâmico (2 mmol) e DMAP (0,2 mmol). A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por mais 23 horas. O precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida.