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

# Antichagásicos potenciais: síntese de bases de Mannich do hidroximetilnitrofural

Gustavo Henrique Goulart Trossini

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2004

Gustavo Henrique Goulart Trossini

ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: SÍNTESE DE BASES DE MANNICH DO HIDROXIMETILNITROFURAL

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*Dedico este trabalho:*

*Aos meus pais, Claudio Trossini e Sonia Maria Goulart Tossini, exemplos de força de vontade e de viva.*

*Seu apoio, amizade, compreensão, amor, carinho, conselhos, força, estímulo e confiança foram essenciais para realização deste trabalho.*

*Muito Obrigado.*

*Aos meus irmão Thiago e Eduardo pelo carinho, força e apoio sempre presentes*

*À Danielle da Silva Pinheiro, pessoa que com todo Amor e carinho me dispôs seu ouvido, atenção e preocupação. Pelo seu Apoio, confiança e paciência. Se alegrando com minhas conquistas e incentivando a novas tentativas a qualquer resquício de falha. Tenha certeza, seu companheirismo e amizade forma muito importantes para realização desse trabalho.*

*"...Mas tudo isso não adianta nada, se nesta "selva obscura" e desvairada não se souber achar a bem-amada para viver um grande amor."*

*Vinicius de Morais*

*In memorian:*

*À Érika Kariza Gracia pela alegria de poder ter conhecido pessoa tão maravilhosa.*

*"Aonde vá, Onde quer que vá, toque a flauta da alegria como um doce menestrel...."*

*Oswaldo Monte Negro*

*In memorian:*

*À minha avó Miguela Luigi, saudades.*

# Agradecimentos

*Primeiramente a Deus, inteligência suprema, causa primária de todas as coisas, por me dar saúde e inteligência para realizar este trabalho.*

*À Profª. Titular Elizabeth Igne Ferreira, exemplo profissional e humano, que foi muito mais que uma orientadora, pelo aprendizado, estimulo constante, carinho, amizade e pelo crescimento científica que me proporcionou.*

*À amiga Profª. Drª Carla Maria de Souza Menezes pela convivência, conselhos e carinho, sugestões, preocupação e pela participação constante neste trabalho.*

*Ao Drº Marcio Henrique Zaim pelos ensinamentos, auxílio, sugestões e colaboração constante.*

*Às professoras Drª Veni Maria Felli Nakasone e Drª Maria Amélia Barata da Silveira pela convivência e assistência prestada.*

*À técnica, doutoranda Kátia C. A. Botelho pela convivência, auxílio em análises e amiga conquistada neste tempo.*

*Ao técnico Charles L. Brito pela convivência e colaboração.*

*À técnica Drª Maria Inês pelo suporte técnico.*

*Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo auxílio e colaboração.*

*Ao Prof. e amigo Drº Carlos Alberto Brandt pela convivência, auxílio nas análises de RMN, amizade conquistada, sugestões e por idas e vindas que envolvem siglas como "BC", "CN" entre outras.*

*Ao amigo Guilherme Costa Matsutani pela convivência os "galhos quebrados" e pela amizade conquistada nestes últimos três anos.*

*Ao amigo Hélio Santa Rosa Costa e Silva pela convivência, brincadeiras e por nossas discussões filosóficas.*

*À Kerly F. M. Pasqualoto pela amizade, sugestões e seu ótimo humor que é contagiante.*

*Aos amigos Diogo Oliuveira Silva e Iguatemi Costa por tantos auxílios, ensinamentos, sugestões e por que: "parceria não se compra no mercado".*

*À doutoranda Daniela Gonçales Rando pela convivências, sugestões e amizade conquistado.*

*Ao amigo Ms. Diogo Teixeira Carvalho pela agradável convivência e por tornar esse período mais divertido com seu "jeito minero de ser".*

*Aos amigos Ms. Michelle Carneiro Polli e Drº Roberto Parise Filho pela agradável convivência e por fazerem parte desta etapa da minha vida.*

*Aos estagiários do LAPEN pela convivência e colaboração.*

*Aos ex-alunos Ms. Nara L. Riccili e Drº Paulo B. Carvalho por muitos momentos de descontração e trabalho.*

*Aos colegas de trabalho Camila, Mauro e Ana Cláudia pela companheirismo nos momentos de estudo, convivência e compreensão.*

*Ao amigo Paulo Renato de Souza que muitas vezes parou para me houver e criticar, e principalmente pela amizade e bons momentos de descontração e que tornaram esses anos mais fáceis.*

*Ao amigo Jorge W. L. Nascimento pela convivência e por muitas vezes parar para me ouvir.*

*Ao amigo Alessandro de Carvalho Cruz pelos "bons papos" e companhia.*

*Aos novos amigos Julho e André que sempre estão por perto para um dialogo.*

*À Luciana Macedo Borges pela amizade conquistada e por participar de um momento tão importante de minha vida.*

*À amiga Roberta S. Moretti exemplo de que amigo é sempre amigo independente da hora ou da distância.*

*Aos meus avos Adélia Goulart Figueiredo e Joaquim Goulart Figueiredo pelo carinho, amor e pensamento positivo constante.*

*À minha tia Maria Ivete pelo carinho, preocupação, amor e força constante.*

*Aos amigos Alexandre, Rodrigo, Leo, Yuri, Marcelo, André e Maurício pelo estimulo.*

*À FAPESP pelo auxílio financeiro.*

*E a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.*

# RESUMO

*A doença de Chagas é endemia que afeta grande parte da América Latina. Estima-se que de 18 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita causador da doença e que ocorram, aproximadamente, 50.000 mortes relacionadas à doença de Chagas por ano, nos 21 países da área endêmica. O arsenal terapêutico atualmente usado contra a parasitose, constituído por apenas dois fármacos, é insuficiente, considerando-se, também, que ambos não apresentam ação adequada na fase crônica da doença. Em razão de se tratar de parasitose que acomete apenas países em desenvolvimento, o interesse na pesquisa de novos antichagásicos é consideravelmente baixo por parte dos países que se destacam na introdução de novos fármacos na terapêutica. Resta aos países envolvidos a procura por novas alternativas quimioterápicas. Face ao exposto e ante à alta atividade, em testes* in vitro *contra o* Trypanosoma cruzi, *do derivado hidroximetilado do nitrofural, intermediário de síntese de bases de Mannich, obtido em trabalhos anteriores, o objetivo do presente projeto foi sintetizar bases de Mannich desse derivado com aminoácidos lisina e arginina e o dipeptídio lisina-arginina resultante. Os compostos foram sintetizados utilizando-se métodos clássicos e alternativos e grupos protetores, normalmente utilizados na síntese de peptídios e outros, tentativamente empregados, como os grupos metílico e etílico. Em adição, experimentos foram efetuados com o objetivo de otimizar a síntese do hidroximetilnitrofural. Os derivados sintetizados foram analisados por IV, RMN* $^{1}H$ *e* $^{13}C$*, e alguns deles, também, por espectrometria de massas. Eles serão submetidos a testes* in vitro *em cultura de células infectadas com* T. cruzi *tão logo os grupos protetores sejam removidos. Além disso, serão efetuados testes de liberação para estudo da respectiva estabilidade. Dessa forma, esperam-se obter subsídios importantes para estudos mais aprofundados do seu mecanismo de ação e da possível mutagenicidade envolvida.*

# *SUMMARY*

*Chaga's disease is an endemic disease that affects most part of Latin America. About 18 to 20 million people are infected by the parasite and around 50 thousand deaths are related to Chagas' disease each year, in the 21 countries of endemic areas. The therapeutic armamentarium available against the disease is constituted by only two drugs and is insufficient, considering, also, that the drugs are not efficient in the chronic phase of the disease. As a parasitosis that only occurs in developing countries, the interest in the research for new antichagasic agents is considerably low in countries that are responsible for the introduction of new drugs in the therapeutics. So, the search for new chemotherapeutic alternatives is a task for the involved countries. In view of the situation and taking into account the high activity in* in vitro *tests against* Trypanosoma cruzi *showed by nitrofurazone hydroxymethyl derivative, an intermediary of Mannich bases reaction previously synthesized, the objective of this work was to synthesize its Mannich bases. The carriers used were aminoacids lysine and arginine and its dipeptide, lysine-arginine. The compounds were synthesized using classic and alternative methods and protecting groups, currently used in peptide synthesis and others temptatively employed, as methyl and ethyl groups. Also, many experiments were performed in order to achieve the optimization of hydroxymethylnitrofurazone synthesis. The derivatives synthesized were analyzed by IR, $^{1}H$ and $^{13}C$ NMR, and some also by mass spectrometry. They will be submitted to* in vitro *tests with cell infected with* T. cruzi *as soon as the protecting groups are removed. Besides, tests of drug release will be performed to study their stability. We expect to obtain important information toward better comprehension of their mechanism of action and possible mutagenicity involved.*

## *SUMÁRIO*

**I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

***1.1 INTRODUÇÃO*** 1

***1.2 OBJETIVOS*** 4

**II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

***2.1 DOENÇA DE CHAGAS*** 8

***2.1.1 Epidemiologia*** 8

***2.1.2 Ciclo evolutivo do*** *Trypanosoma cruzi* 12

***2.1.3 Transmissão da Doença de Chagas*** 13

***2.1.4 Manifestações Clínicas da Doença de Chagas*** 14

***2.1.5 Aspectos sócio-econômicos*** 16

***2.2 QUIMIOTERAPIA*** 17

***2.2.1 Tripanomicidas Atualmente Usados*** 17

***2.2.2 Tripanomicidas Em Estudo*** 20

**2.2.2.1 MEGAZOL** 20

**2.2.2.2 PRIMAQUINA** 21

**2.2.2.3 NITROFURAL** 22

***2.3 ALVOS BIOQUÍMICOS NA PESQUISA DE NOVOS ANTICHAGÁSICOS*** 23

***2.3.1 Tripanotiona Redutase*** 25

***2.3.2 Biossíntese de Esteróides*** 27

*2.3.3 Cisteína-Proteases* 29
*2.3.4 Metabolismo de Pirofosfato* 34
*2.3.5 Purinas* 35
*2.4 GÊNESE DE NOVOS FÁRMACOS* 36
*2.4.1 Modificação molecular* 37
2.4.1.1 LATENCIAÇÃO 37
*2.4.1.1.1 Bases de Mannich como Pró-fármacos* 43
*2.5 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS* 46
III. MATERIAL E MÉDODOS
*3.1 MATERIAL* 49
*3.1.1 Reagentes e Solventes* 49
*3.1.2 Equipamentos* 50
*3.2 MÉTODOS* 51
*3.2.1 Sínteses* 51
3.2.1.1 SÍNTESE DO HIDROXIMETILNITROFURAL 51
*3.2.1.1.1 Meio básico* 51
*3.2.1.1.2 Meio ácido* 51
3.2.1.2 ALQUILAÇÃO DO NITROFURAL 52
3.2.1.3 PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES DE AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS 52
*3.2.1.3.1 Preparação de ésteres de aminoácidos* 52
*3.2.1.3.2 Preparação do dipeptídeo Lys(ClZ)-(Tos)Arg-OMe.HCl* 55
3.2.1.4 SÍNTESE DE BASES DE MANNICH 56
*3.2.1.4.1 Síntese de base de Mannich utilizando NFOH e ésteres metílicos de aminoácidos* 56
*3.2.1.4.2 Síntese de base de Mannich partindo-se NF, LysOMe, ArgOMe e Lys-Arg (SRIDHAR et al. 2001)* 57
*3.2.2 Análises* 58
3.2.2.1 DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE FUSÃO 58

3.2.2.2 ANÁLISE NO INFRAVERMELHO (IV) 58
3.2.2.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS 58
3.2.2.4 ESPECTROMETRIA DE RMN $^{1}H$ e $^{13}C$ 58
3.2.2.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA 58
*3.2.2.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)* 58
*3.2.2.5.2 Cromatografia em coluna de sílica-gel* 58
IV. EXPERIMENTOS
4.1 *SÍNTESES* 59
*4.1.1 Síntese do hidroximetilnitrofural (NFOH)* 59
4.1.1.1 COM FORMALDEÍDO 59
4.1.1.2 TENTATIVA DE SÍNTESE COM PARAFORMALDEÍDO 65
4.1.2 *Tentativa de alquilação do NF* 66
*4.1.3 Preparação de ésteres de aminoácidos* 67
4.1.3.1 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA L-Arginina 67
4.1.3.2 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA L-Lisina 68
4.1.3.3 SÍNTESE DO ÉSTER ETÍLICO DO Boc-Lys(ClZ)-OH 68
4.1.3.4 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA ε-Boc-Lys-OH 69
*4.1.3.4.1 Método direto* 69
*4.1.3.4.2 Por meio de formação do sal sódico* 69
*4.1.3.4.3 Por meio de EDC/DMAP* 70
4.1.3.5 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA Lys E PROTEÇÃO DA AMINA ε POR MEIO DE CLORETO DE BENZOÍLA 70
4.1.3.6 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO Boc-Lys(ClZ)-OH E DESPROTEÇÃO DA AMINA α 71
*4.1.4 Síntese do dipeptídeo Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe* 71
*4.1.5 Síntese de bases de Mannich com aminoácidos* 72
4.1.5.3 SÍNTESE DA BASE DE MANNICH NF-Arg 72
*4.1.5.1.1 Tentativa de síntese de base de Mannich entre NFOH e Arg-OMe* 72
*4.1.5.1.2 Tentativa de síntese de base de Mannich entre NF e Arg-OMe em meio ácido* 72

*4.1.5.1.3 Síntese de base de Mannich entre NF e Arg-OMe 'in situ"* 73

**4.1.5.2 SÍNTESE DA BASE DE MANNICH NF-Lys-OEt** 73

*4.1.5.2.1 Tentativa de síntese de base de Mannich entre NFOH e Lys-OEt* 73

*4.1.5.2.2 Tentativa de síntese de base de Mannich entre NF e Lys-OEt* 74

*4.1.5.2.3 Síntese de base de Mannich entre NF e Lys-OEt* 74

*4.1.5.2.4 Síntese de base de Mannich entre NF e Lys-OEt "in situ"* 75

*4.1.6 Síntese da Base de Mannich com o dipeptídeo* 76

4.1.6.1 SÍNTESE DE BASE DE MANNICH NF-LYS(CIZ)-ARG(TOS)-OMe 76

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE 77

*5.1.1 Síntese do hidroximetilinitrofural* 77

5.1.2 *Tentativa de alquilação do NF* 86

5.1.3 *Preparação de ésteres de aminoácidos* 87

5.1.3.1 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA L-Arginina 87

5.1.3.2 TENTATIVA DE SÍNTESE DO ÉSTER ETÍLICO DA L-Lisina 89

5.1.3.3 TENTATIVA DE SÍNTESE DO ÉSTER ETÍLICO DO Boc-Lys(CIZ)-OH 91

5.1.3.4 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA ε-Boc-Lys-OH 92

5.1.3.5 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA LYS E PROTEÇÃO DA AMINA ε POR MEIO DE CLORETO DE BENZOÍLA 94

5.1.3.6 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO BOC-LYS(CIZ)-OH E DESPROTEÇÃO DA AMINA α 94

5.1.4 *Preparação do Dipeptídeo Lys(CIZ)-Arg(Tos)-OMe* 95

*5.1.5 Síntese de Bases de Mannich* 98

5.1.5.1 SÍNTESE DA BASE DE MANNICH NF-Arg 98

5.1.5.2 SÍNTESE DA BASE DE MANNICH NF-Lys 102

5.1.5.3 SÍNTESE DA BASE DE MANNICH NF-Lys(CIZ)-Arg(Tos)-OMe 104

VI. CONCLUSÕES PARCIAIS 106

VII. PERSPECTIVAS 107

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 108

# I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1.1 INTRODUÇÃO

Segundo estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças parasitárias representam a maior causa de morte humana em relação a qualquer outra doença (WHO, 2002). Em todo o mundo, aproximadamente 3 bilhões de pessoas são afetadas por protozoários ou helmintos patogênicos (TRACY, WEBSTER JR, 2001). Dentre todas as doenças parasitárias podemos destacar a doença de Chagas ou tripanossomíase americana, que tem como agente etiológico o protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem *Kinetoplastidae* e à família Trypanosomatidae.

A doença de Chagas, descoberta por Carlos Chagas há aproximadamente 90 anos, ainda representa grave problema de saúde pública, dada a sua distribuição por toda América Latina, que se constitui em grande área endêmica, e um dos mais graves problemas médico-sanitários (WHO, 2002). Embora eminentemente rural, a doença de Chagas, atualmente, é problema para os centros urbanos devido aos processos migratórios das populações rurais para as cidades, aumentando, assim, as formas de infecções não convencionais, como a transfusional.

Estima-se que existam entre 18 e 20 milhões de pessoas infectadas no continente Americano e que, aproximadamente, 100 milhões de pessoas estejam sob o risco de contaminação. Atualmente estima-se que existam cerca de 5 milhões de chagásicos o Brasil (WHO, 2002).

Aproximadamente 3 milhões de pessoas infectadas pela doença de Chagas desenvolvem complicações graves da doença, caracterizadas por cardiopatia chagásica crônica, lesões digestivas e distúrbios neurológicos causando 50 mil mortes por ano (WHO, 2002).

A maioria dos casos de infecção por *T. cruzi* em seres humanos ou de outros vertebrados se dá pelo contato direto de pele ou mucosa com fezes de

insetos hematófagos, no caso a fêmea do triatomíneo, contaminados com o *T. cruzi*. Contudo, apesar de existir mais de 100 espécies de triatomíneos, a maioria deles não tem importância epidemiológica. Apenas uma dezena comporta-se como vetor da doença. A freqüência de infecção dos seres humanos por transmissão através do vetor está relacionada com as condições de vida, nível sócio-econômico da população e com a natureza doméstica do vetor. A doença de Chagas é predominantemente rural, pois, nessas áreas, o baixo poder aquisitivo e as condições de moradia da população permitem o contato direto entre o triatomíneo infectado e o hospedeiro humano (SCHMUÑIS, 2000).

A terapêutica antichagásica atual compreende somente de dois fármacos: nifurtimox (Lampit®, Bayer) e benznidazol (Rochagan®, Roche). O nifurtimox, depois de amplamente utilizado no Brasil e em outros países latino-americanos, foi retirado da terapêutica (CANÇADO, 2000), encontrando-se, hoje, no Brasil, um único fármaco antichagásico disponível, o benznidazol. É importante ressaltar que ambos são ativos apenas na fase aguda da doença e, em se tratando de nitrocompostos, observa-se alta incidência de efeitos adversos. Essas observações mostram a grande importância do desenvolvimento de agentes antichagásicos realmente eficazes, principalmente na fase crônica da doença.

Vários compostos têm sido testados contra o *T. cruzi*, tanto em condições laboratoriais (*in vivo* ou *in vitro*), quanto em casos humanos na fase aguda ou crônica. O nitrofural [5-nitro-2-furfurilidenossemicarbazona], antibacteriano de amplo espectro, mostrou-se ativo contra o *T.cruzi* em ensaios *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE, BRENER, 1969; HENDERSON, 1988). Sintetizado com base no conhecimento de que tanto o ácido furóico como seus derivados alquilados e mercuriais apresentavam atividade bacteriostática (DODD, STILLMAN, 1944), foi empregado, inicialmente, durante a II Guerra Mundial, para o tratamento de queimaduras, apresentando amplo espectro de atividade antibacteriana (CRENSHAW *et al.*, 1976). Em razão da resistência bacteriana, o espectro de ação foi se modificando ao longo do tempo (KOROLKOVAS, 2003).

Os primeiros relatos da atividade antichagásica do nitrofural foram reportados na década de 1960 (ANDRADE, BRENER, 1969), quando se observou

a destruição do *T. cruzi* pelo fármaco. Mais tarde, verificou-se que compostos derivados de naftoquinonas e de nitrofuranos, incluindo o nitrofural, agiam por inibição da tripanotiona redutase, enzima do sistema antioxidante e peculiar, utilizado pelo parasita contra mecanismos defensivos do hospedeiro (HENDERSON, 1988).

O desenvolvimento de novos fármacos, hoje, é feito também por uma abordagem de planejamento racional, (planejamento com base na estrutura ou com base racional), a qual utiliza técnicas modernas, como química combinatória e modelagem molecular. Embora seja um método bastante atrativo, em muitos casos pode ser bastante oneroso. Dessa forma em se tratando de doenças que acometem população de baixo poder aquisitivo, como a doença de Chagas, a utilização desse planejamento pode não ser atrativo para as indústrias farmacêuticas. Não raro, a orientação da OMS, que recomenda proceder a modificações moleculares em fármacos já existentes, com o fim de promover melhorias nas propriedades, atividade e desempenho do fármaco no organismo (WHO, 2002). Deste modo, modificações moleculares apresentam-se como alternativa promissora no desenvolvimento de novos fármacos contra endemias tropicais. (KOLROKOLVAS, 1988; WERMUTH, 1996).

Entre os processos de modificação molecular, merece destaque a latenciação (CHUNG, FERREIRA, 1999; FRIIS, BUNDGAARD, 1996; BUNDGAARD, 1985) transformação do fármaco em forma de transporte inativo, denominada classicamente pró-fármaco, que, *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Mediante a escolha de grupos transportadores adequados, via de regra desprovidos de atividade biológica, permite a melhoria das propriedades farmacocinéticas, a diminuição da toxicidade e o aumento da seletividade. Nos casos em que o transportador apresenta atividade biológica, o composto resultante é denominado pró-fármaco recíproco (SINGH, SHARMA, 1994).

Entre os tipos de pró-fármacos possíveis, encontram-se as bases Mannich. Estas correspondem à reação de um substrato ácido – ácido carboxílico, amidas,

entre outras - contendo, no mínimo, um hidrogênio ativo, um aldeído, geralmente formaldeído, e uma amina. A reação de Mannich pode ocorrer por duas rotas, *in situ* ou em duas etapas, podendo-se isolar um composto intermediário hidroximetilado (TRAMONTINI, ANGIOLINI, 1989). Dois fatores despertam interesse na química das bases de Mannich: são compostos muito reativos, podendo ser transformados facilmente em numerosos outros compostos, constituindo-se, assim, em intermediários úteis na síntese de heterocíclicos, aminoácidos e outros derivados e, por introduzir uma função básica, permitem tornar os derivados solúveis em solventes aquosos, quando transformados em sais de aminas (NARVÁEZ, 1983). A utilização de bases de Mannich no desenvolvimento de novos antichagásicos foi explorada por CHUNG (1996), com a proposta de se sintetizar pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina. O intermediário de síntese dessas bases de Mannich do nitrofural, o hidroximetilnitrofural, mostrou alta atividade antichagásica e menor mutagenicidade que seu precursor, o nitrofural (CHUNG *et al.*, 2003; GÜIDO *et al.* 2000).

## *1.2 OBJETIVOS*

Face ao exposto e ante à escassez de alternativas quimioterápicas contra a doença de Chagas, representadas, atualmente, por apenas dois fármacos, nifurtimox e benznidazol, nenhum deles ativo na fase crônica da doença e apresentando alta incidência de efeitos adversos, é imperativa a busca por novos antichagásicos.

Utilizando-se a latenciação, CHUNG (1996) sintetizou série de pró-fármacos recíprocos seletivos de nitrofural e primaquina, tendo como grupos espaçantes aminoácidos e dipeptídios, estes últimos de liberação específica pela cruzipaína. A ação mista de inibição de tripanotiona redutase pelo nitrofural e de formação de radicais livres pela primaquina, além da cisão específica pela enzima só existente no tripanossoma foi a base para o planejamento desses derivados. Todos eles, incluindo os derivados dipeptídicos de primaquina (CHUNG *et al.*, 1997), mostraram-se ativos em cultura de células infectadas com *T. cruzi*. Como

intermediário da base de Mannich entre o nitrofural e o dipeptídio de primaquina, sintetizou-se o derivado hidroximetilado do nitro-heterocíclico. Este se mostrou o mais ativo de todos os derivados sintetizados (CHUNG *et al.*, 2003) e quatro vezes menos mutagênico que o composto de partida (GÜIDO *et al.*, 2000, 2001; CHUNG *et al.*, 2003). As Figuras 1 e 2 mostram a atividade desse pró-fármaco em amastigotas e tripomastigotas, respectivamente, e a Figura 3 apresenta a atividade mutagênica do NFOH comparativamente ao nitrofural. Houve decréscimo acentuado da porcentagem de amastigotas, a partir do décimo segundo dia do ensaio, e de tripomastigotas, a partir do décimo terceiro dia de ensaio e ligeiro aumento da porcentagem no décimo oitavo dia de ensaio. É importante ressaltar a eficácia em amastigotas, responsáveis pela fase crônica da doença.

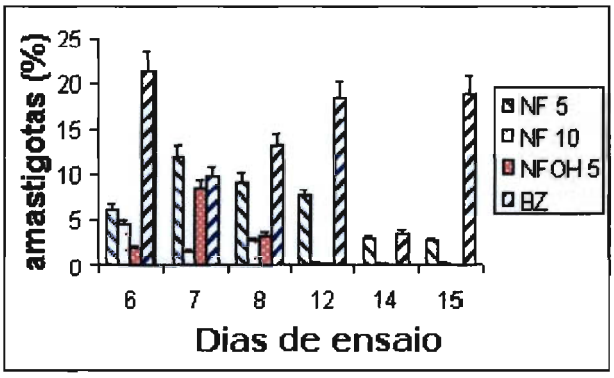



Figura 1 – Efeito do hidroximetilnitrofural (NFOH; 5 μM) em relação ao nitrofural (NF 5 e 10 μM) e benznidazol (BZ 10 μM) sobre a percentagem de formas amastigotas de *T. cruzi* em cultura de células LLC-$MK_2$ infectadas com apomastigotas após 6, 7, 8, 12, 14, 15 e 18 dias de infecção (CHUNG *et al.*, 2003).

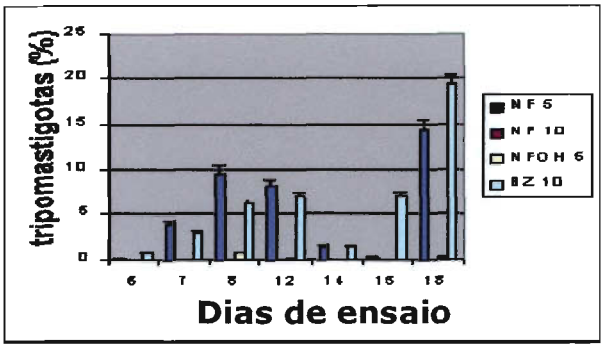



Figura 2 – Efeito do hidroximetilnitrofural (NFOH 5 μM) em relação ao nitrofural (NF 5 e 10 μM) e benznidazol (BZ 10 μM) sobre a percentagem de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em cultura de células LLC-$MK_2$ infectadas com tripomastigotas após 6, 7, 8, 12, 14, 15 e 18 dias de infecção (CHUNG *et al.*, 2003).

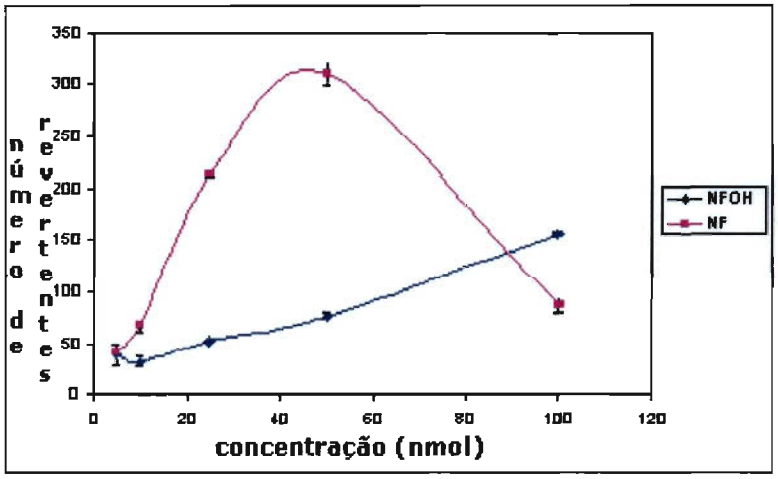



Figura 3 – Atividade mutagênica (*S. typhimurium* cepa TA98) do hidroximetilnitrofural (NFOH) em comparação a nitrofural (NF) (GÜIDO *et al.*, 2000).

Ante ao aspecto extremamente promissor do hidroximetilnitrofural, como apresentado anteriormente, e como apoio ao estudo posterior do comportamento desse pró-fármaco com vistas à explicação de sua alta atividade e baixa mutagenicidade, comparativamente ao protótipo, pretende-se sintetizar bases de Mannich desse pró-fármaco – comprovou-se a liberação de formaldeído por ultravioleta (CHUNG *et al.*, 2003). Como reagentes amínicos serão empregados lisina (Lys) e arginina (Arg) e o dipeptídio resultante (Lys-Arg). A Figura 4

apresenta nitrofural, hidroximetilnitrofural e as bases de Mannich propostas neste trabalho. Tais aminoácidos e o dipeptídio foram escolhidos com base na maior atividade mostrada pelo pró-fármaco recíproco de nitrofural e primaquina tendo como espaçante Lys-Arg (CHUNG, 1996).

Espera-se que as bases de Mannich derivadas do hidroximetilnitrofural, pela maior estabilidade que o protótipo, forneçam subsídio importante ao estudo posterior, mais aprofundado do seu mecanismo de ação e de mutagenicidade.

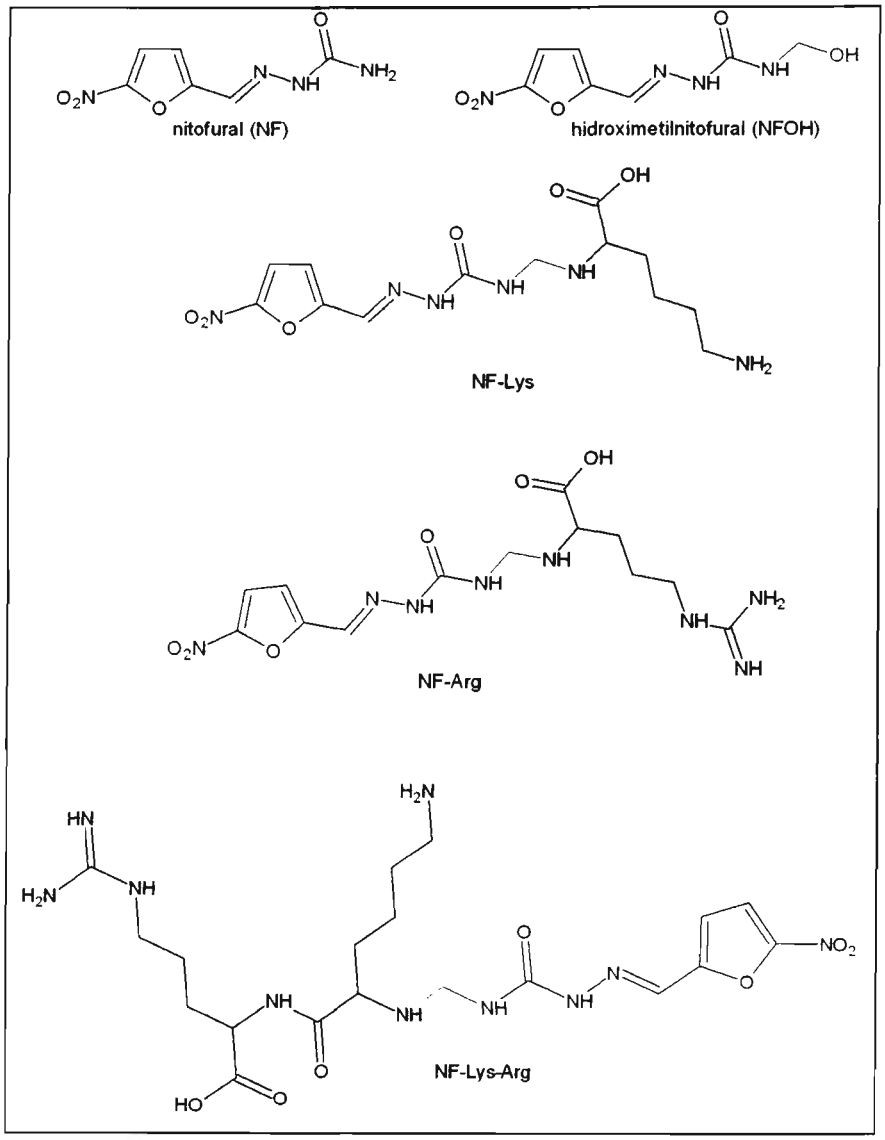



Figura 4 – Estruturas do nitrofural (NF), hidroximetilnitrofural (NFOH), e das bases de Mannich NF-Lys, NF-Arg e NF-Lys-Arg.

# II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 DOENÇA DE CHAGAS

### *2.1.1 Epidemiologia*

Descoberta em 1909, por Carlos Chagas, a tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma protozoose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, presente apenas no continente americano, principalmente entre pequenos mamíferos selvagens (LEWINSOHN, 1981; SILVA, 1985; BRENNER, 1989). O vetor para esse protozoário é o *Triatoma*, principalmente as espécies *T. infestans* e *T. dimidiata*, que são popularmente conhecidas como "barbeiro" (Figura 5), devido ao seu hábito de picar a face das pessoas. Fatores bioecológicos e sócio-econômicos levaram a população pobre das áreas rurais da América do Sul e Central a entrar em contato com o ciclo silvestre, no qual o parasita é transmitido por vetores naturais da infecção. Do ponto de vista de Saúde Pública, a importância da doença de Chagas reside no chamado ciclo doméstico (DIAS, 1992; WHO, 1999).

Figura 5 - Barbeiro (*Triatoma infenstans)*: inseto transmissor da Doença de Chagas.

Fonte: http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/pictures/triatoma_infestans.gif

O *T. cruzi* pode ser encontrado numa ampla área da América, da latitude 42N até a 46S, embora a distribuição dos vetores selvagens e reservatórios seja muito maior que a distribuição da doença humana. A "domiciliação" dos triatomíneos expõe cerca de 100 milhões de pessoas ao risco de infecção, do sul dos Estados Unidos da América (EUA) até a província de Chubut, Argentina (WHO, 1999; PESSOA, MARTINS, 1988; SILVA, 1985). Entretanto, as melhores condições de vida da população norte-americana e as condições das espécies locais de triatomíneos fazem com que a infecção humana pelo vetor seja extremamente rara nos EUA. Porém, face à intensa migração do México e América Central para os EUA, há, atualmente, cerca de 100.000 pessoas infectadas neste último (NICKERSON *et al.*, 1981; GRANT *et al.*, 1989). Nos 21 países endêmicos, estima-se que de 18 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita e que ocorram, aproximadamente, 50.000 mortes causadas pela doença de Chagas a cada ano (WHO, 1999; DIAS, 1992). A Figura 6 mostra a distribuição geográfica da parasitose, segundo dados do Departamento de Medicina Tropical e Doenças Infecciosas da Universidade de Munich, em 2001.

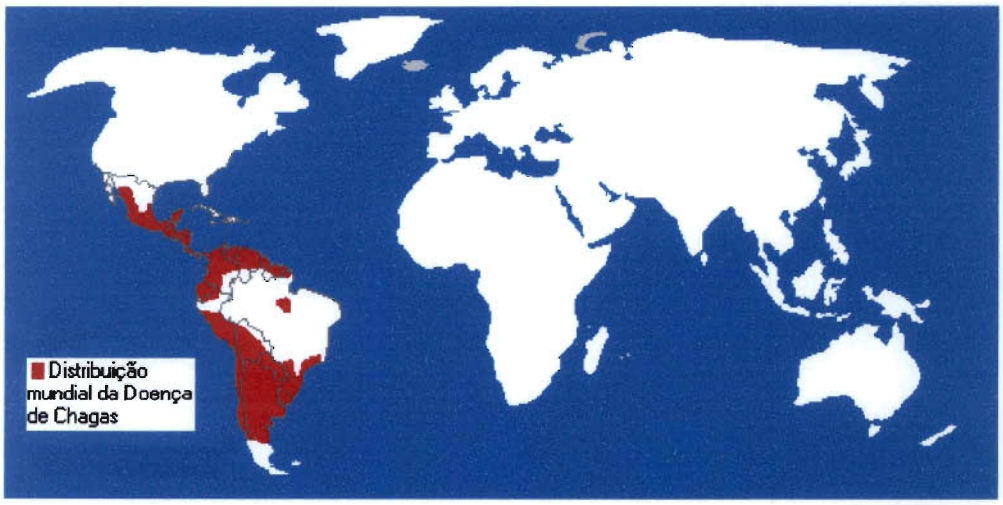



Figura 6 – Distribuição geográfica da doença de Chagas, em 2001.
Fonte: http://www.fit-for-travel.de/en/Krankheiten/chagas.htm.

Os movimentos migratórios rural-urbanos que ocorreram na América Latina nas décadas de 1970 e 1980 mudaram o perfil tradicional epidemiológico da doença de Chagas e a transformaram numa infecção urbana, que pode ser transmitida por transfusão sangüínea. A incidência de contaminado sangue em bancos de algumas cidades deste continente variam entre 3 a 53%. Tal dado mostra que a prevalência de sangue infectado por *T. cruzi* é maior que a do sangue infectado por HIV e hepatites B e C (WHO, 1999).

No Brasil, a doença espalha-se em área de 3,5 milhões de $km^2$, envolvendo 2.450 municípios e deixando sob risco 35 milhões de pessoas (DIAS, 1990, 1994). Até 1992, os dados do inquérito sorológico nacional estimavam prevalência de cerca de 5 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (DIAS, JATENE, 1992). Estas compreendiam, na maioria, indivíduos de origem rural e pertencentes aos níveis sócio-econômicos mais baixos, contaminados através de contato com fezes infectadas de triatomíneos. Estima-se que cerca de 300.000 pessoas encontravam-se infectadas na cidade de São Paulo e mais de 200.000 no Rio de Janeiro por via transfusional, uma vez que a transmissão vetorial foi controlada e inibida através de contínuos e intensivos Programas de Saúde Pública (DIAS, 1992).

A morbi-mortalidade da doença de Chagas no Brasil é significativa, vitimando 20% ou mais dos indivíduos infectados, que podem desenvolver cardiopatia chagásica crônica evolutiva, capaz de matar, no mínimo, 15.000 pessoas/ano em nosso País (DIAS, JATENE, 1992). Uma vez que a fase aguda não é facilmente detectada, a mortalidade de 8% não foi mais considerada relevante frente à fase crônica. As formas digestivas continuam importantes, especialmente no Brasil Central, acometendo entre 5 a 15% dos infectados crônicos (DIAS, 1990; DIAS, JATENE, 1992).

A doença de Chagas não é um problema isolado da população latino-americana. Nas áreas endêmicas, está intimamente relacionada com as doenças "sociais" típicas, como desnutrição, diarréia, tuberculose e outras parasitoses. O risco de contrair a doença de Chagas está diretamente relacionado à pobreza: o inseto triatomíneo, ou, se alimenta de sangue e encontra ambiente favorável em

frestas de paredes e telhados de habitações pobres em áreas rurais e em favelas localizadas na periferia urbana. A Figura 7 mostra a diminuição na incidência da transmissão do *T. cruzi* via triatomíneo, em crianças e jovens adultos entre os anos 1993-1999, registrando-se decréscimo considerável da mesma no caso, especialmente, do Brasil, com perspectivas de eliminação dessa forma de transmissão no ano 2000. No entanto, cabe ressaltar a preocupação de que, com essa possibilidade, se arrefeçam as medidas de controle, como ocorreu com a malária na década de 1950, e a transmissão por essa forma ressurja com toda a força.

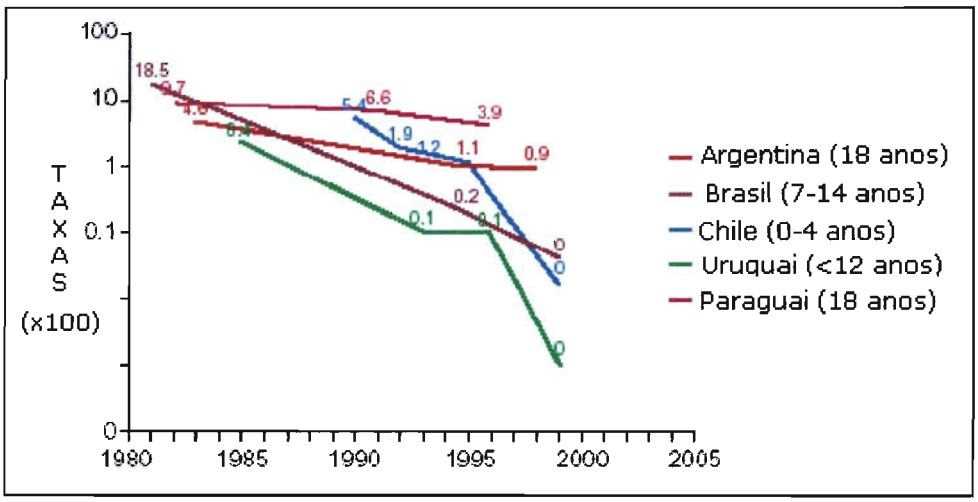



Figura 7 – Eliminação da transmissão por triatomíneos no período de 1980 a 2000 nos países do Cone Sul. No eixo y aparecem as taxas de contaminação de acordo com a faixa etária, especificada para cada país, e de acordo com o período.

Fonte: Reports by National Chagas´ Disease Control Programmes, 1993-1999

### 2.1.2 *Ciclo evolutivo do T. cruzi* (DIAS, 1992)

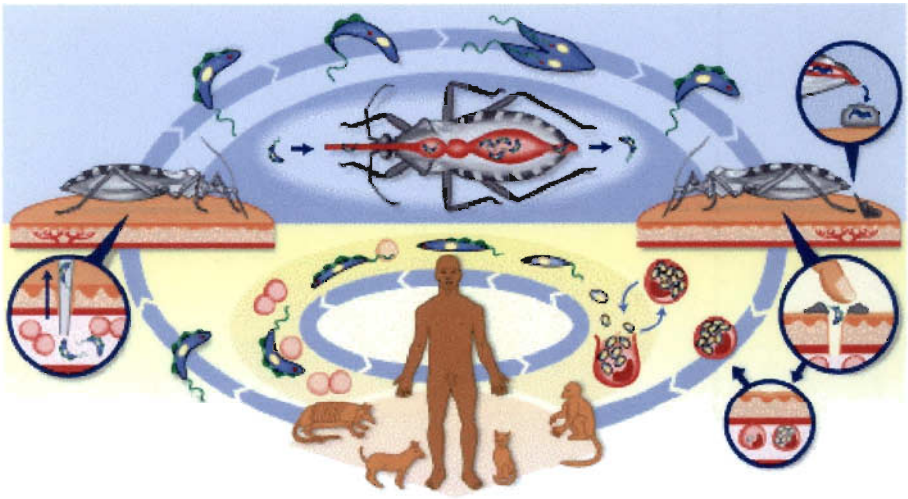


Figura 8 – Ciclo biológico do *T. cruzi.*
Fonte: (WHO, 2003).

O ciclo biológico do *T. cruzi* inicia-se pela ingestão, pelo vetor triatomíneo, de sangue infectado contendo as formas tripomastigotas do parasita. Os parasitas ingeridos sofrem diferenciação para a forma epimastigota no lume intestinal do inseto, local onde ocorre a proliferação parasitária. Os parasitas, ao atingir a parte posterior do intestino do inseto vetor, modificam-se para formas tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes do parasita. Estas são eliminadas pelas fezes e urina do triatomíneo. A infecção pelo *T. cruzi* tem início quando os parasitas eliminados pelo inseto entram em contato com uma lesão na pele ou mucosa do vertebrado. A maneira mais comum de transmissão é a vetorial, através da picada do "barbeiro", que, durante a ingestão de sangue, deposita suas fezes próximas ao local da picada. A picada provoca irritações locais, facilitando o acesso do parasita ao interior do organismo. Caso a picada seja próxima aos olhos ou à boca, o parasita pode penetrar pelas mucosas. Dentro do organismo do vertebrado as formas tripomastigotas metacíclicas do parasita passam por

transformação para as formas amastigotas, reproduzindo-se por fissão binária. O hospedeiro apresenta hipersensibilidade no local de entrada do parasita com intensa destruição celular. Esta faz com que formas amastigotas se transformem em tripomastigotas, que são liberadas nos vasos periféricos e estarão aptas para infectar novas células em outros pontos do organismo, como músculos lisos e tecido nervoso. Assim, a transformação de amastigotas para tripomastigotas pode ocorrer em outros pontos do organismo, continuando o ciclo da infecção. Com a picada do hospedeiro por um novo agente vetor não contaminado e a ingestão de formas sanguíneas do parasita, junto com sangue do hospedeiro, essas se transformam em formas fusiformes denominadas epimastigotas. Estas se desenvolvem no aparelho digestivo do parasita e são transmitidas a outros indivíduos vertebrados por meio das excretas do inseto vetor contaminado, ou se estabelecem em reservatórios naturais.

### 2.1.3 *Transmissão da Doença de Chagas*

A doença de Chagas tem como principal forma de transmissão a vetorial, principalmente em áreas endêmicas, na qual a contaminação acontece por meio do inseto vetor. Este é hematófago e suga o sangue do possível hospedeiro, depositando fezes contendo parasitas, quando contaminado. As fezes, próximas do local da picada, levam, muitas vezes, à infecção pelo *T. cruzi*. O triatomíneo suga o sangue, não só do homem, mas também de animais e aves domésticas, visto que habitam também currais e galinheiros, infectando diversos vertebrados. Estes, muitas vezes, acabam se comportando como reservatórios naturais do parasita. A contaminação por *T. cruzi*, no entanto não está relacionada unicamente ao inseto vetor. Outros modos de contaminação, ditos secundários ou alternativos, são amplamente discutidos entre a comunidade científica, como a transfusão sanguínea, transmissão congênita, acidental ou em transplantes de órgãos (WENDEL *et al.*, 1992; VINHARES, DIAS, 2000).

O *T. cruzi*, em sua forma de transmissão vetorial, circula em dois ciclos: o silvestre e o doméstico. O ciclo silvestre envolve a interação entre vetores

silvestres e hospedeiros mamíferos. O ciclo silvestre apresenta equilíbrio ecológico entre o parasita, seus vetores e hospedeiros silvestres. Os principais hospedeiros silvestres são: gambás, tatus, roedores e primatas, os quais se comportam como reservatórios do parasita, co-existindo com o mesmo sem serem afetados por ele. Já o ciclo doméstico está associado ao contato entre humanos e vetores, causado por condições sócio-econômicas, que permitem a colonização do vetor em ambiente doméstico. A parasitose, neste último ciclo, leva a graves danos ao hospedeiro humano, principal reservatório deste ciclo, seguido por gatos e cachorros.

A transfusão sanguínea apresenta-se como o segundo mecanismo mais freqüente de transmissão da doença de Chagas, levando à contaminação em áreas não-endêmicas e sugerindo o aparecimento da doença em países fora da América Latina. No Brasil, o controle da transmissão transfusional da tripanossomíase americana vem reduzindo essa forma de contaminação. Hoje, entre 70 e 85% do sangue transfundido no País passa por controle de qualidade visando ao controle, não só da doença de Chagas, mas também de outras doenças que possam vir a serem transmitidas por sangue contaminado (BONAMETTI *et al.,* 1998).

### *2.1.4 Manifestações Clinicas da Doença*

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas distintas: a fase aguda e a fase crônica. Os primeiros sintomas da fase aguda se apresentam, geralmente, entre 7 a 10 dias após a infecção pelo parasita. No local de entrada do parasita ocorre um processo inflamatório, o qual nem sempre é visível. Porém, em infecções pela mucosa ocular, observa-se um sinal característico da fase aguda da doença de Chagas, denominado sinal de Romaña (Figura 9) que consiste no inchaço de ambas as pálpebras do olho infectado. Quando a infecção ocorre através da pele, o sinal característico é o chagoma, que corresponde ao inchaço do local por onde o

parasita entrou. A fase aguda da doença apresenta como sintoma mais comum febre, podendo também ocorrer inchaço de gânglios linfáticos, hepato e esplenomegalias e edema localizado ou generalizado. O comprometimento cardíaco é muito raro nesta fase da doença (WENDEL *et al.*, 1992; SILVA, 1999).

Figura 9 - Paciente com sinal de Romaña.
Fonte: http://woub.org/intouch/Tropical_Disease/a_Chagas-Romana.jpg

A fase aguda da doença pode durar de 1 mês a 1 ano, podendo o paciente evoluir para a fase crônica ou indeterminada. Os pacientes que passam à fase indeterminada não apresentam quaisquer dos sintomas característicos da doença, podendo, inclusive, nunca vir a manifestá-los (WENDEL *et al.*, 1992).

Cerca de um terço dos casos agudos da doença de Chagas evolui para a fase crônica. Esta fase de baixa parasitemia e afebril permanece ao longo da vida do paciente. É representada por diversas formas clínicas, afetando um ou mais órgãos de forma irreversível, destacando-se as alterações cardíacas como as principais. A cardiopatia crônica e o aparecimento dos megas, megaesôfago e megacólon, principalmente, representam formas clínicas de considerável gravidade (SZAJNMAN *et al.*, 2000).

A forma cardíaca apresenta como principais sintomas a arritmia, a insuficiência cardíaca e o trombo-embolismo. As manifestações digestivas

ocorrem pelo comprometimento das funções do órgão afetado. No caso do megaesôfago, observa-se aumento do diâmetro do órgão e alterações na motilidade, além de sintomas como dores epigástricas, regurgitação e hipertrofia das glândulas salivares. O megacólon apresenta como principal característica a obstipação do órgão, que pode durar semanas (WENDEL *et al.*, 1992).

A prevalência das manifestações digestivas ou cardíacas na doença de Chagas depende principalmente da região endêmica. É comum encontrar casos de megaesôfago na região central do Brasil, sendo essa manifestação rara em outras áreas. Já no Chile, a forma cardíaca é extremamente rara. Alguns estudos relacionam a cepa do parasita encontrada em cada região com o tipo de manifestação clinica observada na fase crônica, porém ainda não existem evidências bioquímicas concretas que expliquem essas observações (ANDRADE, ANDRADE, 1979).

### *2.1.5 Aspectos sócio-econômicos*

A média anual de renda doméstica *per capita* na América Latina é de US$ 2,966. Portanto, a perda econômica para o continente devido à incapacidade e mortalidade precoce, provocada por essa doença em adultos jovens e economicamente mais produtivos, é em torno de US$ 8,156 bilhões, o que equivalia a 2,5% da dívida externa total do continente em 1995 (WHO, 1999). No Brasil, considerando-se que pelo menos 10% dos indivíduos infectados desenvolvem doenças cardíacas graves, ou comprometimento digestivo crônico, os custos médicos para o tratamento podem alcançar US$ 250 milhões e a ausência no trabalho dos chagásicos com graves problemas cardíacos pode representar perdas mínimas de US $5,625 bilhões por ano (DIAS, 1992).

## 2.2 QUIMIOTERAPIA

### 2.2.1 Tripanomicidas atualmente usados

Apesar da tendência de se evitar a presença de grupos nitro-aromáticos como componente estrutural de derivados potencialmente ativos porque eles podem provocar metemoglobinemia, tais compostos têm sido usados na terapêutica desde 1944 (ROSS, 1980; DOCAMPO, MORENO, 1985).

Os tripanomicidas atualmente em uso – nifurtimox e benznidazol (Figura 9) – causam efeitos adversos graves e são pouco eficazes na fase crônica da doença. Além disso, algumas cepas de *T. cruzi* mostram-se a eles resistentes (FILARDI, BRENER, 1987).

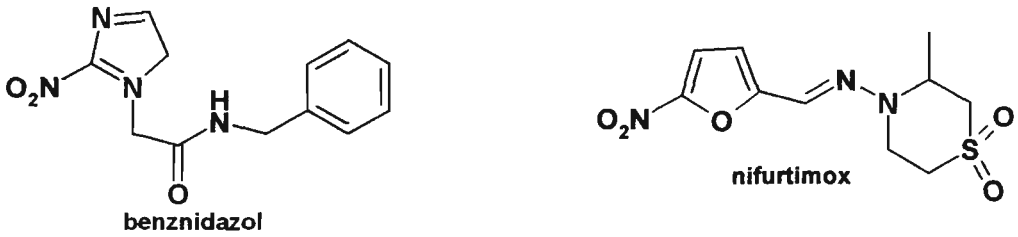



Figura 9 – Tripanomicidas em uso.

O *nifurtimox,* derivado 5-nitrofurano, foi sintetizado, em 1964, por Herlinger *et al.*, sendo mais ativo contra as cepas argentinas e chilenas do tripanossoma e muito mais eficaz na fase aguda da doença. Inibe tripomastigotas e amastigotas, mas apresenta graves efeitos adversos, como anorexia, nauseas, epigastralgias, convulsões, polineuropatias periféricas e manifestções cutâneas(ROSS, 1980; KOROKOLVAS, 2003).

O *benznidazol* (derivado 2-nitroimidazol) foi descoberto por pesquisadores da Hoffman-La Roche, em 1969, e é considerado fármaco de escolha para tratamento das tripanossomíases brasileiras. Analogamente ao nifurtimox, é mais eficaz na fase aguda e apresenta efeitos adversos graves, como astemia, tonturas, parestemias, polineuropatias periféricas hematopoese (ROSS, 1980; KOROKOLVAS, 2003).

Esses compostos apresentam mecanismo de ação citotóxica, que inicialmente envolve uma ou mais reações de redução do grupo nitro, seguidas por inibições de várias enzimas, que são necessárias às exigências energéticas da célula do parasita (ROSS, 1980; DOCAMPO, MORENO, 1985; DOCAMPO, 1990; GRINGAUZ, 1997; KOROKOLVAS, 2003). Em geral, o primeiro passo do metabolismo desses compostos é a redução desse grupo ao correspondente ânion nitro radical. Sob condições anaeróbias, esse radical pode sofrer redução, gerando derivados nitrosos, hidroxilaminas e aminas (LA-SCALEA, 1998).

O nitro radical aniônico e o derivado hidroxilamínico são os principais intermediários responsáveis pela ação citotóxica de alguns nitro-heterocíclicos (LA-SCALEA, 1998). As propriedades farmacológicas desses compostos podem ser relacionadas com os valores de potencial de redução (GUISSANI *et al.*, 1990; ROZENSKI, DE RANTER, VERPLANKEN, 1995; VIODÉ *et al.*, 1997).

O nifurtimox age diretamente, por meio da formação de radicais livres intermediários, quimicamente reativos, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio. Em contato com o *T. cruzi*, ocorre redução do nifurtimox, aparentemente catalisada por uma nitrorredutase ligada a flavina, e forma-se um radical nitro. Resultados mostram a existência de boa correlação entre os valores de $E^1{}_7$ (potencial de redução pra formação do nitroradical) e as constantes de velocidade de reação de redução de nitro-heterocíclicos por flavoproteínas (LA-SCALEA, 1998). Estudos de MORENO *et al.* (1983) demonstraram a presença do nitro radical aniônico como metabólito de nitrocompostos. Este radical reage com $O_2$ e gera um ânion superóxido, que, então, formará o peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou sob efeito catalítico da enzima superóxido dismutase. O passo final é a formação de radicais hidroxilas por reações catalisadas por $Fe^{3+}$. A Figura 10 apresenta esquematicamente as reações compreendidas.

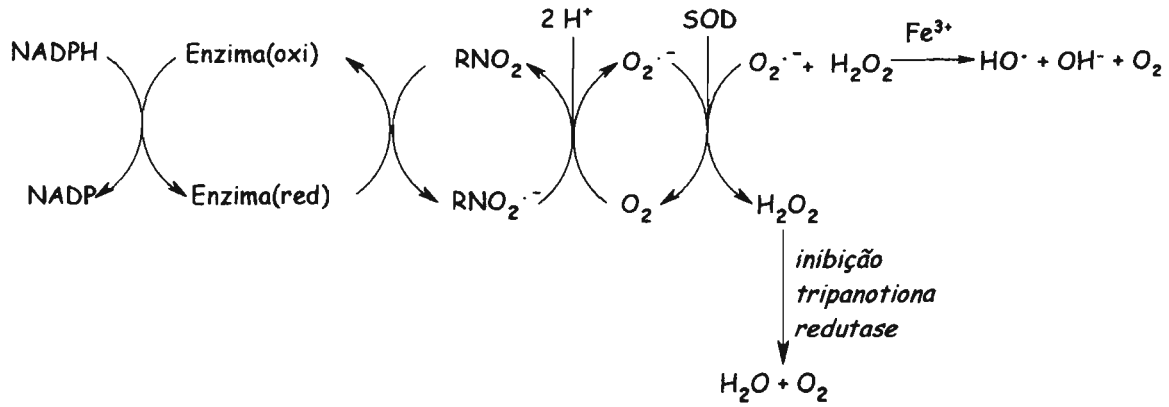



Figura 10 – Mecanismo de formação de radicais livres por nitro-heterocíclicos. (MORENO *et al.*, 1983).

Os radicais livres são bastante danosos para as células e, uma vez gerados, podem interagir com vários componentes celulares e propagar seus efeitos deletérios. No caso do *T. cruzi,* devido à sua deficiência de catalase e glutationa peroxidase, o parasita é extremamente vulnerável ao peróxido de hidrogênio. As células dos mamíferos, ao contrário, têm várias enzimas, como catalase, peroxidase e superóxido dismutase, que previnem o efeito letal dos radicais livres (DOCAMPO, MORENO, 1985; KOROLKOVAS, 1988; TSUHAKO *et al.*, 1989; DOCAMPO, 1990; GRINGAUZ, 1997).

Experimentos demonstraram que os produtos de redução do grupo nitro interagem com ácidos nucléicos *in vitro* e acredita-se que o DNA seja o principal alvo *in vivo* (DECLERCK, DE RANTER, 1986, 1987). Tanto DNA na forma de dupla hélice quanto o desnaturado sofrem ação dessa classe de fármacos (LA-SCALEA, 1998).

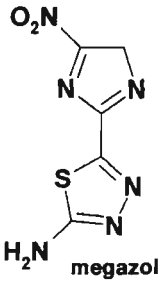
O grau da lesão sobre o DNA depende da estabilidade dos intermediários de redução do fármaco (ZAHOOR *et al.*, 1987; VIODÉ *et al.*, 1997) e responde a diferenças de reatividade (EDWARDS, 1993). Desta forma, quanto mais positivo o potencial de redução para formação do radical nitro maior sua citotoxicidade (EDWARDS, 1990; LA-SCALEA, 1998). Fármacos que apresentam valores de potencial muito negativos estão mais sujeitos à influência de pequenas quantidades de $O_2$. Isto explica porque muitos nitrofuranos são facilmente

reduzidos tanto em células aeróbicas quanto anaeróbicas, com conseqüente perda de seletividade, em contraste aos nitroimidazóis, que apresentam maior toxicidade em sistemas anaeróbicos (EDWARDS, 1990; CHUNG, 1996; TOCHER, 1997), como resultado da menor sensibilidade ao $O_2$, provocada pelos potenciais altamente negativos que apresentam.

## 2.2.2 Tripanomicidas em estudo

Ao longo dos anos, diversas classes de compostos vêm sendo pesquisadas com o fim de se desenvolver um novo agente antichagásico. Há vários nitro-heterocíclicos com alta atividade antichagásica, sem, contudo, apresentar utilidade terapêutica, face aos efeitos adversos graves que apresentam. Entre eles encontram-se o nitrofural (nitrofurazona) e o megazol. Também, a primaquina, de emprego como antimalárico na terapêutica (KOROLKOVAS, 2003), apresenta atividade antichagásica.

### 2.2.2.1 MEGAZOL

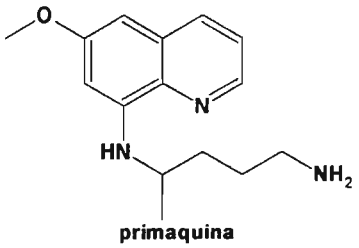



O megazol [2-amino-5,1-metil-nitro-2-imidazolil-1,3,4-tiadiazol], derivado nitrotiazólico, foi sintetizado em 1960. Apresenta-se como potente antimicrobiano de amplo espectro, tendo ação em grande variedade de protozoários e bactérias (BERKELHAMMER, ASATO, 1968; CANSADO, 1980).

Ensaios realizados mostraram alta atividade antichagásica do megazol em relação a outros nitro-heterociclicos (BRENER, 1999), apresentando atividade curativa em infecções causada por várias cepas do *T. cruzi*, incluindo cepas resistentes aos fármacos empregados hoje na terapêutica, nifurtimox e

benznidazol (FILARDI, BRENER, 1982). Sua atividade apresenta-se superior à atividade do nifurtimox e à do benznidazol (DE CASTRO, MEIRELLES, 1986; LAGES-SILVA *et al.*, 1990).

#### 2.2.2.2 PRIMAQUINA




primaquina

A primaquina é fármaco de uso na quimioterapia da malária, representando o único esquizonticida tecidual disponível na terapêutica (KOROLKOVAS, 2003). Sua atividade antichagásica experimental foi relatada inicialmente por JARPA (1950) e por RUBIO e PIZZI (1954). Contudo, seu emprego na quimioterapia antichagásica não é usual.

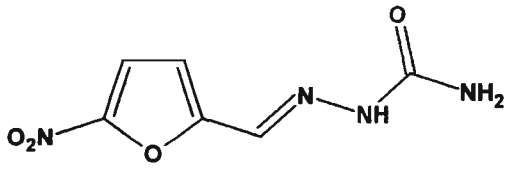
Inicialmente, esse fármaco era considerado de ação primária em formas tripomastigotas extracelulares (PEREIRA DA SILVA, KIRCHNER,1962). Posteriormente, sua ação em formas intracelulares foi relatada por McCABE (1988). Esse mesmo estudo permitiu a comprovação do efeito sinérgico entre a primaquina e o cetoconazol, surgerindo a utilização desse fármaco associado ou não no tratamento da doença de Chagas em sua fase crônica.

Derivados peptídicos de primaquina mostraram-se ativos tanto em formas amastigotas quanto em tripomastigotas em ensaios *in vitro*, em culturas de células infectadas com *T. cruzi* (CHUNG *et al.*, 1997).

Ensaios *in vitro* da associação da primaquina com nitrofural mostraram efeito sinérgico da mesma (GONÇALVES *et al.*, 1994). Por outro lado, pró-fármacos recíprocos utilizando espaçantes pectídicos, aminoácidos e dipeptídios, ou não-peptídicos da primaquina e nitrofural, mostraram-se ativos em células infectadas por *T. cruzi* (CHUNG,1996). Outra associação da primaquina é aquela proposta por POLLI (2003), por meio de pró-fármacos recíprocos de primaquina e megazol.

### 2.2.2.3 NITROFURAL

O nitrofural [5-nitro-2-furfurilidenossemicarbazona] foi sintetizado com base no conhecimento de que o ácido furóico, bem como seus derivados alquilados e mercuriais, apresentavam atividade bacteriostática (DODD, STILLMAN, 1944). Tal derivado mostrou-se ativo contra bactérias Gram-positivas e negativas.




**nitrofural**

Este fármaco foi empregado, inicialmente, durante a II Guerra Mundial, para o tratamento de queimaduras, apresentando amplo espectro de atividade antibacteriana (CRENSHAW *et al.*, 1976). Em razão da resistência bacteriana, o espectro de atividade foi se modificando ao longo do tempo (KOROLKOVAS, 2003).

A toxicidade desse nitrofurano é alta por via oral, em razão da hemólise e neuropatia graves que provoca. Em alguns países foi retirado do mercado e em outros continua a ser empregado apenas por via tópica, sendo de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas da pele -- feridas, queimaduras e úlceras --, especialmente aquelas resistentes a outros fármacos (KOROLKOVAS, 2003).

A atividade contra o *T. cruzi* foi reportada primeiramente por PACKCHANIAN (1952, 1957). Em 1969, ANDRADE e BRENER observaram que o nitrofural provocava destruição do *T. cruzi*. Mais tarde, em 1988, HENDERSON e colaboradores constataram a inibição de naftoquinonas e nitrofuranos, incluindo o nitrofural, sobre a tripanotiona redutase.

A formação do nitro radical aniônico a partir do nitrofural foi comprovada por meio de geração eletroquímica, com o uso de eletrodo de carbono vítreo (LASCALEA, CHUNG, FERREIRA, 1999).

Em 1994, GONÇALVES e colaboradores identificaram potenciação da atividade do nitrofural em associação com primaquina, quando ensaiado em cultura de células LLC-MK2, infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, como anteriormente mencionado.

O intermediário de síntese de bases de Mannich com peptídios de primaquina e nitrofural, o hidroximetilnitrofural (CHUNG, 1996), mostrou-se mais ativo e menos tóxico do que o nitro-heterocíclico de partida, ressaltando o papel da modificação molecular, mais especificamente da latenciação (CHUNG, FERREIRA, 1999), no aprimoramento da ação de fármacos. O aspecto altamente promissor desse composto é a diminuição da toxicidade em quatro vezes, comparativamente ao nitrofural, segundo o observado nos testes de mutagenicidade (GÜIDO *et al.*, 2001). Tais intrigantes resultados conduzem ao aprofundamento do estudo do mecanismo de ação/toxicidade desse derivado. Vale mencionar que o prolongamento da ação, que também reduz paralelamente a toxicidade, vem sendo alvo de pesquisas recentes (DEZAN *et al.*, 1998; GÜIDO *et al.*, 2000).

## 2.3 ALVOS BIOQUÍMICOS NA PESQUISA DE NOVOS ANTICHAGÁSICOS

O arsenal terapêutico hoje utilizado na quimioterapia contra a doença de Chagas, além de apresentar eficiência questionável, é composto por fármacos que apresentam graves efeitos adversos ao paciente. Torna-se, pois, urgente a pesquisa e desenvolvimento de fármacos antichagásicos menos tóxicos, mais seletivos e eficientes. Com essa finalidade é fundamental que se conheçam as vias metabólicas do parasita caracterizando enzimas e componentes específicos e suas diferenças com as vias metabólicas do hospedeiro, podendo, assim, identificar possíveis alvos bioquímicos (ZINGALES, COLLI, 1985). Exemplos dessa abordagem são o ergosterol e a tripanotiona (COURA, DE CASTRO, 2002; URBINA, DOCAMPO, 2003).

Entre os alvos de interesse ao planejamento de compostos com seletividade de ação encontram-se enzimas essenciais para o desenvolvimento dos parasitos no hospedeiro.

O conhecimento desses alvos, graças ao desenvolvimento da genômica, proteômica e bioinformática (FAIRLAMB, 1999), permite antever futuro mais promissor na pesquisa de novos antichagásicos. Entre eles, sobressaem as proteases (McKERROW *et al.*, 1995) e a tripanotiona redutase (FAIRLAMB, CERAMI, 1985; FAIRLAMB *et al.*, 1985; JOCKERS-SCHERUBL, SCHIRMER, KRAUTH-SIEGEL,1989). Além da tripanotiona redutase e das enzimas auxiliares que sintetizam tripanotiona, a triparedoxina e a triparedoxina peroxidase, recentemente identificadas em *T. cruzi* por LOPEZ *et al.* (2000), correspondem a sistema antioxidante complexo e peculiar, utilizado pelo protozoário para se defender do hospedeiro. Dessa forma, a inibição desse sistema pode originar candidatos a fármacos antichagásicos de ação específica.

Os glicoconjugados da superfície do parasito (COLLI, ALVES, 1999) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossômica (SOUZA *et al.*, 1998) são outros alvos que merecem realce.

As proteases de protozoários são alvos interessantes devido ao seu papel na replicação, metabolismo, sobrevivência e patologia das protozooses (McKERROW *et al.*, 1993). Por exemplo, a adição de um inibidor de cisteína protease, como o Z-Phe-Ala-FMK, a culturas de células de mamíferos expostas a tripomastigotas ou já infectadas com amastigotas, bloqueou a replicação e diferenciação do parasito, inibindo, portanto, seu ciclo biológico (MEIRELLES *et al.*, 1992; HARTH *et al.*, 1993). Entre as proteases de interesse, as cisteína-proteases são as enzimas mais abundantes na maioria dos protozoários responsáveis por parasitoses humanas.

No que diz respeito à doença de Chagas, a cruzipaína é a cisteína-protease que mais interesse desperta como alvo de novos e melhores antichagásicos que os disponíveis.

A Tabela I apresenta relação de possíveis alvos bioquímicos respectivamente referenciados (POLLI, 2003).

**TABELA I - Identificação de potenciais alvos quimioterápicos em *T. cruzi***

| Alvo quimioterápico | Referência |
|---|---|
| tripanotiona | KRAUTH-SIEGEL, COOMBS, 1999; PERSON, ASLUND, 1998; BOND, 1999 |
| purinas | ULLMAN, CARTER, 1997; PÉREZ *et al.*, 1999 |
| metabolismo de folato e pteridina | NARE *et al.*, 1997 |
| metabolismo de pirofosfato | URBINA, DOCAMPO, 2003; COURA, CASTO, 2002. |
| biossíntese do mRNA | AKSOY, 1993.; McCARTHY-BURKE, TAYLOR, BUCK, 1997 |
| cinetoplasto | STUART, 1991; SCHNARE, GRAY, 1999 |
| biossíntese do ergosterol | URBINA *et al.*, 1996 |
| transialidase e GPI | COSTA *et al.*, 1998; FERGUNSON,1999 |
| proteases (cisteína-proteases) | COOMBS, MOTRAM, 1997.; MORTY *et al.*, 1999 |
| gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | SOUZA *et al.*, 1998 |

## *2.3.1 Tripanotiona Redutase*

Todos os organismos aeróbios apresentam defesa contra o estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio geradas durante o metabolismo oxidativo. Dentre elas têm-se o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e seus subprodutos. Essas espécies danificam biomoléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos. Como prevenção de danos celulares é utilizado um sistema de defesa, compreendido por várias enzimas e moléculas antioxidantes como a catalase, superóxido dismutase, várias

peroxidases e o sistema glutationa (CHANGE, SIES, BOVERIS, 1979; CADENAS, 1989).

Nas células de mamíferos, a principal via de destoxificação de peróxido de hidrogênio envolve a glutationa peroxidase, agindo junto com a NADPH, glutationa e glutationa redutase (FLAIRLAMB, CERAMI, 1992; MEHILOTRA, 1996).

É bem conhecida e relatada a deficiência do sistema de destoxificação do *T.cruzi* frente ao estresse oxidativo (VIODÉ *et al.*, 1997). Esse parasita não tem catalase e glutationa peroxidase e a glutationa redutase é substituída por enzima específica do parasito denominada tripanotiona redutase (FAIRLAMB, CERAMI, 1985; FAIRLAMB *et al.*, 1985; JOCKERS-SCHERUBL, SCHIRMER, KRAUTH-SIEGEL,1989; HENDERSON *et al.*, 1991). A tripanotiona redutase constitui-se em um dos principais alvos do planejamento de novos antichagásicos (FAIRLAMB, 1999).

Inibidores de tripanotiona redutase são considerados como antichagásicos potenciais (CHAN *et al.*, 1995, 1998). Neste particular, os compostos nitro-heterocíclicos constituem-se em excelentes candidatos, por meio dos seus correspondentes ânions radicais, por interferirem com o metabolismo do oxigênio (AUGUSTO *et al.*, 1986; KOROLKOVAS, 1988; TSUHAKO *et al.*, 1989; DOCAMPO, 1990; DE CASTRO, MEIRELLES, 1992; GRINGAUZ, 1997; VIODÉ *et al.*, 1997).

A inibição da triapanotiona redutase se dá por inibidores seletivos que impedem a redução do substrato fisiológico, a tripanotiona dissulfeto, comprometendo dessa maneira o sistema de defesa redox do parasita, tornando-o mais sensível a fármacos que agem por oxi-redução, como os nitrocompostos (WALSH, BRADLEY, NADEAU, 1991; GIRAULT *et al.* 1997, D'SILVA, DAUNES, 2000). Visto isso, é essencial o conhecimento da estrutura cristalina (Figura 11) da tripanotiona redutase para o desenvolvimento de fármacos seletivos com a capacidade de inibir a tripanotiona redutase.

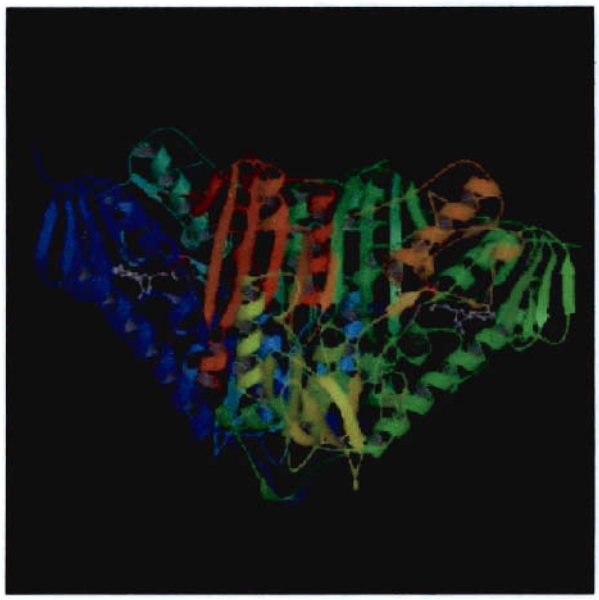


Figura 11 - Estrutura cristalina da enzima tripanotiona redutase.

*Fonte*: www.rcsb.org/pdb (1AOG)

### 2.3.2 Biossíntese de Esteróides

A rota biossíntetica de esteróides tem representado importante alvo contra a doença de Chagas (COURA, CASTRO, 2002). O *T. cruzi* necessita de esteróides específicos para a viabilidade e proliferação em todas as fases do ciclo de vida. Por tal razão, esta etapa é extremamente suscetível à ação de inibidores (URBINA, DOCAMPO 2003). Dentre esse inibidores, encontram-se diversos antifúngicos e antiprotozoários, tanto os já comercializados como aqueles em estudo (Figura 12).

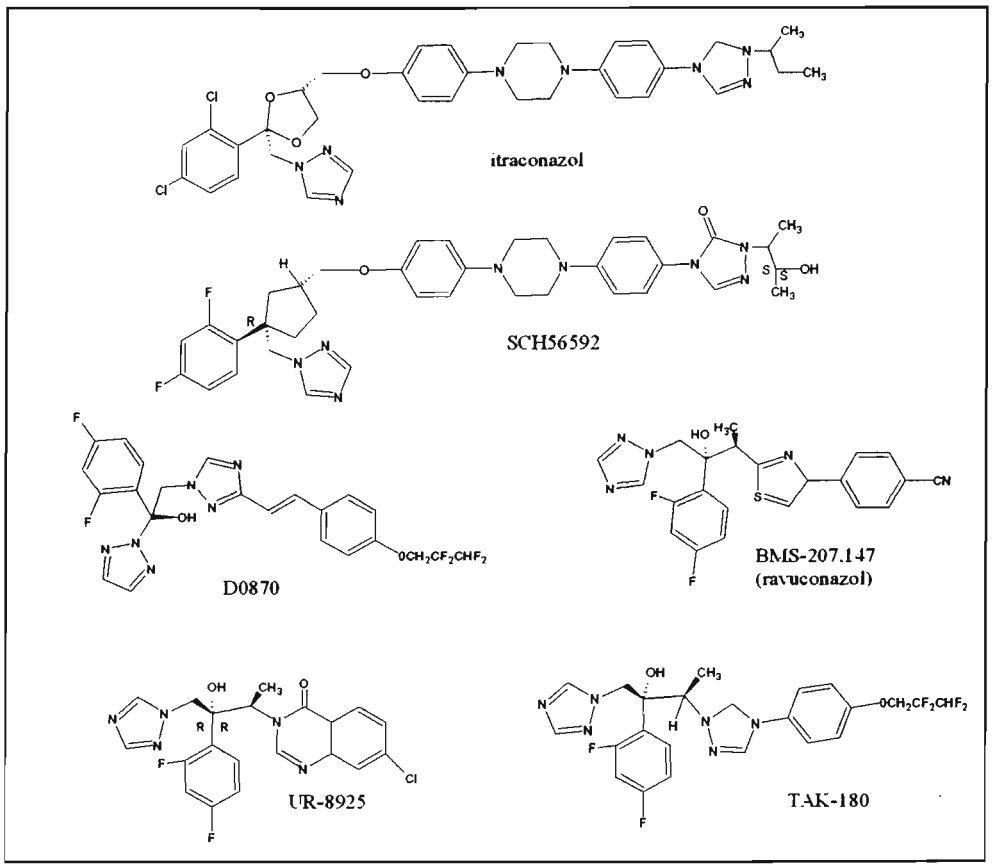



Figura 12 – Compostos azólicos estudados como possíveis antichagásicos (URBINA, DOCAMPO, 2003).

Esses compostos azólicos apresentam mecanismo de ação baseado no bloqueio na síntese de esteróides, inibindo a formação do ergosterol e de seu precursor, o lanosterol, através da inibição da enzima lanosterol 14α-desmetilase dependente do citocromo P-450. Tal bloqueio resulta em acúmulo de lanosterol e perda de ergosterol. A enzima 14α-desmetilase também está presente em mamíferos, porém sua sensibilidade é consideravelmente menor que a enzima presente no *Trypanosoma*. Devido à essa especificidade de bloqueio na rota biossintética do parasita em relação ao hospedeiro, tais quimioterápicos podem representar importantes alternativas para o tratamento da doença de Chagas (GOAD *et al.* 1989; DOCAMPO, SCHMUÑIS, 1997).

### 2.3.3 Cisteína-Proteases

As proteases parasitárias representam importante papel no clico de vida e patogenia da doença de Chagas. Diferentes tipos de proteases são encontradas em todos os estágios do ciclo celular do parasita (McKERROW, SUN, ROSENTHAL, 1993). Estas são capazes de hidrolisar ligações peptídicas e, dependendo do ponto, na cadeia peptídica, em que promovem a hidrólise são classificadas em endopeptidases ou exopeptidases. São, ainda, classificadas em serina- e cisteína-proteases, dependendo do grupo químico presente no sítio ativo. As cisteína-proteases apresentam um grupo tiol no seu sítio ativo e estão presentes em vírus, bactérias, protozoários, plantas, mamíferos e fungos. Em protozoários observa-se a presença de diversas cisteína-proteases, as quais têm papel fundamental na nutrição, do parasita e invasão das células hospedeiras (OTO, SCHIRMEISTER, 1997).

A cisteína-protease cruzipaína (CAZZULO *et al.*, 1990a,b) está, provavelmente, implicada no desenvolvimento do *T. cruzi* e na diferenciação dos vários estágios do ciclo biológico do parasito, na invasão no hospedeiro e na alteração da resposta imune do hospedeiro (SCHARFSTEIN *et al.*, 1986; MEIRELLES *et al.*, 1992; CHAGAS *et al.*, 1997; DEL NERY *et al.*, 1997).

Trata-se da cisteína-protease mais abundante do tripanossoma (CAZZULO, STOKA, TURK, 1997) e é o antígeno imunodominante, reconhecido durante a infecção humana (CHAGAS *et al.*, 1997; DEL NERY *et al.*, 1997). É codificada por mais de 100 cópias de genes polimórficos localizados em vários cromossomos. Entretanto, a despeito do polimorfismo genético, a cruzipaína é uma das proteases parasitárias mais bem caracterizadas (CAZZULO, 1999).

Essa enzima é encontrada próximo à superfície do parasita intracelular (Mc GRATH *et al.*, 1995; DEL NERY *et al.*, 1997). Tem peso molecular de aproximadamente 60 kDa e é uma glicoproteína ativada por β-mercaptoetanol ou glutationa reduzida, sendo inibida por organomercuriais, TLCK (tosilisilclorometilcetona), TPCK (tosilfenilalanilclorometilcetona), leupeptina, quimostatina e antipaína. É encontrada nos lisossomas.

Todas as variedades moleculares relatadas até agora apresentam a tríade catalítica característica das cisteína-proteases e organização estrutural similar à das proteases lisossômicas de mamíferos, semelhantes à papaína (DEL NERY *et al.*, 1997). Ao contrário destas últimas, entretanto, a cruzipaína tem uma cadeia C terminal, que pode ser liberada por auto-proteólise. O tamanho dessa cadeia varia de 100 a 130 resíduos de aminoácidos e a seqüência entre o domínio catalítico e o domínio terminal C, contendo grupamentos de Thr, Pro e Ser, é suscetível à clivagem proteolítica. A função desse domínio terminal C ainda permanece incerta. Propõe-se que ele esteja envolvido na evasão à resposta imune do hospedeiro e no aumento da atividade catalítica (SERVEAU *et al.*, 1996; DEL NERY *et al.*, 1997; DEL NERY *et al.*, 1997; STOKA *et al.*, 1998), bem como na invasão da célula do hospedeiro, ligação às células-alvo, replicação intracelular e diferenciação do parasita (SERVEAU *et al.*, 1996; DEL NERY *et al.*, 1997), funções que seriam atribuídas, também, à porção *N* terminal. Tais funções, importantes nos vários estágios do ciclo biológico do parasito, fazem da cruzipaína excelente alvo para inibidores específicos e irreversíveis, que podem ser usados para o desenvolvimento de nova quimioterapia. Muitas tentativas nesse sentido foram realizadas e bem sucedidas, resultando em inibição da invasão da célula hospedeira e do desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* (SERVEAU *et al.*, 1996).

A presença de cruzipaína nas formas intra e extracelular do *T. cruzi* tem estimulado bastante a tentativa de se desenvolver a primeira geração de inibidores, com alta eficácia *in vitro*. Alguns desses compostos têm apresentados excelentes resultados em experimentos realizados com camundongos infectados com *T. cruzi* (SERVEAU *et al.*, 1996). À vista das relações estrutural e funcional próximas entre as cisteína-proteases parasitárias e as proteases do hospedeiro relacionadas à papaína, os mesmos substratos e inibidores usados, até agora, para experimentos com a cruzipaína são aqueles atualmente usados para as catepsinas lisossômicas L e B de mamífero (SERVEAU *et al.*, 1996).

Do melhor conhecimento da especificidade do substrato das cisteína-proteases do parasita e sua sensibilidade aos inibidores depende o

desenvolvimento de novos fármacos que diferenciem as proteases do parasita e do mamífero.

A cruzipaína tem preferência por substratos contendo resíduos hidrofóbicos não-aromáticos na posição $P_2$ (MEIRELLES *et al.*, 1992; DEL NERY *et al.*, 1997). Compartilha interessantes propriedades com a calicreína tecidual humana, por exemplo, a habilidade de hidrolisar eficientemente substratos contendo Arg ou um aminoácido hidrofóbico na posição $P_1$. CAZZULO *et al.* (1990a) demonstraram que a cruzipaína hidrolisa ligações peptídicas que apresentem na posição $P_1$ resíduos de arginina (Arg) e lisina (Lys). A Figura 13 mostra esquema da ligação enzima-substrato.

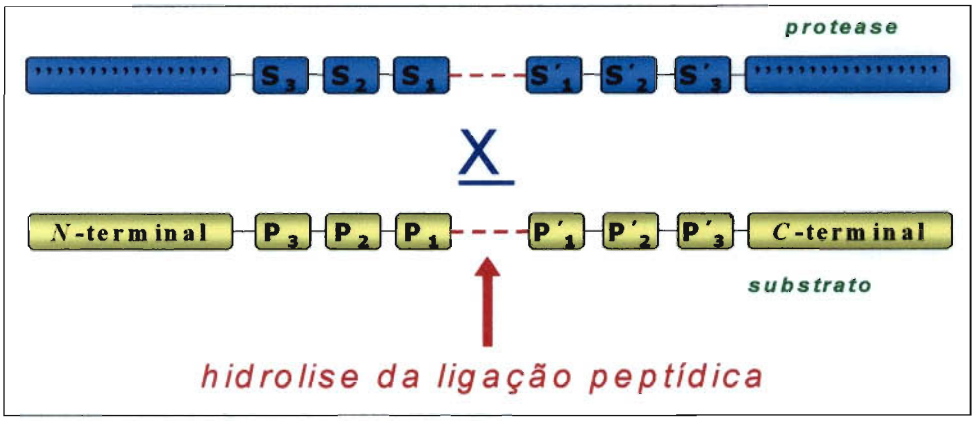



Figura 13 – Representação esquemática da ligação de protease com o substrato (McKERROW, McGRATH, ENGEL, 1995).

Observou-se que os inibidores mais potentes dessa protease têm, também, resíduos com grupamentos aromáticos em $P_2$ (MEIRELLES *et al.*, 1992). Ainda que a presença de Leu, Val ou mesmo Tyr na posição X não induza alteração dramática nos valores da constante de especificidade da cruzipaína, o bolso $S_2$ não pode acomodar eficientemente a grande cadeia lateral do Trp. A presença de Ala na posição $P_2'$, assim como observado para a papaína, tem efeito muito favorável na suscetibilidade do substrato à cruzipaína (DEL NERY *et al.*, 1997).

O subsítio $S_1$ das cisteína-proteases tem especificidade menos definida que o subsítio $S_2$ e a maioria dos seus substratos comuns contém Arg como resíduo

$P_1$. A cruzipaína demonstrou preferência marcante por resíduos de Phe, Cys(tBu), Leu e Tyr em $P_1$, enquanto que os substratos contendo cadeias laterais ß ramificadas, tais como Ile e Val, foram mais resistentes à hidrólise (DEL NERY *et al.*, 1997).

Os substratos com His na posição $P_1$ demonstraram grande suscetibilidade à cruzipaína, o que foi consistente com a observação de uma clivagem auto-catalítica no resíduo His na região do propetídio da cruzipaína recombinante (DEL NERY *et al.*, 1997).

Diversas classes químicas têm sido ensaiadas como inibidores da cruzipaína (MEIRELLES *et al.*, 1992). Derivados fluorogênicos foram recentemente estudados com o objetivo de maior especificidade à cruzipaína em relação a proteases de mamíferos. Alguns deles discriminam a cruzipaína das enzimas correlatas de mamíferos, a despeito da dupla especificidade de catepsina B e L que a cruzipaína apresenta (CHAGAS *et al.*, 1997).

Peptídios derivados de fluormetilcetonas (FMK) são substratos análogos que inibem irreversivelmente as cisteína-proteases. Tanto as peptidilfluormetilcetonas como o homólogo peptidildiazometano se mostraram excelentes inibidores da cruzipaína, sendo que o derivado Z-Phe-Arg-FMK apresentou maior atividade que o derivado Z-Phe-Ala-FMK frente à enzima purificada. A ação nos diferentes estágios do ciclo biológico do *T. cruzi* foi comprovada (HARTH *et al.*, 1993; MEIRELLES *et al.*, 1992). Observou-se baixa toxicidade dos inibidores peptidil FMK para as cobaias e células de mamíferos, quando comparada à toxicidade para o parasito em cultura. Essa seletividade biológica pode refletir adaptação do *T. cruzi* à vida dentro das células dos mamíferos – a fim de manter seu ciclo de replicação de 7 horas, a forma intracelular amastigota tem que ser eficiente captador de pequenas moléculas no citoplasma da célula hospedeira. Sua localização no citoplasma, ao invés de estar no interior de uma organela intracelular, também facilita a captação do inibidor. A localização do inibidor por microscopia de fluorescência sugere que muito pouco, ou nenhum, inibidor tem acesso às catepsinas no compartimento lisossômico das células hospedeiras infectadas (McGRATH *et al.*, 1995).

Alguns inibidores específicos da cruzipaína desenvolvidos racionalmente por REA (Relação Estrutura-Atividade) (Figura 14) promovem inibição seletiva desta protease, bloqueando a proliferação tanto das formas extracelulares epimastigotas quanto das formas intracelulares amastigotas e impedem a metaciclogênese (transformação das formas epimastigotas em tripomastigotas) *in vitro*, indicando o papel essencial dessa enzima na sobrevivência e crescimento do parasita (URBINA, DOCAMPO, 2003).

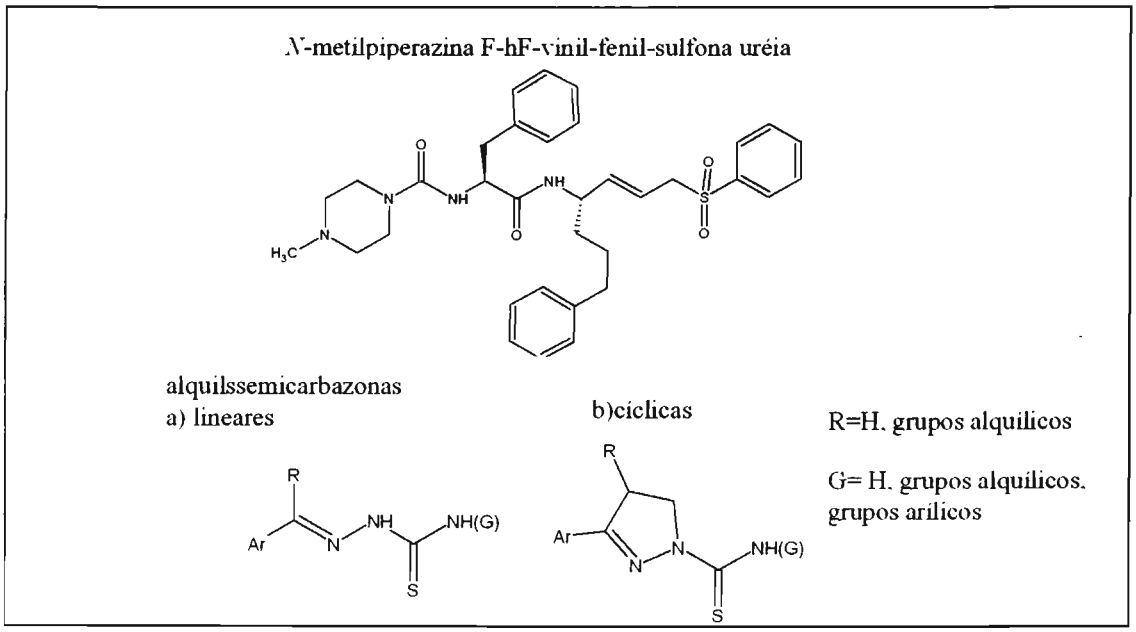



Figura 14 – Inibidores seletivos de cruzipaína racionalmente planejados por SAR.

O conhecimento da estrutura cristalina da cruzipaína (Figura 15) mostrou-se como ferramenta importante em estudos com a finalidade de desenvolver inibidores seletivos desta enzima, resultando em inibição da invasão da célula hospedeira e do desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* (SERVEAU *et al.*, 1996).

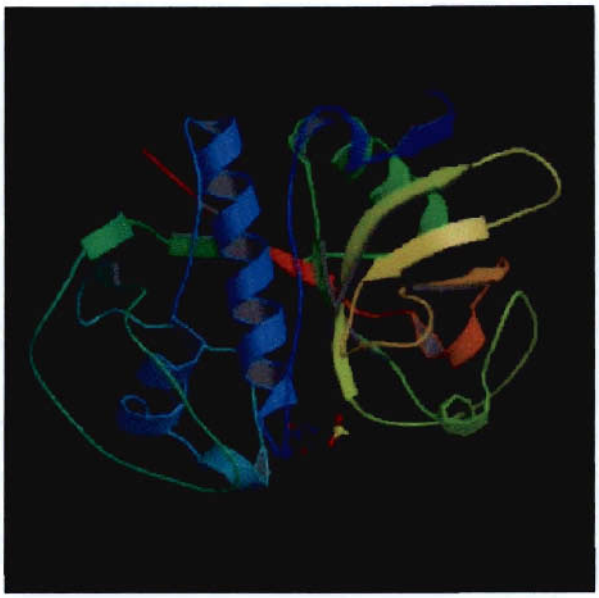


Figura 15 - Estrutura cristalina da cruzipaína.
*Fonte*: www.rcsb.org/pdb (1F28)

### 2.3.4 Metabolismo de Pirofosfato

O *T. cruzi* apresenta organelas especiais, como os acidocalcissomas envolvidos no armazenamento de cátions e polifosfatos e na adaptação deste microrganismo ao estresse oxidativo. A captação de cálcio é realizada por matriz acidocalcissômica e regulada por série de mecanismos, os quais incluem $Ca^{+2}$ ATPase, $NA^{+}/H^{+}$ mutante, bomba de $H^{+}$/ATPase e polifosfatases (DOCAMPO, MORENO, 2001). Bifosfonatos análogos do pirofosfatos (Figura 16), usados no tratamento de disfunções de reabsorção de ossos, têm apresentado atividade *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi*. Eles são seletivamente acumulados no parasita e podem inibir enzimas envolvidas em reações orgânicas e inorgânicas do pirofosfato com a farnesil-pirofosfato-sintetase e com a bomba de $H^{+}$-pirofosfatase. Constituem-se, pois em quimioterápicos promissores para parasitos tripanossomatídeos e apicomplexos (URBINA, DOCAMPO, 2003).

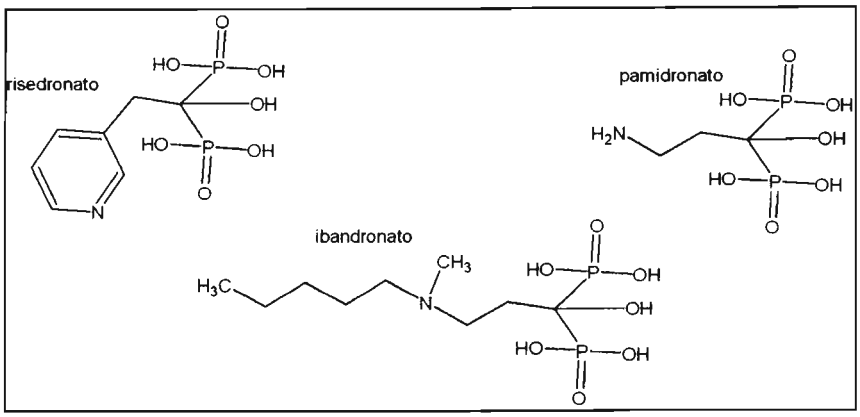



Figura 16 – Bifosfonatos análogos ao pirofosfato (URBINA, DOCAMPO, 2003).

## 2.3.5 Purinas

Os parasitas da classe *Tripanosomatide* são extremamente deficientes na biossíntese *de novo* de purinas. No entanto, purinas são essenciais para o seu desenvolvimento e crescimento. A enzima chave desta rota é a hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT), tornando-se um importante alvo bioquímico para esses parasitas (URBINA, DOCAMPO, 2003). O alopurinol, fármaco utilizado no tratamento de gota, é metabolizado a oxipurinol em humanos, e ambos são potentes inibidores de xantina oxidases (KOROLOLVAS, 2003). Nos *Tripanosomatide*, que são deficientes em xantina oxidases, o alopurinol é incorporado ao DNA, impedindo a síntese de RNA e de proteínas. Esse fármaco tem sido considerado possível agente antichagásico, tanto *in vitro* como *in vivo* (URBINA, DOCAMPO, 2003).

## 2.4 GÊNESE DE NOVOS FÁRMACOS

Os fármacos podem ser introduzidos na terapêutica mediante vários processos. Apesar de, originalmente, a ênfase ter sido dada a compostos naturais, oriundos de plantas e animais, e depois ter se deslocado para compostos de síntese, produtos vindo da natureza continuam, hoje, se observa o retorno do interesse por produtos naturais como posíveis candidatos a fármacos (KINGSTON, 1996).

Apesar de a contribuição da introdução ao acaso ser limitada, ainda persiste a descoberta de fármacos com base no trinômio dedicação/intuição/sorte (KUBINYI, 1998a).

Novas metodologias vêm sendo cada vez mais exploradas (KUBINYI, 1995; BÖHM, 2000), observando-se desenvolvimento significativo em algumas delas, como: química combinatória (GORDON, KERWIN, Jr, 1998), engenharia genética (MEYER, 1996), cristalografia de proteínas (RONDEAU, SCHREUDER, 1996), técnicas multidimensionais em RMN (SHUKER, HAJDUK, MEADOWS, FESIK, 1996), relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica – *QSAR* (HANSCH, FUJITA, 1964; FUJITA, 1990; KUBINYI, 1995; KUBINYI, 1993) e a variante *QSAR-3D*, modelagem molecular, planejamento dirigido para estrutura e auxiliado por computador, *CADD* (KUBINYI, 1993; BÖHM, 1993; KLEBE, 1993; KUBINYI, 1998a; KUBINYI, 1998b; KLEBE, 1999; SHUKER, HAJDUK, MEADOWS, *et al.*, 1996; BÖHM, BOEHRINGER, BUR *et al.*, 2000), entre outras.

Apesar do uso de novas e avançadas tecnologias, especialmente as computacionais, persiste o desafio de que para um ligante se tornar um fármaco deve-se considerar, em primeiro lugar, a biodisponibilidade, estreitamente ligada à sua lipofilicidade (AJAY *et al.*, 1998; KUBINYI, 1998c; PAGLIARA *et al.*, 1999). Também, distribuição no sistema biológico, metabolismo e eliminação, ou os parâmetros **ADME** (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) do ligante, são fatores determinantes na sua atividade biológica, porquanto permitem que o ligante atinja, de forma eficaz, o alvo biológico. Assim, os métodos avançados

socorrem-se de processos mais clássicos e mais simples, com o objetivo de se transformar um ligante em fármaco.

### 2.4.1 Modificação Molecular

A modificação molecular tem se mostrado a técnica mais promissora para a introdução de novos fármacos na terapêutica (KOROLKOVAS, 1988; WERMUTH, 1996a). Tal processo permite que as propriedades indesejáveis dos protótipos sejam diminuídas e as características desejáveis, ressaltadas, mediante retirada, substituição, introdução de grupos químicos cuja participação na atividade biológica é determinante, ou cuja função acessória pode auxiliar na interação com o receptor. Apesar de, em geral, a modificação molecular clássica não utilizar as bases moleculares da doença como suporte racional para o planejamento de novos fármacos, esse foi o processo mais profícuo de introdução de fármacos na terapêutica.

#### 2.4.1.1 LATENCIAÇÃO

Entre os processos de modificação molecular, a latenciação é um dos mais promissores (BUNDGAARD, 1985; CHUNG, FERREIRA, 1999) e é definida como a transformação do fármaco em forma inativa de transporte, que, mediante reação química ou enzimática *in vivo*, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Uma das formas latentes obtidas com esse processo é denominada pró-fármaco (WERMUTH, 1984). A Figura 17 mostra esquematicamente o conceito clássico de latenciação.

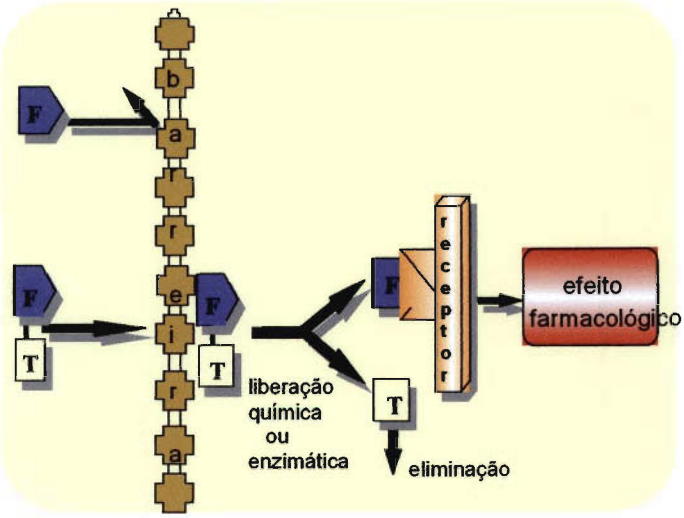



Figura 17 - Representação esquemática de latenciação clássica. F – fármaco; T- transportador.

Alguns pró-fármacos, cuja denominação coube a Albert, em 1957, foram sintetizados antes que o conceito fosse introduzido por Harper, em 1958. A heroína, por exemplo, foi produzida, de certa forma, como um pró-fármaco "acidental". A morfina atravessa muito lentamente a barreira hemato-encefálica. A diacetilmorfina (heroína) tem maior lipossolubilidade e assim chega até o cérebro, no qual por hidrólise por, há a conversão da heroína em morfina. Esse último composto é o responsável pelo efeito farmacológico (WERMUTH, GAIGNAULT, MARCHANDEAU, 1996).

WERMUTH, em 1984, classificou as formas latentes em: pró-fármacos clássicos, bioprecursores e fármacos dirigidos.

Especialmente no caso de pró-fármacos clássicos e bioprecursores, o planejamento pode ser dividido em três passos básicos:

1- Identificação do problema associado ao fármaco;

2- Identificação das propriedades físico-químicas a serem alteradas;

3- Escolha do transportador adequado, no caso de pró-fármacos clássicos, e da ligação a ser cindida no compartimento biológico desejado.

Os *pró-fármacos clássicos* compreendem área da pesquisa de fármacos que é voltada, especialmente, para a otimização das propriedades farmacocinéticas correspondentes (FRIIS, BUNDGAARD, 1996). Em geral, o termo pró-fármaco implica ligação covalente entre o grupo ativo e o transportador, mas alguns autores também usam-no para caracterizar algumas formas de sais de princípios ativos. A Figura 18 mostra exemplo de pró-fármacos da ampicilina, utilizados na terapêutica com o propósito de aumentar a biodisponibilidade do fármaco de origem.

Os pró-fármacos clássicos são planejados, sobretudo, para ou superar problemas farmacêuticos ou farmacocinéticos associados ao fármaco protótipo, que iriam, de outro modo, limitar seu emprego clínico (TESTA, CALDWELL, 1996). A eficácia de um fármaco pode ser diminuída por suas propriedades físico-químicas, por exemplo, baixa permeabilidade na membrana plasmática. Pela ligação com um transportador adequado, pode-se superar a barreira limitante ao fármaco de origem. Uma vez ultrapassada a barreira, o pró-fármaco é revertido ao protótipo por sistemas enzimáticos ou não. A formação do pró-fármaco, portanto, confere propriedade química transitória, que altera ou elimina propriedades indesejáveis do fármaco (FRIIS, BUNDGAARD, 1996). O enfoque do pró-fármaco como um modo de se otimizar a distribuição do fármaco passou por significativa expansão nas duas décadas passadas e mais de 50 compostos farmacologicamente ativos são clinicamente usados sob essa forma, no presente (BUNDGAARD, 1991; FRIIS, BUNDGAARD, 1996).

Os pró-fármacos clássicos podem ser subdivididos em duplos ou triplos, ou em cascata, e pró-fármacos recíprocos. Quando o transportador é ligado a ponte conectada com o fármaco, conhecida como grupo espaçante, o termo duplo é utilizado. O grupo espaçante permitiria maior acesso das ligações às enzimas, quando for o caso, facilitando a liberação do fármaco de sua forma de transporte. Pró-fármacos triplos ou em cascata são aqueles que além de ligações por meio de espaçante apresentam liberação por vias química e enzimática.

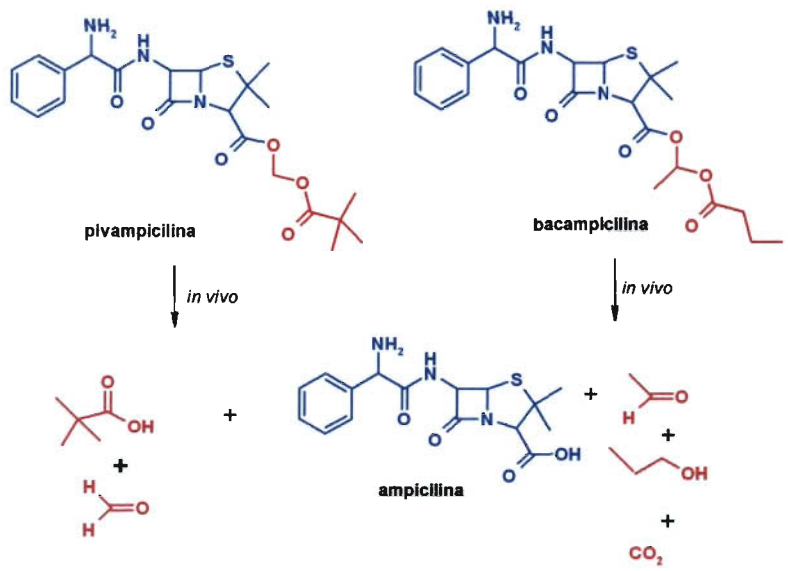



Figura 18 – Pró-fármacos clássicos de ampicilina de maior biodisponibilidade.

*Pró-fármaco recíproco* é o termo aplicado à forma latente que consiste de dois fármacos, em geral sinérgicos, ligados um ao outro (um fármaco é transportador de outro e vice-versa) (SING, SHARMA, 1996). Tal conceito não é recente, mas, não raro, confunde-se com hibridação molecular, que é processo de associação molecular (KOROLKOVAS, 1988). A sulfassalazina é exemplo que atesta a formação de pró-fármaco recíproco, em 1942, anteriormente à introdução do conceito da própria latenciação. Entre os exemplos mais recentes podem-se citar as cefalosporinas de ação mista, conhecidas como **DAC** – *Dual Action Cephalosporins* --, cujo propósito é ampliar o respectivo espectro de ação.

Sistema misto, em que o transportador deve ser biotransformado antes de permitir a liberação do fármaco e que se presta a conferir especificidade de localização, é o CDS – *Chemical Delivery System*. Tal sistema, idealizado por BODOR em 1981 (BODOR, FARAG, BREWSTER, 1981), permite atingir altas concentrações cerebrais de fármacos que devem atuar especialmente em disfunções cerebrais (PROKAI, PROKAI-TATRAI, BODOR, 2000).

*Bioprecursor* é um tipo de pró-fármaco, em que a reversão ao composto ativo se dá por meio de reações enzimáticas, em geral, não hidrolíticas. Sistemas de óxido-redução são utilizados pelo organismo para liberar o fármaco (WERMUTH, 1996b). Nesses casos, não se utilizam transportadores. Há, no entanto, formas mistas de bioprecursores e pró-fármacos clássicos. A Figura 19 mostra exemplo de bioprecursor de 3 benzodiazepínico.

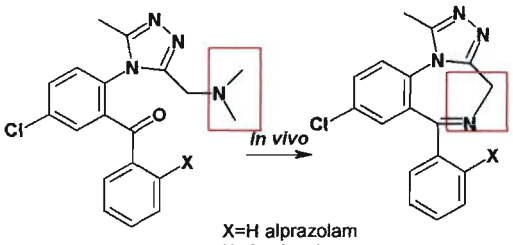



Figura 19 - Biotransformação do alprazolam e triazolam a partir de seus respectivos bioprecursores.

*Fármacos dirigidos* são formas latentes em que o transportador apresenta alta especificidade, por si só, ou por conter grupo diretor da ação ao nível celular (TAKAKURA, HASHIDA, 1995; SCHACHT *et al.*, 1996; TAKAKURA *et al.*, 1996). Anticorpos, imunoglobulinas e ácidos nucléicos podem ser empregados como transportadores, normalmente ligados a matrizes poliméricas. A Figura 20 apresenta um dos exemplos, em que os grupos diretores tiogalactose e tiomanose interagem com receptores no fígado, liberando a citarabina no interior das células hepáticas.

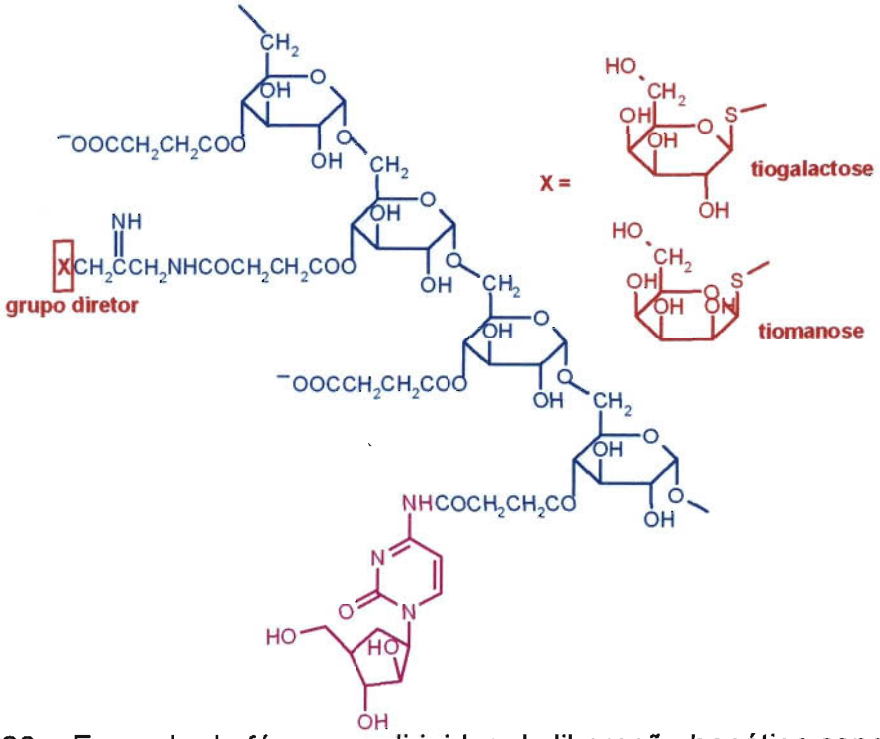



Figura 20 – Exemplo de fármacos dirigidos de liberação hepática específica.

Variante de grande especificidade de ação, que engloba a concepção de fármaco dirigido é a do processo ADEPT – *Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy* (MELTON *et al.*, 1996). Por esse planejamento, inicialmente se administra um conjugado anticorpo monoclonal-enzima não existente no organismo, e, em seguida, pró-fármaco, cuja ligação ao transportar é cindida especificamente pela enzima componente do conjugado.

#### 2.4.1.1.1 Bases de Mannich como pró-fármacos

As Bases de Mannich são formadas pela reação entre substratos RH, contendo, no mínimo, um átomo de hidrogênio ativo, formaldeído (mais raramente com outros aldeídos) e aminas primárias ou secundárias (TRAMONTINI, ANGIOLINI, 1990). Os mecanismos de formação seguem as rotas apresentas nas Figura 21. A rota A é preferencial, mas, dependendo da natureza dos reagentes e condições experimentais, a rota B pode ser observada.

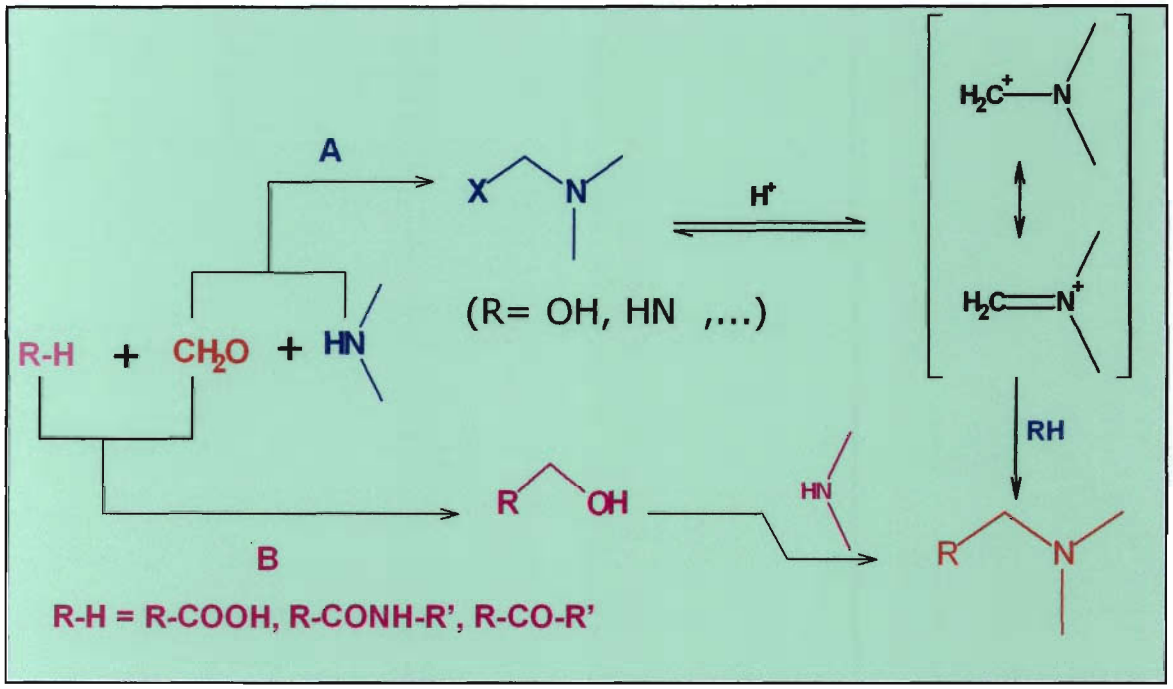



Figura 21 - Rotas A e B de síntese de bases de Mannnich (TRAMONTINI, ANGIOLINI,1990).

Dois fatores despertaram o grande interesse pela química das bases de Mannich (NARVAÉZ, 1983). São compostos muito reativos e, conseqüentemente, podem ser transformados facilmente em numerosos outros compostos, constituindo-se, assim, em intermediários úteis na síntese de heterocíclicos, aminoácidos e outros derivados, e por introduzir uma função básica, permitem

tornar os derivados solúveis em solventes aquosos, quando transformados em sais de aminas.

Cerca de 35% dos trabalhos publicados sobre as bases de Mannnich estão em revistas farmacêuticas (TRAMONTINI, ANGIOLINI, 1990), o que mostra a importância dessas bases nessa área e, em especial, na Química Farmacêutica. Com amplo espectro de atividades biológicas, as bases de Mannich são aplicadas em Medicina (KUDRIN, VEROB'EV, 1970) e muitos estudos são feitos para introdução de novos compostos na terapêutica. Alguns desses exemplos são: anestésicos locais (PROFFT, 1954), anticonvulsivantes (PÓRSZASZ *et al.*, 1960; DIMMOCK *et al.*, 1992), antifúngico e antibacteriano (PANDEYA *et al.*, 1999a; BIAVA *et al.*, 1995). Encontram-se, ainda, referências indicando bases de Mannich como antineoplásicos (DIMMOCK *et al.*, 1983; INCI GUL *et al.*, 1999), antiinflamatórios, bloqueadores adrenérgicos, analgésicos, antivirais, antibacterianos e hipotensores (AGABAYAN *et al.*, 1982; GEVORGYAN *et al.*, 1984,1985; DIMMOCK *et al.*, 1992). Ademais, relatam-se compostos derivados de isatina com triazóis e de isatina com 3-amino-2-metilmercapto- quinazolin-4(3)-ona com atividade anti-HIV (Figura 22) (PANDEYA *et al.*, 1999b, 2000).

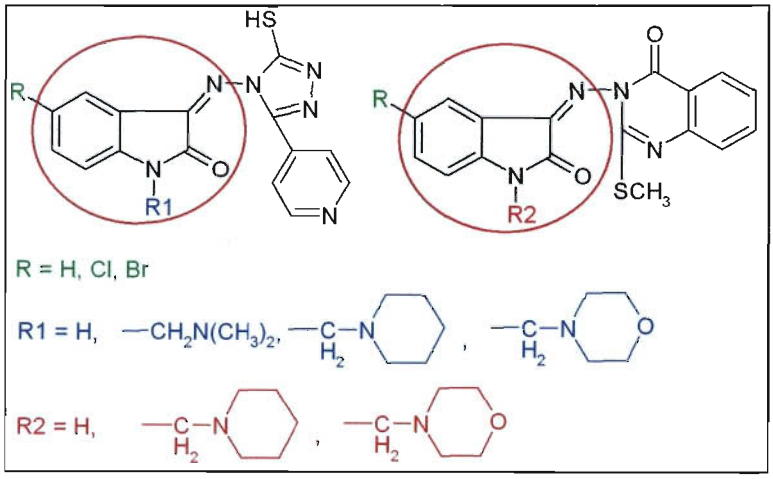



Figura 22 - Compostos derivados de isatina com triazóis e de isatina com 3-amino-2-metilmercapto quinazolin-4(3)-ona com atividade anti-HIV (PANDEYA *et al.*, 1999 b, 2000).

Os pró-farmacos derivados de bases de Mannich são decompostos com a liberação do fármaco por meio de hidrólise em solução aquosa (FRIIS, BUNDGAARD, 1996). A taxa de hidrólise aumenta com o aumento do pH. As reações sofridas pelas bases de Mannich, entre elas, a de clivagem, são apresentadas na Figura 23 (TRAMONTINI, ANGIOLINI, 1990). O caminho depende da natureza do grupo R.

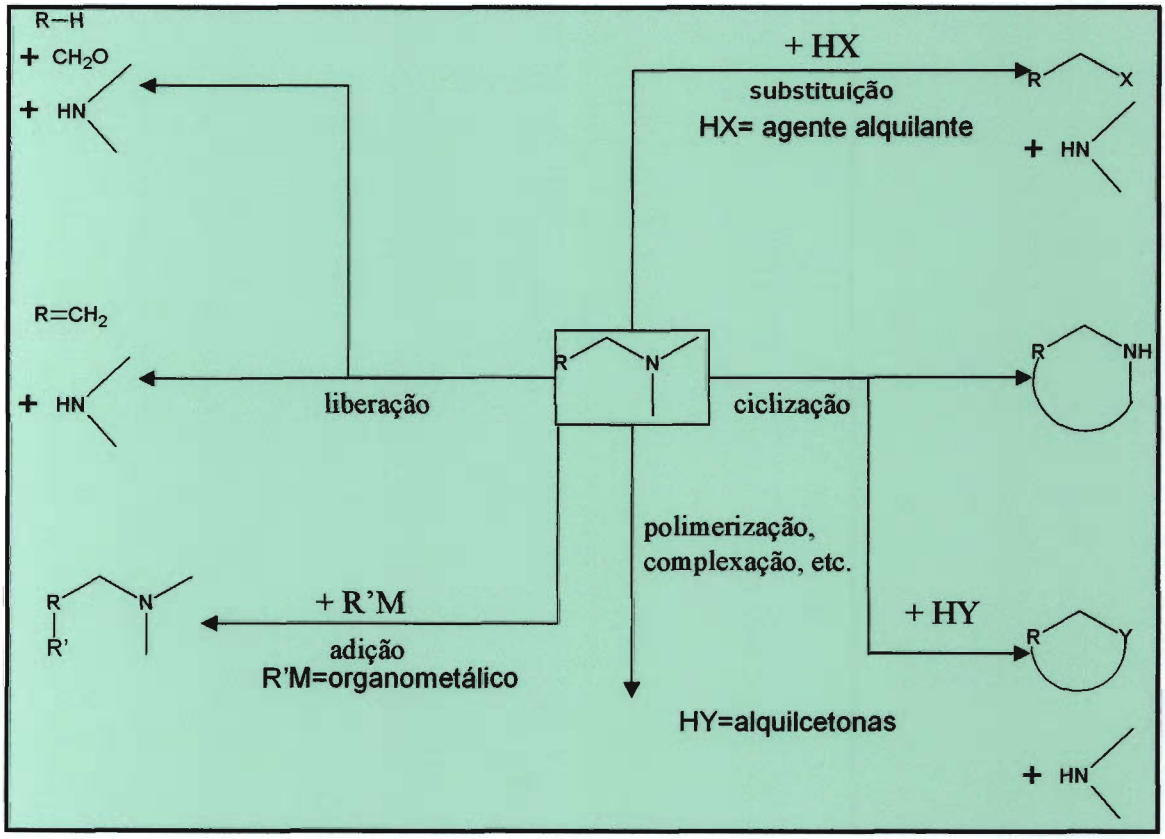



Figura 23 – Reações sofridas por bases de Mannich.
(TRAMONTINI, ANGIOLINI, 1990).
R H = composto com H ativo.

## 2.5 SÍNTESE DE PEPTÍDIOS

Peptídios são simplesmente versões menores ou seguimentos de proteínas. As diferenças entre proteínas e peptídios são basicamente o tamanho e o comprimento da cadeia peptídica, ou seja, o número de aminoácidos ligados (LLOYD-WILLIANS, ALBERICO, GIRALD, 1997). A união entre dois ou mais aminoácidos para a formação de um peptídio ou mesmo uma proteína se dá por meio de ligação peptídica, que compreendem a condensação do grupo amino em alfa de um aminoácido à carboxila de outro, com eliminação de uma molécula de água. A Figura 24 mostra um esquematicamente da formação da ligação peptídica .

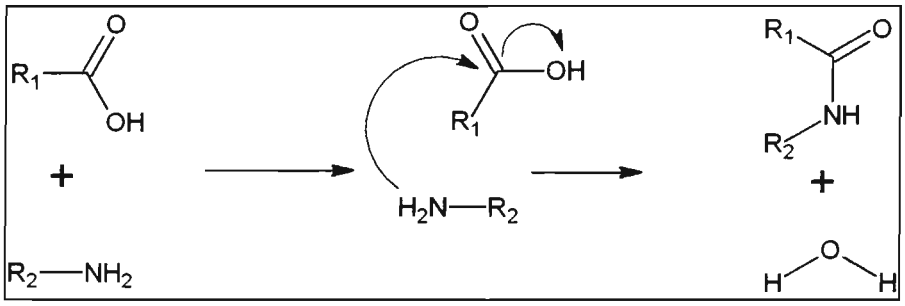


Figura 24 – Formação da ligação peptídica.

As metodologias empregadas para síntese de peptídios são basicamente quatro (BODANSZKY, BODANSZKY, 1984):

1. **Síntese em solução:** utilizando reagentes químicos para a formação das ligações peptídicas através de métodos e técnicas convencionais de síntese orgânica em solução;
2. **Síntese em fase sólida:** em que se utiliza uma matrix polimérica sólida como suporte, na qual o peptídio é preso e aumentado, sendo desligado após o final da síntese;
3. **Síntese enzimática:** que utiliza enzimas proteolíticas, em condições específicas para formação das ligações peptídicas;

4. **Síntese por meio de DNA recombinante:** empregada principalmente para proteínas ou peptídios longos.

A escolha da metodologia a ser empregada depende do tamanho, da natureza da cadeia peptídica desejada e da quantidade de peptídio a ser sintetizado. A síntese química em solução clássica, está bem estabelecida e é muito utilizada. (BODANSZKY, BODANSZKY, 1984).

No caso dos métodos químicos, tanto em solução clássica, quanto em fase sólida, existe a necessidade do uso de agentes acoplantes e ou ésteres ativados (LLOYD-WILLIANS, ALBERICO, GIRALD, 1997), enquanto por via enzimática, a reações ocorre por meio de proteases.

Todo aminoácido apresenta, no mínimo, dois grupos funcionais reativos, grupos amino e ácido. Como ligação peptídica é resultado da reação de acoplamento entre um grupo amino alfa de um aminoácido e o grupamento carboxila de outro, é essencial que, em cada aminoácido envolvido na reação, um dos grupos reativos esteja livre e o outro esteja protegido para a seletividade e sucesso da reação (LLOYD-WILLIANS, ALBERICO, GIRALD, 1997).

A vista de tal fato foi necessário o desenvolvimento de métodos simples de proteção dos grupos funcionais de aminoácidos e, paralelamente, métodos brandos para remoção dos grupos protetores de modo a evitar a destruição das ligações peptídicas formadas ou, ainda, dos próprios aminoácidos que constituem os peptídios (JULIANO, 1990).

Nas reações de formação da ligação peptídica é muito comum o uso de agentes acoplantes, como DCC (dicicloexilcarbodiimida) e HOBt (1-hidroxibenzotriazol), por exemplo o DCC ativa a carboxila do aminoácido levando à formação de um intermediário ativo, que reagirá, posteriormente, com o grupo amino do outro aminoácido, resultando no peptídio, por três tipos de reação. A reação por meio do HOBt ocorre por meio da formação de um éster ativo de HOBt, que reagirá posteriomente com o grupo amino alfa de outro aminoácido, resultando na formação do peptídio. A reação direta com o componente amínico, sem adição de HOBt, também possível. A reação pela formação de anidrido sintético de que sofrerá ataque

nucleofílico da grupamenteo amínico também pode ser observada. A Figura 25 ilustra os três tipos de reação de formação de ligação peptídica por meio de agentes acoplantes.

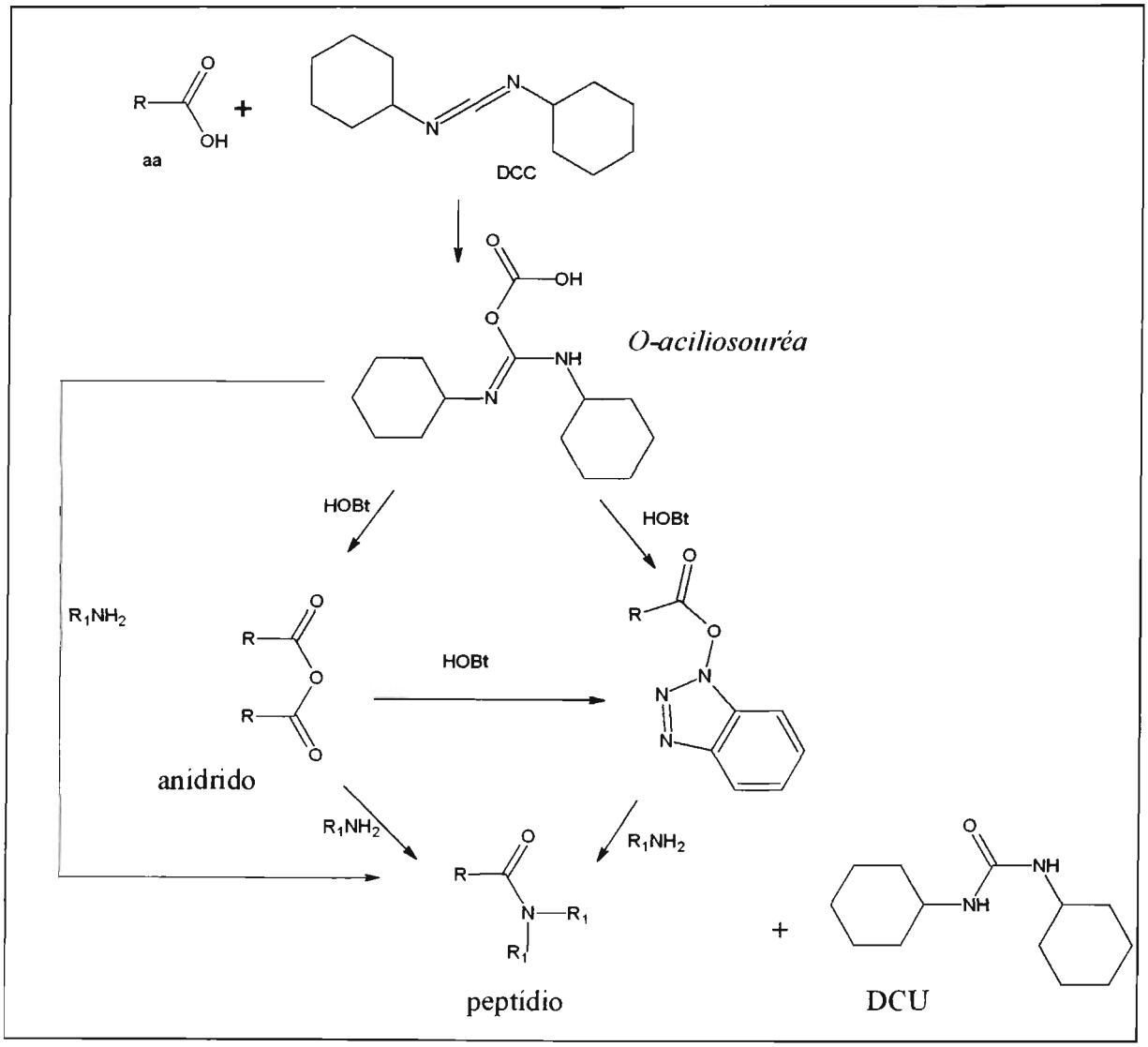



Figura 25 – Formação da ligação peptídica por meio de agentes acoplantes (LLOYD-WILLIANS, ALBERICO, GIRALD, 1997).

# III. MATERIAL E MÉDODOS

## 3.1 MATERIAL

### 3.1.1 Reagentes e solventes

- ε-Boc-LysOH (Sigma Chemical Co)
- 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Sigma)
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Aldrich)
- acetato de etila CLAE (Merck)
- acetona p.a. (Merck)
- acetonitrila grau CLAE (Merck)
- ácido acético p.a. (Merck)
- ácido cítrico p.a. (Merck)
- ácido trifluoracético p.a. (Sigma Chemical Co.)
- Boc-Arg(Tos)-OH (Bachem)
- Boc-Lys(Cl-Z)-OH (Bachem)
- brometo de potássio (KBr) (Sigma Chemical Co.)
- butanol p.a. (Merck)
- carbonato de sódio (Synth)
- cloreto de benzoíla (ClBZ) (Merck)
- cloreto de sódio p.a. (Merck)
- cloreto de tionila (Merck)
- clorofórmio p.a. (Merck)
- cromatofolhas de alumínio sílica-gel 60 indicador $F_{254}$ (Merck)
- diclorometano p.a.(DCM) (Merck)
- diisopropilcarbodiimida (DIC) (Sigma Chemical Co.)
- dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-$d_6$) (Merck)
- dimetilsulfóxido p.a. (DMSO) (Merck)
- éster etílico de glicina (GlyOEt) (doado pelo Dr. Paulo Batista de Carvalho, School of Pharmacy, University of Mississippi, EUA)

- éster metílico da fenilalanina (sintetizado pelo Dr. Carlos Alberto Brandt, Instituto Butantã, SP)
- etanol p.a. e CLAE (Merck)
- éter etílico p.a. (Merck)
- fluoreto de hidrogênio (Merck)
- formaldeído p.a. (Merck)
- iodo sublimado
- L-arginina (Ajinomoto)
- L-lisina (Ajinomoto)
- metanol p.a. e CLAE (Merck)
- *N,N*-dimetilformamida (DMF) p.a. (Merck)
- nitrofural (NF) (sintetizado pelo Dr. Leoberto Costa Tavares, FCF-USP)
- propanol p.a. (Merck)
- sílica-gel 60 (70-230 MESH) para coluna (MercK)
- sulfato de sódio anidro p.a. (Merck)
- trietilamina p.a. (Sigma Chemical S.A.)
- trifluoretanol (Sigma Chemical Co.)

### *3.1.2 Equipamentos*

- aparelho capilar Büchi para determinação de ponto de fusão;
- bomba de alto vácuo, modelo E2M5 EDWARDS;
- espectrômetro de ressonância magnética nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advance DPX-300;
- espectrofotômetro IV FTIR Bomem, modelo MB-120;
- espectrômetro de Massas Shimadzu GCMS-QP 5050[A].
- *kugelrohr* (destilador horizontal) Büchi;
- lâmpada de radiação ultravioleta Spectroline, modelo ENF-260C;
- lavadora de ultra-som USC-700 (UNIQUE)
- liofilizador Christ, modelo ALPHA 1-2
- rotaevaporador BÜCHI R-114, com banho de aquecimento BÜCHI B-480

# 3.2 MÉTODOS

## 3.2.1 Síntese

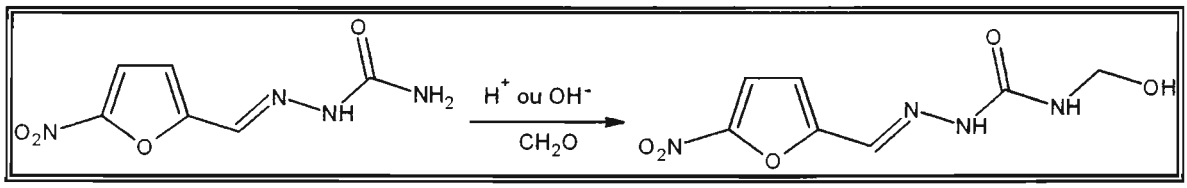
### 3.2.1.1 SÍNTESE DO HIDROXIMETILNITROFURAL (CHUNG, 1996)

#### *3.2.1.1.1 Meio básico*

Reagiu-se NF com solução de formaldeído a 37% V/V em presença de $K_2CO_3$ e $H_2O$. A reação permaneceu à temperatura ambiente,em pH 10-11, sob agitação constante, durante 49 horas, acompanhada por CCD. Após termino da reação, a suspensão foi filtrada. O precipitado foi lavado várias vezes com MeOH para remoção do excesso de $CH_2O$. Recristalizou-se de $MeOH/H_2O$.

#### *3.2.1.1.2 Meio ácido*

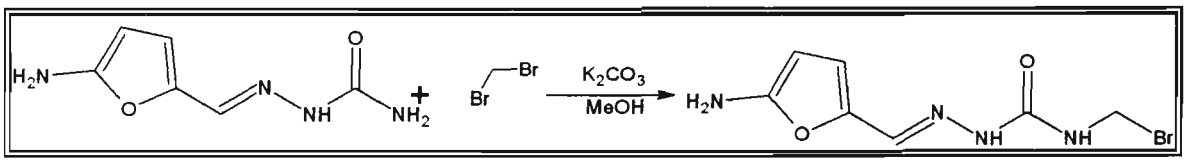
Reagiu-se NF com solução de formaldeído a 37% v/V em meio de HCl (pH 4-5), sob agitação constante à temperatura ambiente, por 24 horas. O meio foi evaporado e lavado várias vezes com MeOH e EtOH para remoção do excesso de $CH_2O$. Recristalizou-se de $MeOH/H_2O$.




Esquema 1 - Síntese do hidroximetilnitrofural (NFOH).

### 3.2.1.2 ALQUILAÇÃO DO NITROFURAL

A síntese foi realizada em meio básico de $K_2CO_3$, partindo-se de quantidades equimolares de NF e $BrCH_2Br$, em solução de metanol, por 72 horas (Esquema 2). A reação foi acompanha por CCD. Após o termino da reação, o produto obtido foi evaporado à pressão reduzida e tentou-se recristalização de $MeOH/H_2O$, e de MeOH/éter etílico.



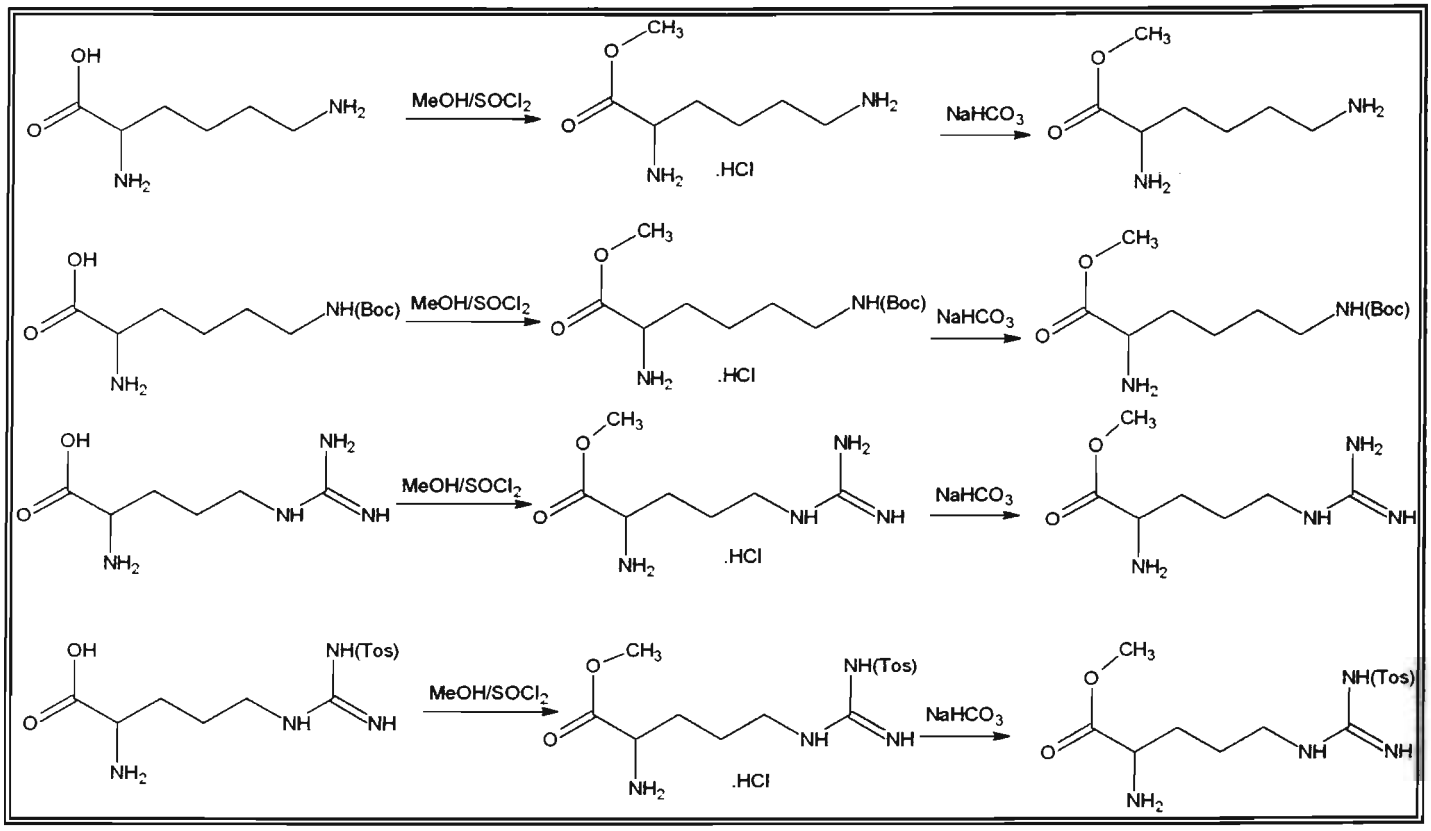

Esquema 2 - Síntese do haleto de alquila do NF.

### 3.2.1.3 PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES DE AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS

#### *3.2.1.3.1 Preparação de ésteres de aminoácidos*

***MÉTODO GERAL***

Aos aminoácidos, lisina (Lys), lisina protegida (Є-Boc-Lys-OH), arginina (Arg) e arginina protegida (Arg(TOS)-OH), em solução metanólica sob agitação à temperatura ambiente, adicionou-se, gota a gota, $SOCl_2$, na proporção 1:1 (Esquema 5). A reação permaneceu por tempo necessário à formação do éster. Adiciou-se $NaHCO_3$ na proporção 1:1, deixando o meio em agitação por 1 hora. O produto obtido foi devidamente isolado.

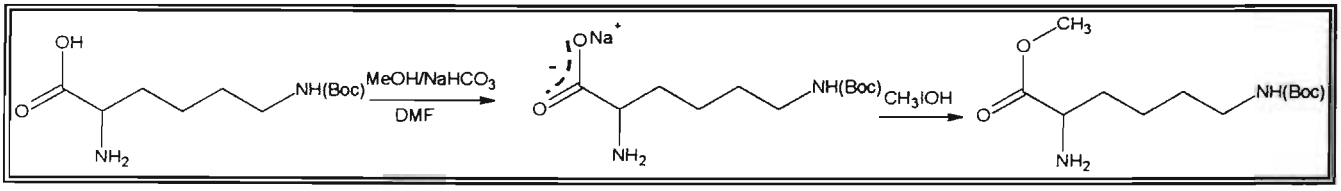



Esquema 5 - Síntese dos ésteres metílicos de Lys, Є-Boc-LysOH, Arg e Arg(Tos)-OH.

## ***MÉTODOS ALTERNATIVOS***

- ***Síntese do éster metílico da ε-Boc-Lys-OH por meio de formação de sal sódico***

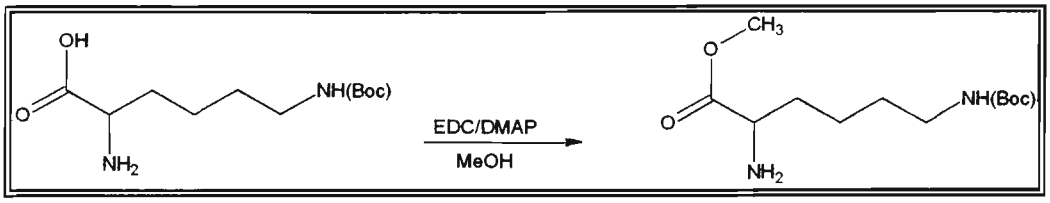
Ao aminoácido protegido, em meio de DMF $NaHCO_3$, acrescentou-se $CH_3IOH$ na proporção de 1:1 com o aminoácido (Esquema 6), sob agitação à temperatura ambiente por 12 horas. O isolamento do produto foi feito por extração.




Esquema 6 – Síntese de ε-Boc-Lys-OMe, por meio de sal sódico.

- ***Síntese do éster metílico da ε-Boc-Lys-OH por meio de EDC/DMAP***

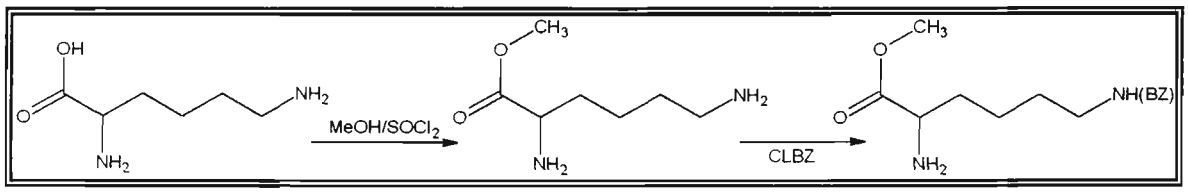
Ao aminoácido protegido, em solução metanólica, adicionou-se EDC/DMAP (1:0,5), sob agitação, à temperatura ambiente por 12 horas (Esquema 7). O isolamento do produto obtido foi realizado por extração de DCM.




Esquema 7 – Síntese de ε-Boc-Lys-OMe, por meio de EDC/DMAP.

- ***Síntese do éster metílico da Lys e proteção da amina ε por meio de cloreto de benzoíla***

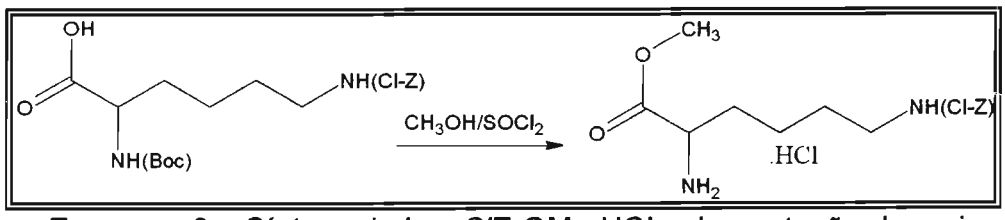
À Lys, em solução de metanol, sob agitação à temperatura ambiente, foi adicionado, gota a gota, $SOCl_2$, na proporção 1:1. Após 12 horas de reação adicionou-se o cloreto de benzoíla (ClBZ), na proporção 1:1 (Esquema 8). A reação transcorreu por mais 12 horas, sendo acompanhada por CCD.




Esquema 8 – Síntese de Lys(BZ)-OMe e proteção da amina α do por meio de ClBZ.

- ***Síntese do éster metílico Boc-Lys-OH-ClZ e desproteção da amina α***

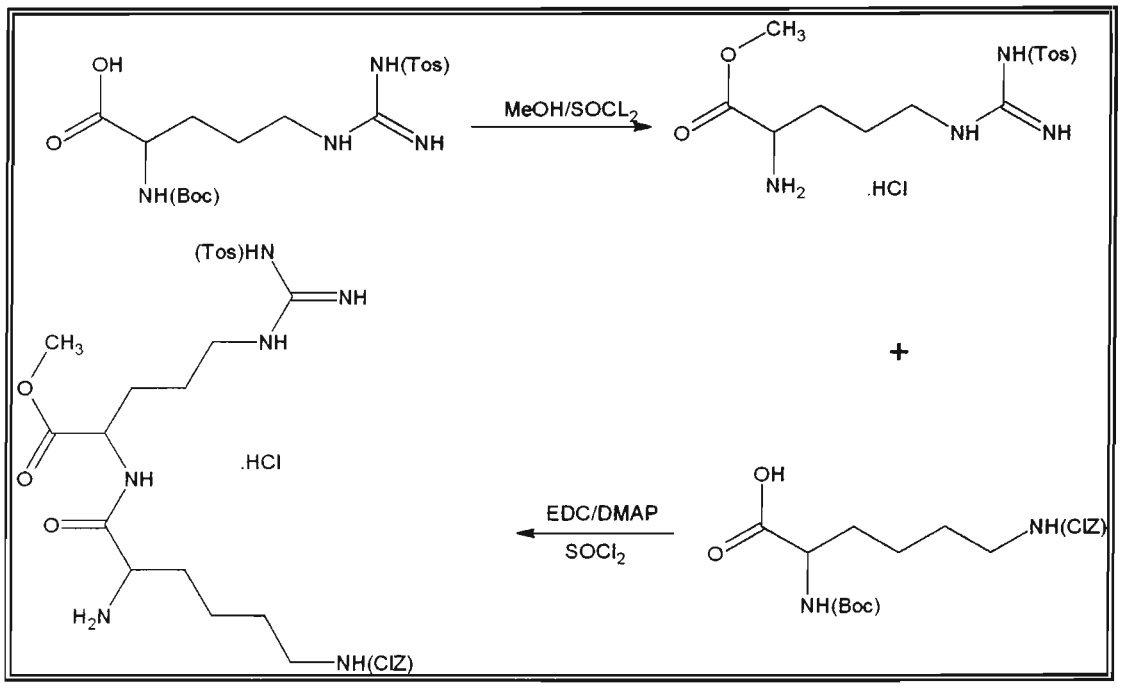
Ao Boc-Lys-OH-ClZ, em solução de metanol, sob agitação à temperatura ambiente, foi adicionado gota a gota $SOCl_2$, na proporção 1:1 (Esquema 9). A reação permaneceu em agitação durante a noite.




Esquema 9 – Síntese de Lys-ClZ-OMe.HCl e desproteção da amina α, partindo-se de Boc-Lys-ClZ-OH.

### *3.2.1.3.2 Preparação do dipeptídio Lys(ClZ)-(Tos)Arg-OMe.HCl*

O dipeptídio foi sintetizado a partir de Boc-Arg(Tos)-OH e Boc-Lys(ClZ)-OH. Ao Boc-Arg(Tos)-OH em solução de metanol, sob agitação à temperatura ambiente, foi adicionado gota a gota $SOCl_2$, na proporção 1:1, para formação do éster e desproteção da amina α. O produto Arg(Tos)-OMe, foi ligado ao Boc-Lys(ClZ)-OH, por meio de ração de condensação em EDC/DMAP. A desproteção da amina α foi feita por meio de $SOCl_2$ (1:1)(Esquema 10). O produto foi isolado por extração em DCM.

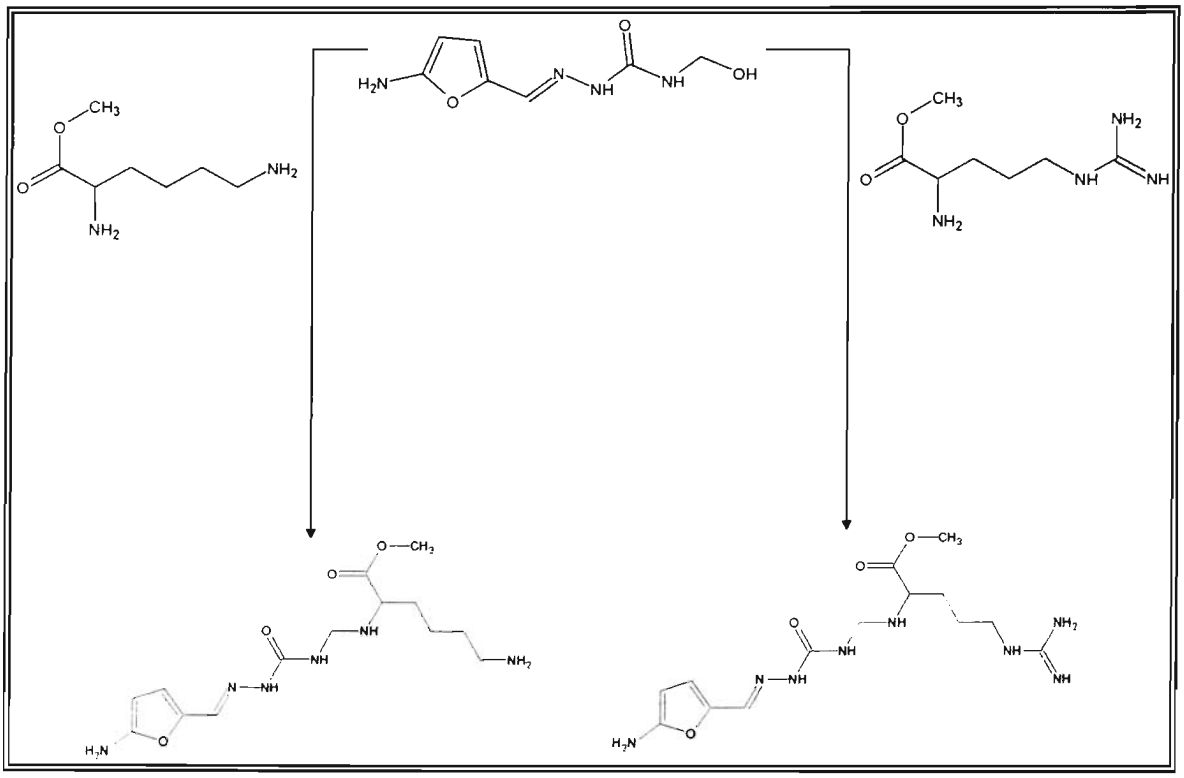



Esquema 10 – Síntese do dipeptídio Lys(ClZ)-(Tos)Arg-OMe.

### 3.2.1.4 SÍNTESE DE BASES DE MANNICH

#### *3.2.1.4.1 Síntese de base de Mannich utilizando NFOH e ésteres metílicos de aminoácidos*

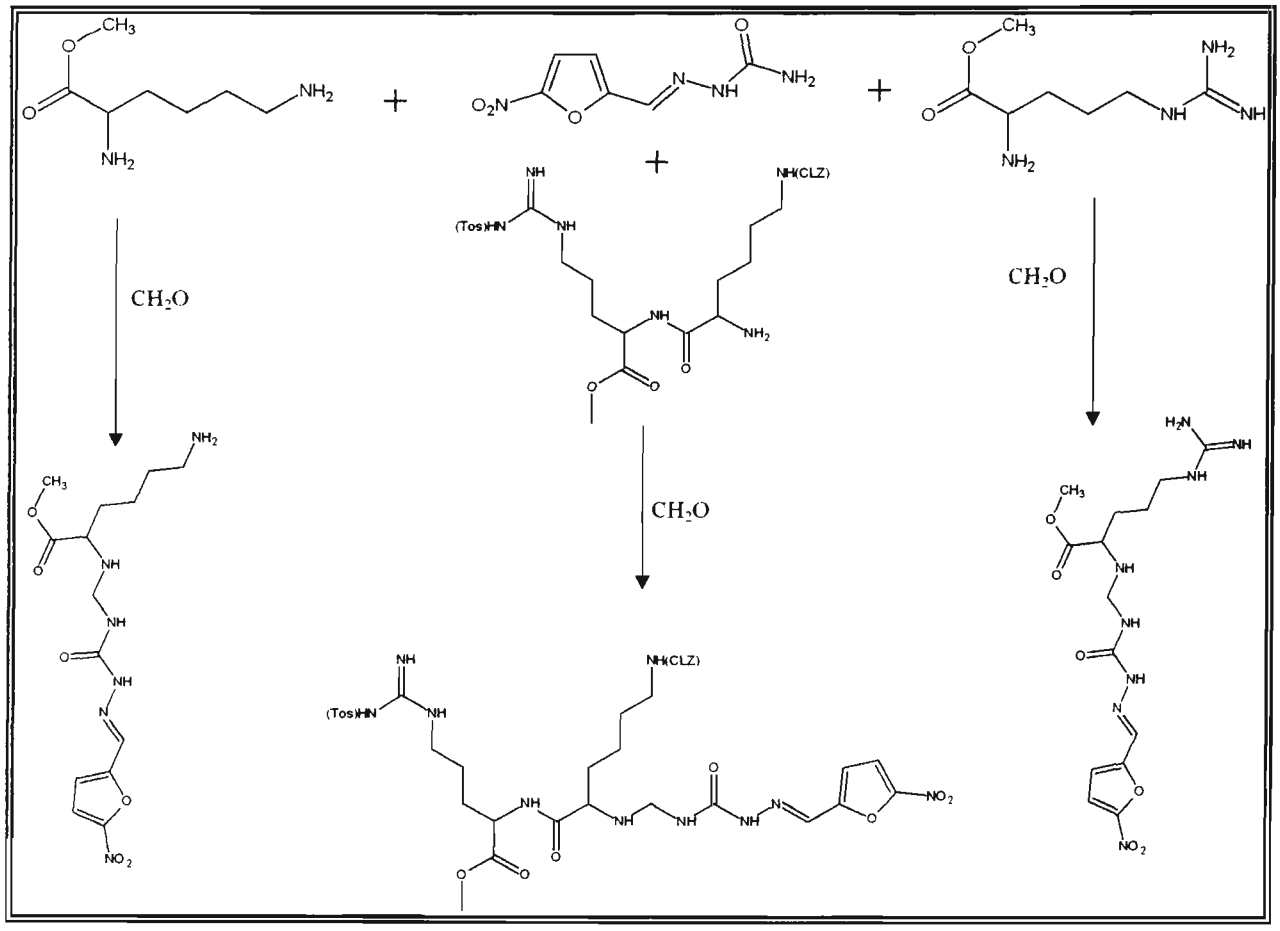
Reagiram-se NFOH e os ésteres metílicos de aminoácidos, sob agitação à temperatura ambiente em meio ácido ou básico. As reações foram acompanhadas por CCD (Esquema 11).



Esquema 11 – Síntese das bases de Mannich NF-LysOMe e NF-ArgOMe.

### 3.2.1.4.2 *Síntese de base de Mannich partindo-se NF, Lys-OMe, Ar-OMe e NF-Lys(ClZ)-Arg(TOS)-OMe (SRIDHAR et al., 2001)*

Procedeu-se à reação em solução metanólica utilizando-se quantidades equimolares de NF, ésteres de aminoácidos ou dipeptídio e solução de formaldeído 37% V/V, em meio de ácido acético glacial (Esquema 9), sob agitação à temperatura ambiente por tempo suficiente a formação do produto. O isolamento dos compostos foi realizado por meio de coluna cromatográfica.




Esquema 13 – Síntese de bases de Mannich entre o NF e Lys-OMe, Arg-OMe e Lys(ClZ)-(Tos)Arg-OMe.

## 3.2.2 Análises

### 3.2.2.1 DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE FUSÃO

As faixas de fusão (ou de decomposição) dos derivados obtidos foram determinadas em aparelho capilar Büchi, disponível na FCF-USP.

### 3.2.2.2 ANÁLISE NO INFRAVERMELHO (IV)

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) dos compostos sintetizados foram obtidos em aparelho FTIR Bomem MB-120, disponível na FCF-USP, empregando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr).

### 3.2.2.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros de massas foram realizados no espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP 5050[A], disponível na FCF, USP.

### 3.2.2.4 ESPECTROMETRIA DE RMN $^{1}H$ e $^{13}C$

As análises de RMN $^{1}H$ e de RMN $^{13}C$ foram efetuadas em espectrômetro Brücker 300 MHz para $^{1}H$ e 75 MHz $^{13}C$, disponível na FCF, USP.

### 3.2.2.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

#### *3.2.2.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)*

Foi realizada em placas de sílica-gel G60, Merck, para o acompanhamento das reações e avaliação da pureza de alguns produtos sintetizados. As fases móveis empregadas variaram de acordo com o experimento. A revelação das placas foi realizada por lâmpada ultravioleta (UV) e iodo.

#### *3.2.2.5.2 Cromatografia em coluna de sílica-gel*

A cromatografia em coluna foi efetuada em coluna de vidro utilizando-se sílica-gel 60 (70-230 MESH) para a separação e purificação dos compostos sintetizados. Os sistemas solventes variaram de acordo com o experimento.

# IV. EXPERIMENTOS

## 4.1 SÍNTESES

### *4.1.1 Síntese do hidroximetilnitrofural (NFOH)*

A Tabela II apresenta as condições reacionais empregadas desenvolvidos na tentativa de otimizar a síntese do NFOH.

#### 4.1.1.1 COM FORMALDEÍDO

**Experimento 1**

O experimento foi realizado segundo o descrito por CHUNG (1996), utilizando-se NF em meio básico de carbonato de potássio, na proporção de 1:1, com excesso de formaldeído em meio aquoso. Partindo-se de 5 mmol (0,99 g) de nitrofural, 5 mmol (0,69 g) de carbonato de potássio, em suspensão de 10 mL de água com 18 mL de solução de formaldeído a 37%, sob agitação à temperatura ambiente, por 49 horas. O meio foi filtrado sob pressão reduzida, obtendo-se precipitado amorfo de cor amarela e filtrado também amarelo. Ambos foram avaliados por CCD utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (95:5:3), observando-se apenas manchas referentes ao produto de partida. Foi realizada, então, análise de RMN $^1H$, verificando-se não ter se formado o derivado proposto.

**Experimento 2**

O experimento foi realizado repetindo-se a metodologia empregada no Experimento 1, porém utilizando-se reagentes mais puros. Obteve-se precipitado amorfo de cor amarelo intenso e filtrado amarelo de menor intensidade. Ambos foram avaliados por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (95:5:3). No precipitado, observaram-se duas manchas, uma semelhante à do produto de partida e outra com $R_f$ inferior. O precipitado foi lavado exaustivamente com metanol a frio. Cristalizou-se o produto de

metano/água, obtendo-se um produto de cor amarelo intenso. Esse foi avaliado por CCD, apresentando uma única mancha diferente do produto de partida. Mediu-se o ponto de fusão e partiu-se então para análises de RMN $^1H$, confirmando a formação do produto.

**Experimento 3**

Este experimento foi realizado segundo técnica descrita por CHUNG (1996). Partindo-se de 1 mmol (0,19 g) de NF suspenso de água (2 mL), 3,6 mL (0,13 mol) de solução de formaldeído a 37%, em meio ácido de HCl, até atingir pH 2,5, procedeu-se à reação por 24 horas, sob agitação à temperatura ambiente. Após esse período, o meio reacional foi analisado por CCD, utilizando-se $CHCl_3$:MeOH: $CH_3COOH$ (85:5:3), como sistema solvente. Observou-se mistura entre o produto de partida e o produto desejado. O produto da reação foi concentrado à pressão reduzida e, em seguida, cristalizado de MeOH/$H_2O$. O composto obtido foi analisado por RMN $^1H$, comprovando-se a formação do produto desejado.

**Experimento 4**

O experimento foi realizado utilizando-se as mesmas proporções empregadas no Experimento 1, porém utilizando-se como base $KHCO_3$. Partindo-se de 5 mmol (0,99 g) de NF, 5 mmol (0,66 g) de $KHCO_3$, em suspensão de 10 mL de água com 18 mL de solução de formaldeído a 37 %. O experimento transcorreu sob agitação à temperatura ambiente, por 49 horas. O meio foi filtrado sob pressão reduzida, obtendo-se precipitado amarelo amorfo, o qual foi lavado várias vezes com metanol a frio. O precipitado foi avaliado por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (95:5:3), observando-se duas manchas, uma com $R_f$ (0,8), característico do produto de partida, e outra com $R_f$ (0,72).

**Tabela II** – Condições reacionais nos experimentos efetuados para a síntese de NFOH

| Exp. | Meio | Proporção NF:$CH_2O$:base ou ácido | Adição de $CH_2O$ 37% (etapas\|) | Solvente | Agitação | Tempo (h) | Resultado |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **COM FORMALDEÍDO** | | | | | | | |
| 1[a] | $K_2CO_3$ | 1:excesso:1 | 1 | $H_2O$ | magnética | 49 | negativo |
| 2[a] | $K_2CO_3$ | 1:excesso:1 | 1 | $H_2O$ | magnética | 49 | positivo |
| 3[a] | HCl | 1:excesso:pH 4-5 | 1 | $H_2O$ | magnética | 24 | positivo |
| 4[a] | KHCO3 | 1:excesso:1 | 1 | $H_2O$ | magnética | 49 | negativo |
| 5[a] | $K_2CO_3$ | 1:excesso:1 | 1 | $H_2O$ | sonicação | 5 | negativo |
| 6[a] | $K_2CO_3$ | 1:excesso:1 | 1 | $H_2O$ | sonicação | 2,5 | negativo |
| 7[a] | $K_2CO_3$ | 1:excesso:1 | 1 | $H_2O$ | magnética | 24 | negativo |
| 8[a] | $K_2CO_3$ | 1:excesso:1 | 2 | $H_2O$ | magnética | 5 | negativo |
| 9[a] | $K_2CO_3$ | 1:excesso:1 | 1 | THF | magnética | 0,66 | negativo |
| 10[a] | $K_2CO_3$ | 1:excesso:1 | 2 | $H_2O$ | magnética | 5 | positivo |
| 11[a] | $K_2CO_3$ | 1:excesso:1 | 1 | $H_2O$ | sonicação | 0,5 | negativo |
| 12[a] | $K_2CO_3$ | 1:excesso:1 | 2 | $H_2O$ | sonicação | 2,5 | positivo |
| **COM PARAFORMALDEÍDO** | | | | | | | |
| 13[b] | $K_2CO_3$ (80 °C) | 1:excesso:1 | 1 | acetonitrila | magnética | 8 | negativo |
| 14[b] | $CH_3COOH$ (80 °C) | 1:excesso:1 | 1 | DMF | magnética | 8 | negativo |
| 15[c] | refluxo | 1:excesso:1 | única | etanol | magnética | 24 | negativo |

**[a]-Segundo método descrito por CHUNG *et al.* (2003); [b]- Segundo método descrito por FURNISS *et al.* (1989); [c]- Segundo método descrito por GENG *et al.* (1989).**

**Experimento 5**

O experimento foi realizado utilizando-se as mesmas condições reacionais do Experimento 1, empregando-se quantidades equimolares (1 mmol) de NF e $K_2CO_3$. Procedeu-se à reação de hidroximetilação por meio de sonicação. A reação foi acompanhada por CCD, de 30 em 30 minutos, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (95:5:3). Observou-se formação de produto após 2,5 horas. Acompanhou-se a reação até perfazer 5 horas, não havendo mudança aparente no perfil cormatográfico. Em seguida, o produto obtido foi filtrado à pressão reduzida. O precipitado foi lavado com metanol a frio e novamente avaliado por CCD, utilizando-se o mesmo sistema solvente. Observaram-se duas manchas, uma com $R_f$ referente ao produto de partida e outra, provavelmente, do derivado planejado. Seguiu-se, então, para recristalização de metanol/éter e metanol/água, o que não ocorreu. Evaporou-se à pressão reduzida e, novamente, avaliou-se por CCD, observando-se somente manchas referentes ao produto de partida.

**Experimento 6**

Utilizaram-se as mesmas condições do Experimento 1. Os reagentes foram adicionados em balão de 50 mL e procedeu-se a reação por sonicação, acompanhando-se a reação de 30 em 30 minutos, por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (95:5:3). Após 2,5 horas, o experimento foi interrompido. Verificou-se, no precipitado, perfil cromatográfico idêntico ao obtido no Experimento 4. Tentou-se a cristalização de metanol/éter e metanol/água, utilizando-se menor quantidade de solvente, o que não ocorreu. A mistura reacional foi, então, evaporada à pressão reduzida e liofilizada, obtendo-se composto escuro com característica higroscópica, diferente do previsto.

**Experimento 7**

Novamente como no Experimento 1, realizou-se a reação, agora acrescentando-se o formaldeído lentamente, através de funil de adição durante 2 horas, com o intuito de deslocar o equilíbrio para a formação do derivado

hidroximetilado. A reação procedeu sob agitação por 24 horas, acompanhada por CCD nas primeiras e últimas horas. Observou-se a formação de produto, supostamente o desejado, em 2 e 5 horas, com contaminação da matéria-prima. Após 24 horas de reação, observaram-se, em análise por CCD, apenas manchas relativas ao produto de partida.

**Experimento 8**

Nas mesmas condições do Experimento 1, procedeu-se à reação de hidroximetilação do NF, com adição do formaldeído em duas etapas: metade da concentração logo no início da reação e outra metade no momento em que se observou por CCD o início da formação do derivado planejado, ou seja, 2,5 horas. Interrompeu-se após 5 horas de reação com a formação provável do produto final. Filtrou-se sob pressão reduzida, lavando-se o precipitado com água fria, até remover todo o formaldeído. Em nova CCD, verificou-se que o produto se encontrava aparentemente puro. Partiu-se, então, para outras análises.

**Experimento 9**

Realizou-se a reação utilizando-se as mesmas proporções do experimento 1, porém em THF, com o intuito de realizar a reação em solução. Após 40 minutos de reação, observou-se a formação do produto. Tentou-se, sem sucesso, a recristalização com metanol e éter etílico. Rotaevaporou-se, então, a solução, obtendo-se produto escuro com características higroscópicas, como o descrito no Experimento 6.

**Experimento 10**

Repetiu-se o Experimento 8. A reação transcorreu por 5 horas. Após este tempo, o meio reacional foi filtrado e o produto foi analisado por CCD com sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (95:5:3). Observaram-se manchas aparentemente do material de partida no precipitado e aquelas que poderiam ser do produto esperado no filtrado. O filtrado foi evaporado à pressão reduzida e, em seguida, tentou-se a cristalização de metanol/éter, sem se obter o resultado

esperado. Em nova CCD do precipitado utilizou-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3), verificando-se a presença de outra mancha além daquela característica do material de partida. Partiu-se, então, para a cristalização de MeOH/$H_2O$, por meio da qual se obtiveram cristais de amarelo intenso, que foram submetidos a análises de RMN $^1H$, $^{13}C$, IV e espectrometria de massas, caracterizando o produto como o NFOH. Com rendimento de 61,4%.

**Experimento 11**

A reação foi realizada nas mesmas condições do Experimento 1, utilizando-se sonicação. Após 30 minutos, verificou-se, em CCD utilizando sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3), mancha de formação do produto desejado. Partiu-se, então, para a tentativa de recristalização em MeOH/$Et_2O$, o que não ocorreu. Tentou-se, também, sem sucesso, a recristalização de acetona. Após 9 dias, evaporou-se o solvente à pressão reduzida, efetuando-se outra CCD, que mostrou degradação do produto.

**Experimento 12**

Realizou-se a reação por sonicação, utilizando-se erlenmeier como recipiente, acrescentando formaldeído em duas etapas, metade no início da reação e metade adicionada com funil de adição após 30 minutos de reação. A reação foi mantida por 2,5 horas, com acompanhamento por CCD. A mistura reacional foi filtrada sob pressão reduzida, obtendo-se precipitado amarelo e filtrado marrom. Após análise em CCD, verificou-se que o precipitado apresentava mancha idêntica ao material de partida e que o produto desejado poderia se encontrar no filtrado. O filtrado foi evaporado à pressão reduzida e lavado várias vezes com metanol, para retirada do excesso de formaldeído. Tentou-se a cristalização de acetona e de metanol/éter. A cristalização de acetona não ocorreu, porém em metanol/éter conseguiu-se um precipitado escuro, viscoso e higroscópico, o qual foi analisado por CCD com sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (95:5:3). Realizou-se nova análise cromatográfica com o intuito de avaliar os produtos reacionais, utilizando-se como sistema solvente

$CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3), verificando-se, no precipitado, a presença de outra mancha além daquela característica do produto de partida. Recristalizou-se de MeOH/$H_2O$, obtendo-se produto de cor amarela intensa, cromatograficamente idêntico ao isolado no Experimento 10 e caracterizado como NFOH. Submetido a análise de RMN $^1H$, comprovou-se a formação desse derivado, com 30% de rendimento.

#### 4.1.1.2 TENTATIVA DE SÍNTESE COM PARAFORMALDEÍDO

**Experimento 13**

A reação foi realizada segundo metodologia descrita em FURNISS *et al.* (1989), partindo-se de 1 mmol de NF (0,198 g) solubilizado em acetonitrila (15 mL), por meio de sonicação, em meio básico utilizando-se 1 mmol de $K_2CO_3$ (0,132 g) e excesso de paraformaldeído. Em um balão de 100 mL, adicionou-se a solução de NF em acetonitrila, o carbonato de potássio e o paraformaldeído. A reação foi realizada por 8 horas, sob refluxo, a 80 °C, com agitação magnética. Após interromper a reação, obteve-se liquido oleoso escuro. Esse foi evaporado à pressão reduzida, produzindo composto viscoso escuro, que foi avaliado por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3). Tentou-se a cristalização de MeOH, obtendo-se precipitado escuro com característica higroscópica, não possibilitando outras análises.

**Experimento 14**

A reação foi realizada segundo metodologia descrita em FURNISS *et al.* (1989), partindo-se de 1 mmol de NF (0,198 g) solubilizado em DMF (8 mL), em meio ácido, utilizando-se 1 mL de ácido acético glacial, com excesso de paraformaldeído. Em um balão de 50 mL, adicionou-se a solução de NF, o paraformaldeído e o ácido acético glacial gota a gota, sob agitação magnética. A reação transcorreu por 8 horas, sob refluxo, a 80 °C. Após o termino da reação o material obtido foi evaporado à pressão reduzida, obtendo-se composto escuro oleoso, com característica higroscópica. O produto foi avaliado por CCD,

utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3). Observando-se a degradação do material de partida.

**Experimento 15**

A reação foi realizada partindo-se de 1 mmol (0,198 g) de NF em solução de etanol e excesso de paraformaldeído, sob refluxo, segundo metodologia descrita por GENG e colaboradores (2002). Em balão de 100 mL, adicionou-se o NF previamente solubilizado em etanol (20 mL), por sonicação, e o paraformaldeído. A reação transcorreu por 24 horas, sob refluxo. Após o término, o produto obtido foi filtrado, obtendo-se precipitado escuro com características higroscópicas, igualmente ao observado nos experimentos 13 e 14, e um filtrado amarelo. Ambos foram avaliados por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3). Observando-se no precipitado material de degradação e no filtrado uma única mancha com $R_f$ característico do NF.

### *4.1.2 Tentativa de alquilação do NF*

Com o intuito de se obter formas mais reativas da NFOH, tentou-se a bromoalquilação do NF, através de reação entre o NF e dibromometano ($BrCH_2Br$) (Esquema 2).

**Experimento 16**

Utilizou-se 1 mmol de NF (0,198 g), 1 mmol de $BrCH_2Br$ (0,261 g) e 1 mmol de $K_2CO_3$ (0,132 g), em solução de metanol/água. A reação transcorreu à temperatura ambiente, por 48 horas. Em balão de 50 mL, solubilizou-se o NF por meio de sonicação, utilizando metanol e água. O NF foi levado à agitação magnética e foram adicionados $K_2CO_3$ e $BrCH_2Br$. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3), à temperatura ambiente, por 48 horas. Não houve formação do produto.

**Experimento 17**

Utilizou-se 1 mmol de NF (0,198 g), 1 mmol de $BrCH_2Br$ (0,261 g) e 1 mmol de KOH (0,56 g) em solução de metanol/água. O NF foi colocado em balão de 50 mL e solubilizado em metanol/água por sonicação. O NF foi levado à agitação magnética e adicionou-se KOH e $BrCH_2Br$. A reação foi mantida à temperatura ambiente por 24 horas e acompanhada por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3). O material obtido foi evaporado à pressão reduzida e foi submetido a extração de éter etílico. O extrato etéreo foi novamente evaporado à pressão reduzida. Após ser suspenso em metanol, foi realizada a filtração à pressão reduzida, obtendo-se composto gelatinoso, de cor marrom escura.

## *4.1.3 Preparação de ésteres de aminoácidos*

### 4.1.3.1 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA L-Arginina

**Experimento 18**

O experimento foi realizado com base no processo apresentado em FURNISS (1989), partindo-se de 3 mmol (0,52 g) de L-arginina em suspensão de metanol, em excesso, sob agitação à temperatura ambiente, adicionando-se, em seguida, $SOCl_2$ até a solubilização do composto. O meio foi concentrado à pressão reduzida e o composto resultante, de aspecto viscoso e muito higroscópico, foi secado sob pressão reduzida. Obteve-se sólido higróscopico de cor branca amarelada. O mesmo foi ressuspendido em metanol e colocado em agitação magnética com quantidade equimolar de $NaHCO_3$ por 1 hora. O material obtido foi filtrado, obtendo-se um precipitado branco e um filtrado. O filtrado foi evaporado à pressão reduzida. Esse composto, após intensa secagem, foi analisado no IV e por RMN $^1H$ e de $^{13}C$, caracterizando a formação do éster.

### 4.1.3.2 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA L-Lisina

**Experimento 18**

O experimento foi realizado partindo-se de 1 mmol (0,15 g) de L-lisina em suspensão de metanol, em excesso, sob agitação à temperatura ambiente, adicionando-se, em seguida, $SOCl_2$ gota a gota, na proporção de 1:1, até a solubilização do composto. O meio foi concentrado à pressão reduzida e o composto resultante, viscoso e muito higroscópico, foi secado sob pressão reduzida, obtendo-se sólido higróscopico branco amarelado. O mesmo foi ressuspendido em metanol e colocado em agitação magnética com quantidade equimolar de $NaHCO_3$ por 1 hora. O material obtido foi filtrado, obtendo-se um precipitado branco e um filtrado. O filtrado foi evaporado à pressão reduzida. Esse composto, após intensa secagem, foi analisado no IV, e por RMN $^1H$ e de $^{13}C$, caracterizando a formação do éster.

### 4.1.3.2 SÍNTESE DO ÉSTER ETÍLICO DO Boc-Lys(ClZ)-OH

**Experimento 20**

O experimento foi realizado partindo-se de 1,2 mmol (0,48 g) da lisina protegida (Boc-Lys(ClZ)-OH), dissolvida em quantidade suficiente de etanol (1,5 mL), acrescentando-se 1,2 mmol (0,09 mL) de cloreto de tionila ($SOCl_2$), gota a gota, sob agitação à temperatura ambiente, por aproximadamente, 12 horas. A solução foi rotaevaporada e o produto cristalizado de água fria, filtrado e submetido a RMN de $H^1$ e de $C^{13}$.

### 4.1.3.3 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA ε-Boc-Lys-OH

#### *4.1.3.4.1 Método direto*

**Experimento 21**

O experimento foi realizado partindo-se de 1 mmol (0,246 g) de ε-Boc-Lys-OH em suspensão de metanol, em excesso, sob agitação à temperatura ambiente, adicionando-se, em seguida, $SOCl_2$ gota a gota, na proporção de 1:1, até a solubilização do composto. O meio foi concentrado à pressão reduzida e o composto resultante, viscoso e muito higroscópico, foi secado sob pressão reduzida, obtendo-se um sólido higróscopico de cor branco transparente. Este avaliado por IV e RMN $^1H$.

#### *4.1.3.4.2 Por meio de formação do sal sódico*

**Experimento 22**

A reação adaptada de GREENNE e WHUTS (1999) foi realizada a partir 2 mmol (0,246 g) do aminoácido protegido em solução de DMF com 2 mmol (0,17 g) de $NaHCO_3$ e 1 mmol (0,14 g) de $CH_3IOH$. Ao aminoácido em solução de DMF em banho de gelo seco e acetona (-78 $^0C$) adicionou-se o $NaHCO_3$ e deixou-se reagir por 30 minutos. Adicionou-se, então, o $CH_3IOH$. A reação permaneceu em banho de gelo seco e acetona por 2 horas. O experimento foi interrompido após 24 horas de reação. O meio foi evaporado à pressão reduzida obtendo-se composto oleoso castanho escuro. Em análise de CCD do produto obtido, observaram-se manchas características a produtos de degradação.

#### *4.1.3.4.3 Por meio de EDC/DMAP*

**Experimento 23**

O experimento foi realizado partindo-se de 2 mmol (0,45 g) de ε-Boc-Lys-OH em suspensão de metanol, em excesso, sob agitação em banho de gelo, adicionando-se, 1 mmol (0,08 g) de DMAP. A reação permaneceu em banho de gelo por 1 hora. Acrescentaram-se, então, 2 mmol (0,38 g) de EDC. A reação foi interrompida após 24 horas. O meio foi evaporado à pressão reduzida e procedeu-se à extração de DCM/água. Obteve-se óleo castanho escuro, o qual, avaliado por CCD, correspondeu a produto de degradação.

### 4.1.3.5 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA Lys E PROTEÇÃO DA AMINA ε POR MEIO DE CLORETO DE BENZOÍLA

**Experimento 24**

O experimento foi realizado partindo-se de 1 mmol (0,15 g) de L-lisina em suspensão de metanol, em excesso, sob agitação à temperatura ambiente, adicionando-se, em seguida, $SOCl_2$ gota a gota, na proporção de 1:1, até a solubilização do composto. Após 12 horas, a reação foi colocada em banho de gelo seco e acetona (-78 $^0$C). Adicionou-se o cloreto de benzoíla (ClBZ) na proporção 1:1 (0,06 g). Manteve-se em banho de gelo seco e acetona por mais 2 horas. A reação foi interrompida após 24 horas de seu início. O meio foi evaporado à pressão reduzida obtendo-se um composto oleoso de cor castanho. Em avaliação por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3), observou-se a formação de composto, que se apresentou diferente do produto de partida, e possível material de degradação. Foi feita extração de CDM/água, com baixo rendimento do produto extraído. Tentou-se, então, extração de água/éter, sem resultado satisfatório.

#### 4.1.3.5 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA Boc-Lys(ClZ)-OH E DESPROTEÇÃO DA AMINA α (NUDELMAN *et al.*,1998)

**Experimento 25**

O experimento procedeu-se partindo de 5 mmol (0,42 g) de Boc-Lys-ClZ-OH, em solução de metanol, em excesso, sob agitação à temperatura ambiente, adicionando-se, em seguida, $SOCl_2$ gota a gota, na proporção de 1:1. A reação transcorreu durante a noite. O meio foi concentrado à pressão reduzida e o composto resultante, viscoso e muito higroscópico, foi secado sob pressão reduzida, obteve-se óleo higróscopico branco transparente. Esse composto, após ser seco o máximo possível, foi levado à análise de RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$, na qual se caracterizou a formação do éster.

### *4.1.4 Síntese do dipeptídio Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe.HCl*

**Experimento 29**

O experimento foi realizado utilizando-se Boc-Arg(Tos)-OH e Boc-Lys-ClZ-OH por meio de condensação por EDC/DMAP. Em uma primeira etapa procedeu-se à formação do éster metílico e desproteção da amina α de Boc-Arg(Tos)-OH, por meio de $SOCl_2$ e metanol, seguindo procedimento descrito no Experimento 28. Partiu-se, então, para a condensação dos aminoácidos por meio de EDC/DMAP. O Boc-Lys-ClZ-OH em solução de metanol foi colocado em banho de gelo seco adicionando-se DMAP e, posteriormente, EDC (0,5:1). A reação permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 12 horas. O produto foi evaporado à pressão reduzida e avaliado por CCD, observando-se a formação de um produto, o qual foi analisado por RMN, confirmando a formação do dipeptídio, Boc-Lys-ClZ-Arg(Tos)-OMe. Partiu-se, então, para a desproteção da amina α do agora acoplado a Boc-Lys-ClZ-OH, resultando no Lys-ClZ-Arg(Tos)-OMe. O produto foi analisado por RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$, confirmando a formação do produto desejado.

## 4.1.5 Síntese de bases de Mannich com aminoácidos

### 4.1.5.1 SÍNTESE DA BASE DE MANNICH NF-Arg-OMe

#### *4.1.5.1.1 Tentativa de síntese de base de Mannich entre NFOH e Arg-OMe*

**Experimento 27**

O experimento foi realizado partindo-se de 1 mmol (0,23 g) de NFOH e 1 mmol (0,20 g) de Arg-OMe. Os reagentes foram solubilizados em quantidade suficiente de etanol e submetidos à agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando-se $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3) como sistema solvente. Após esse tempo, filtrou-se o meio reacional, obtendo-se precipitado amarelo amorfo e filtrado amarelo menos intenso, os quais foram avaliados por CCD separadamente. Ambos apresentaram mancha idêntica ao NFOH.

#### *4.1.5.1.2 Tentativa de síntese de base de Mannich entre NF e Arg-OMe em meio ácido*

**Experimento 28**

Partindo-se de 1 mmol (0,19 g) de NF, 3,6 mL de solução de formaldeído a 37% (V/V) e 2 mL de água, ajustou-se o pH entre 4 e 5 com gotas de solução de HCl 10%. A reação foi mantida sob agitação, por 24 horas, à temperatura ambiente, acompanhando-se a formação do NFOH por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH: $CH_3COOH$ (85:5:3). Ajustou-se o pH entre 5 e 6 com solução de NaOH e acrescentou-se 1 mmol (0,20 g) do Arg-OMe, ajustando-se, novamente, o pH. A reação foi continuada sob agitação à temperatura ambiente até a precipitação de produto amarelo, após 20 horas. Este foi filtrado e avaliado por CCD, observando-se duas manchas, uma com $R_f$ referente ao NF e outra com $R_f$ referente ao NFOH. Procedeu-se, então, à extração com éter etílico. O produto obtido foi secado à pressão reduzida e submetido à análise de $^1H$ RMN.

#### *4.1.5.1.3 Síntese de base de Mannich entre NF e Arg-OMe 'in situ"*

**Experimento 29**

A reação foi realizada segundo método descrito por SRIDHAR e colaboradores (2001). Utilizaram-se quantidades equimolares de NF e ArgOMe, com excesso de formaldeído em meio de ácido acético. Em um balão de 100 mL adicionou-se 1 mmol de NF (0,198 g), 1 mmol de ArgOMe (0,188 g), 1 mL de solução de formaldeído a 37% (V/V) e 1 mL de ácido acético glacial. A reação foi efetuada à temperatura ambiente, sob agitação magnética, por 48 horas, sendo acompanhada por CCD. O produto foi filtrado à pressão reduzida, obtendo-se precipitado amarelo escuro e filtrado amarelo claro. O filtrado foi secado à pressão reduzida e tentou-se a cristalização do produto de éter etílico. Purificou-se por meio de passagem em coluna cromatográfica de sílica-gel, utilizando-se como eluente MeOH:$CHCl_3$ 60:40. O produto isolado foi avaliado por CCD, apresentando-se aparentemente puro. Realizaram-se análises por RMN $^1H$ e $^{13}C$ e de espectrometria de massas.

### 4.1.5.2 SÍNTESE DA BASE DE MANNICH NF-Lys-OEt

#### *4.1.5.2.1 Tentativa de síntese de base de Mannich entre NFOH e Lys-OEt*

**Experimento 30**

O experimento foi realizado partindo-se de 1 mmol (0,23 g) de NFOH e 1 mmol (0,18 g) éster etílico da lisina. Os reagentes foram solubilizados em quantidade suficiente de etanol e submetidos à agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando-se $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3) como sistema solvente. Após esse tempo, filtrou-se o meio reacional, obtendo-se precipitado amarelo amorfo e filtrado amarelo menos intenso, os quais foram avaliados por CCD separadamente. Ambos apresentaram mancha idêntica ao NFOH.

### *4.1.5.2.2 Tentativa de síntese de base de Mannich entre NF e Lys-OEt*

**Experimento 31 (CHUNG, 1996)**

Partindo-se de 1 mmol (0,19 g) de NF, 3,6 mL de solução de formaldeído a 37%, e 2 mL de água, ajustou-se o pH entre 4 e 5, com solução de HCl 10%. A reação foi mantida sob agitação, por 24 horas, à temperatura ambiente, acompanhando-se a formação do NFOH por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3). Em uma segunda etapa, ajustou-se o pH reacional entre 5 e 6 com solução de NaOH 10%. Adicionou-se, então, 1 mmol (0,18 g) do Lys-OEt solubilizado em água (2 mL), ajustando-se o pH entre 5 e 6, novamente. A reação foi mantida por 24 horas sob agitação à temperatura ambiente. Filtrou-se o meio reacional, obtendo-se precipitado amarelo intenso e filtrado oleoso amarelo. Ambos foram avaliados por CCD, utilizando como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3). Observariam-se manchas apenas referentes ao produto de partida, no precipitado, enquanto o filtrado apresentou manchas referentes ao produto de partida (NF), do respectivo derivado hidroximetilado (NFOH), além de mancha em de $R_f$ inferior aos anteriores. Evaporou-se o filtrado à pressão reduzida, avaliando-se por CCD e verificando-se a degradação do produto.

### *4.1.5.2.3 Síntese de base de Mannich entre NF e Lys-OEt*

**Experimento 32**

O experimento foi realizado partindo-se de quantidades equimolares: 1 mmol (0,19 g) de NF, 1 mmol (0,18 g) do éster etílico de lisina (Lys-OEt), em etanol, em quantidade suficiente para a solubilização. Adicionaram-se, então, 1,5 mL de solução de formaldeído a 37% (V/V) e 1 mL de ácido sulfúrico, deixando-se por 30 minutos sob agitação (VOGEL, 1985). Obteve-se precipitado amarelo escuro, que foi filtrado, e sobrenadante oleoso, amarelo claro. Ambos foram avaliados por CCD, utilizando como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH: $CH_3COOH$ (85:5:3). O produto sólido isolado mostrou macha única, referente ao

produto de partida (NF), e o filtrado, manchas referentes ao produto de partida e uma com $R_f$ inferior. Em seguida, concentrou-se o filtrado à pressão reduzida, tentando, sem êxito, recristalização de metanol, etanol e isopropanol. O material foi secado à pressão reduzida. Analisando-se, novamente, o material por CCD observou-se a degradação do produto.

#### *4.1.5.2.4 Síntese de base de Mannich entre NF e Lys-OEt "in situ"*

**Experimento 33**

A síntese foi realizada segundo método descrito por SRIDHAR e colaboradores (2001). Partiu-se de 1 mmol de NF (0,198 g), previamente solubilizado em metanol, por meio de sonicação, e 1 mmol de éster etílico de lisina (Lys-OEt) (0,174 g). Em balão de 100 mL adicionou-se o NF solubilizado em metanol, 1 mL de solução de formaldeído a 37% (V/V), 1 mL de ácido acético glacial e o éster do aminoácido solubilizado em metanol. A reação foi mantida, por 80 horas, à temperatura ambiente, sob agitação magnética. O produto obtido foi filtrado à pressão reduzida, obtendo-se precipitado amarelo escuro e filtrado oleoso de cor amarelo claro. Ambos foram avaliados por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (85:5:3). Após secagem do filtrado sob pressão reduzida, tentou-se a cristalização de MeOH/$H_2O$, obtendo-se produto amarelado amorfo. Tentou-se, sem sucesso, recristalização de MeOH/éter etílico. Partiu-se para o isolamento por cromatografia em coluna de sílica-gel, utilizando-se como eluente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ 85:10:3. Isolou-se composto oleoso amarelado, que foi secado à pressão reduzida e avaliado por RMN $^1H$.

## 4.1.6 Síntese da Base de Mannich com o dipeptídio

### 4.1.6.1 SÍNTESE DE BASE DE MANNICH NF-LYS(CIZ)-ARG(TOS)-OMe

**Experimento 34**

O experimento foi realizado segundo metodologia descrita no experimento 30 porém utilizando NF e o dipeptídio, previamente sintetizado como descrito no experimento 26. A reação permaneceu por 1 semana sob agitação à temperatura ambiente, acompanhada por CCD. Após a interrupção da reação, observaram-se por CCD mancha referentes ao dipeptídio e outra, a qual se atribuiu ao produto desejado. O meio foi evaporado sob pressão reduzida. Em nova análise por CCD, observaram-se manchas referentes ao dipeptídio, ao NF e outra provavelmente do produto esperado. O meio foi ressuspendido em pequena quantidade de metanol e filtrado à pressão reduzida, obtendo-se precipitado de cor amarela intensa, cromatograficamente igual ao NF. O filtrado foi evaporando à pressão reduzida. O isolamento do composto obtido foi realizado por meio de cromatografia em coluna de sílica-gel, utilizando como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH (60:40). O composto obtido foi avaliado por RMN $^1H$ e $^{13}C$.

# V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

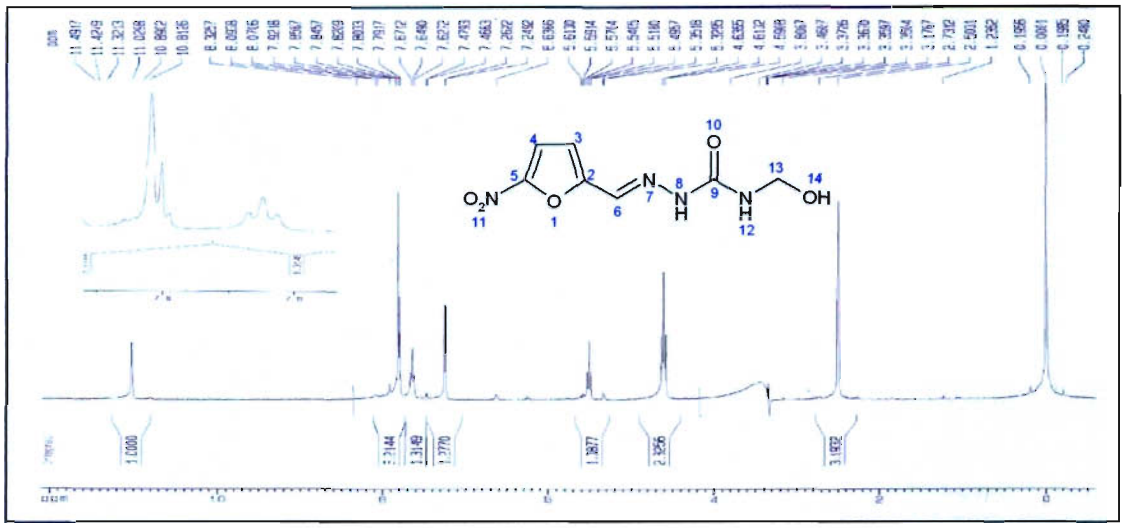
## 5.1 SÍNTESE

### 5.1.1 Síntese do hidroximetilnitrofural

Devido ao aspecto promissor do derivado hidroximetilado do nitrofural (NFOH) (CHUNG *et al.*, 2003), intermediário fundamental para formação das bases de Mannich, decidiu-se avaliar metodologia descrita por CHUNG e colaboradores (2003), tentando otimizar a obtenção do referido derivado. Realizaram-se, então, outras tentativas com o intuito de se obter melhores rendimentos e em menor tempo de reação.

Em uma primeira tentativa tentou-se reproduzir o método descrito em CHUNG (2003), sem sucesso. Como foi comprovado, inicialmente por CCD, observou-se, apenas, mancha com $R_f$ característico do NF. O composto obtido foi, então, avaliado por RMN de $^1H$ e de $^{13}C$, confirmando-se a estrutura do NF e comprovando-se não ter ocorrido a reação. Considerou-se, nesse caso, que a falta de pureza da solução de formaldeído a 37% (V/V) teria contribuído para o insucesso. Outro fator importante, porém, seria a possibilidade de o NFOH estar sendo degradado ao longo da reação. Repetiu-se, então, o Experimento 1, agora utilizando reagentes de maior pureza. O produto sólido obtido nesse experimento foi analisado por CCD utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ (95:5:3). Observou-se no precipitado apenas mancha com $R_f$ 0,72, provavelmente do produto desejado, pois a introdução do grupo hidroximetílico conferiria maior polaridade ao produto, acarretando $R_f$ menor. No entanto, análise posterior, por CCD, mostrou duas manchas: uma com $R_f$ 0,72, a qual se considerou como sendo do produto desejado, e outra com $R_f$ 0,8 característica do NF, como se considerou no Experimento 1, despertando atenção para a possível reversão do produto de partida ao seu precursor. Partiu-se, então, para o isolamento do produto por meio de cristalização. O precipitado foi solubilizado em menor quantidade possível de metanol a quente, com auxilio de

sonicação, e adicionaram-se gotas de água fria até turvação do meio. A solução foi resfriada por 12 horas para acelerar a cristalização. Após este período, o composto foi filtrado e seco a pressão reduzida. Realizou-se nova análise por CCD, observando-se, mancha única com $R_f$ 0,72. Foram realizadas análises de RMN $^1H$ (Espectro 1), confirmando a obtenção do derivado hidroximetilado, com rendimento de 52,4 %, com as devidas atribuições na Tabela III. O ponto de fusão do composto obtido foi 172 °C.



Espectro 1 – RMN $^1H$ (300 MHz, DMSO-$d_6$, δ ppm) de hidroximetilnitrofural.

**Tabela III** – Atribuições de RMN $^1H$ do NFOH

| **RMN $^1H$ (DMSO-$d_6$), 300 MHz, δ= ppm** |
|---|
| 4,61 (t, J=6,6 Hz, 2H, $H_{13}$); 5,57 (t, J=6,9 Hz, 1H, $H_{14}$); 7,25 (d, J=3,9 Hz, 1H, $H_3$); 7,64 (t, J=6,3 Hz, 1H, $H_{12}$); 7,80 (s, 1H, $H_6$)*; 7,81 (d,J=3,9 Hz, 1H, $H_4$)*; 11,02 (s, 1H, $H_8$) |

*sinais sobrepostos

No Experimento 3, utilizou-se técnica procedendo à reação em meio de HCl, também descrita por CHUNG (1996). No entanto, optou-se por repetir a síntese, como ponto de partida para eventuais mudanças reacionais. O pH foi levado a 2,5 e a reação foi realizada por 24 horas. O produto líquido obtido mostrou, em CCD, haver mistura entre o material de partida e o composto desejado. Rotaevaporou-se o meio e tentou-se a cristalização de $MeOH/H_2O$, obtendo-se produto sólido de cor amarela intensa, que foi analisado por RMN $^1H$, caracterizando-se a obtenção de NFOH, com rendimento de 28%.

O Experimento 4 foi realizado nas mesmas proporções do Experimento 1, utilizando-se, porém, como base bicarbonato de potássio. Considerou-se que em condições básicas mais brandas não haveria a reversão do composto desejado. A reação processou-se exatamente como no Experimento 2. Por CCD, constatou-se, inicialmente, mancha de formação do produto e em nova análise, mancha com $R_f$ 0,8 referente apenas ao NF. Considerando novamente a idéia de reversão do produto formado (NFOH) ao seu precursor (NF).

Partiu-se, então, para tentativa de síntese do NFOH por meio de sonicação (Experimento 5), pretendendo-se, com isso, diminuir o tempo de reação e impedir a reversão do composto obtido a seu precursor. A reação foi interrompida após 5 horas. Tentou-se, então, a purificação desse produto por cristalização de metanol/éter etílico, não ocorrendo, entretanto, o isolamento do mesmo após 12 dias sob refrigeração. Realizou-se, sem seguida, nova análise em CCD, observando-se somente manchas referentes ao produto de partida, indicando, novamente, a reversão do derivado ao fármaco de partida.

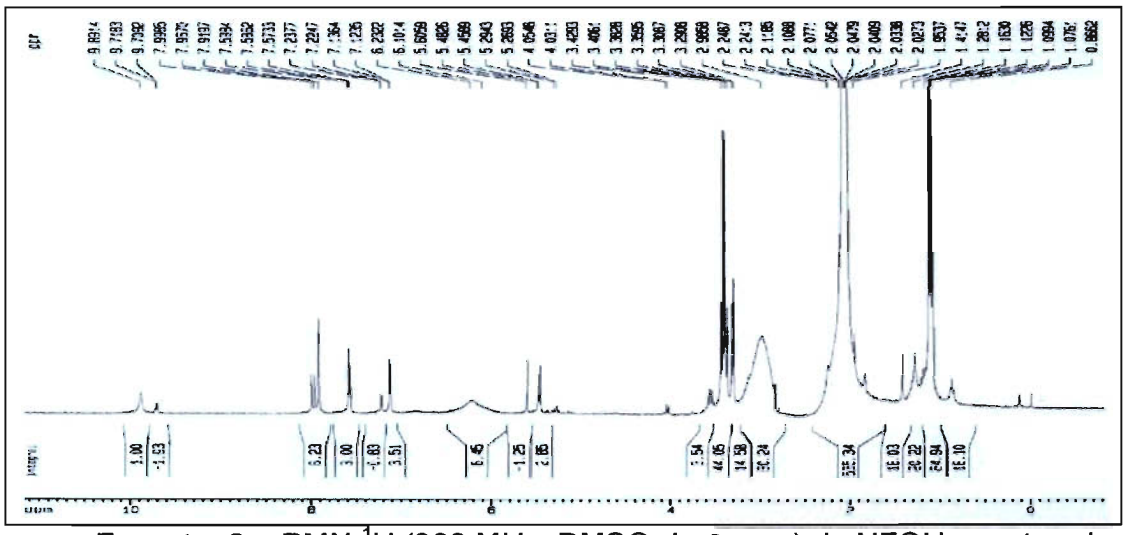
Esses resultados de reversão do composto obtido ao produto de partida conduziram à hipótese de que se estabelecia equilíbrio entre o NF e o composto obtido. Dessa forma, buscaram-se, então, alternativas para deslocar esse equilíbrio em favor da formação do produto desejado, o NFOH.

Realizou-se, assim, experimento utilizando como solvente a água proveniente da solução de formaldeído a 37% (Experimento 6). O experimento foi interrompido após 2,5 horas, ao primeiro sinal de formação do derivado. Apesar do pouco tempo de reação, o que se atribuiu à utilização de sonicação, o produto

desejado não foi obtido após tentativa de cristalização em metanol/éter e metanol/água. Verificando-se que o produto obtido apresentava características higroscópicas, liofilizou-se o mesmo com o intuito de novas tentativas de isolamento. Após a liofilização, foi obtido um composto escuro com características oleosa e higroscópica, diferente do previsto.

Como o descrito no Experimento 7, a solução de formaldeído foi adicionada lentamente, na tentativa de, por meio de CCD, determinar o tempo de formação do NFOH e observar o período em que começaria a haver a reversão. Verificou-se que havia a formação do produto desejado após 2 horas e se mantinha, ao menos, até 5 horas após o início da adição de formaldeído. No entanto, após 24 horas de reação, verificou-se, por CCD, mancha relativa ao produto de partida. Esse resultado indicou, mais uma vez, que o produto desejado foi formado e depois retornou ao material de partida, confirmando a consideração sobre o equilíbrio na reação.

O Experimento 8 foi realizado adicionando-se a solução de formaldeído em duas etapas com o intuito de deslocar o equilíbrio em favor da formação do derivado hidroximetilado. A adição do formaldeído foi realizada, como descrito, metade no início da reação e a outra metade quando se verificaram indícios de formação do produto após 2,5 horas de reação. A reação foi mantida por 24 horas. O produto foi isolado por filtração e analisado por CCD, apresentando mancha somente relativa ao NF, confirmando, uma vez mais, a hipótese de equilíbrio. O experimento foi repetido e interrompido no período de 5 horas de reação, com indicativos de formação do produto . Após o isolamento do composto por filtração, o mesmo não se apresentou totalmente puro mediante análise por CCD. Em análise posterior por $^1$H RMN, constatou-se contaminação do produto obtido, provavelmente, com o resultado da polimerização do formaldeído. Tal contaminação pode ser observada no Espectro 2 nas regiões entre 4 e 5 ppm e entre 7 e 9 ppm. Porém, a formação do derivado hidroximetilado desejado é confirmada pelo dubleto em 5,46 ppm, característico de OH, e pelo dubleto em 4,64 ppm, correspondente ao $CH_2$ do grupo hidroximetílico introduzido.



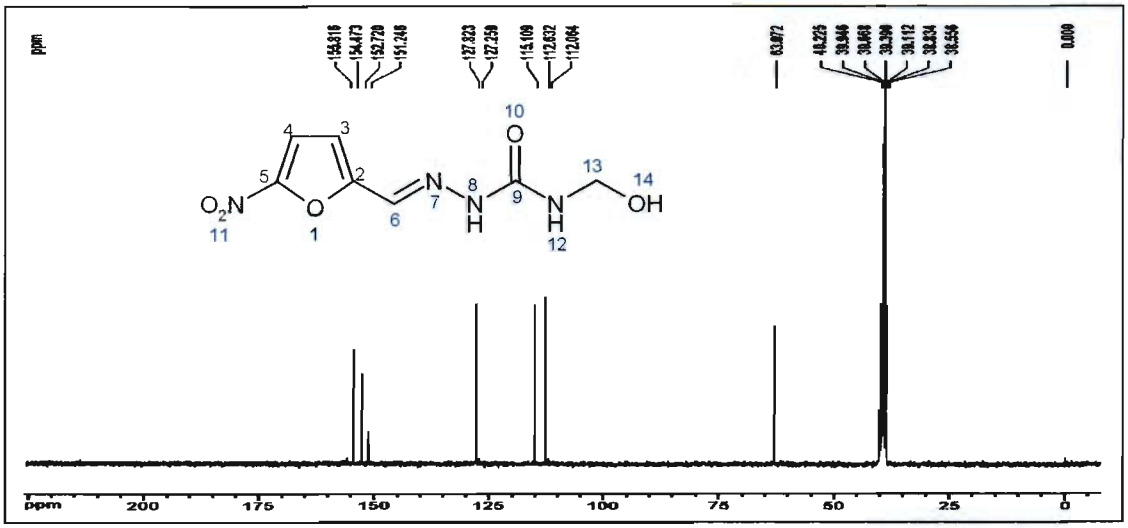
Espectro 2 – RMN $^{1}H$ (300 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) de NFOH, mostrando a contaminação na região ente 4 e 5 e ente 7 e 9 ppm.

No experimento 9, tentou-se a reação utilizando THF como solvente com o intuito de proceder à reação em solução e não em suspensão, como anteriormente efetuado, aumentando-se, assim, o contato entre os reagentes e, possivelmente, diminuindo-se o tempo de reação. Análise por CCD mostrou a formação do produto com 40 minutos de reação. Tentou-se cristalização de metanol e éter etílico, sem êxito. O meio reacional foi, então, evaporado à pressão reduzida, obtendo-se produto higroscópico escuro, não possibilitando análises posteriores.

Repetiu-se o experimento 8 (Experimento 10), buscando-se obter o derivado hidroximetilado do NF puro, procedendo-se à recristalização de MeOH/$H_2O$. O produto recristalizado foi secado à pressão reduzida, sendo o ponto de fusão 172 °C. Foi analisado por RMN $^{1}H$, $^{13}C$ e por espectroscopia de massas. Após repetição do experimento, para testar a reprodutibilidade, obteve-se rendimento do produto puro de 61,4%.

A análise do espectro de RMN $^{1}H$ (Espectro 1), já apresentado, do espectro de $^{13}C$ (Espectro 3), e as respectivas atribuições Tabela IV, e do espectro de massas (Espectro 4) e as fragmentações correspondentes, apresentadas na Tabela V, permitiram a caracterização do produto obtido nesse experimento como

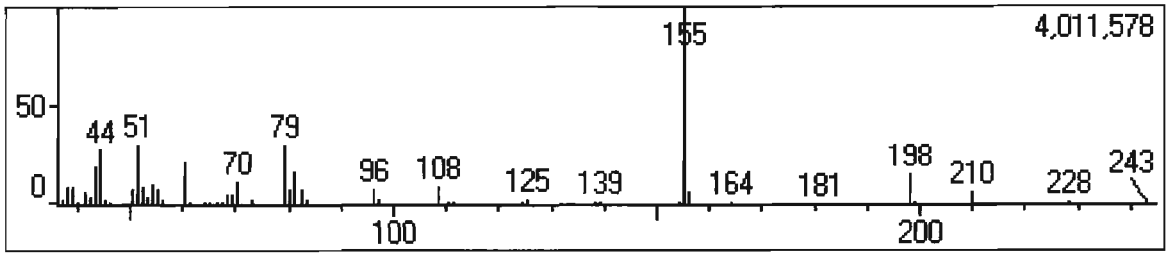
o NFOH. No espectro de massas, o íon molecular respectivo aparece em m/z 228, observando-se pequena contaminação em m/z 243, o que se acredita ser devido à polimerização do formaldeído no meio reacional. O espectro de massas do hidroximetilnitrofural pode ser comparado em suas fragmentações de menores massas moleculares com o espectro de massas do nitrofural (Espectro 5). A análise no IV (espectro 6) mostra a presença de banda de estiramento OH, correspondente ao grupo hidroximetilado, e a presença de amidas secundárias (Tabela VI).



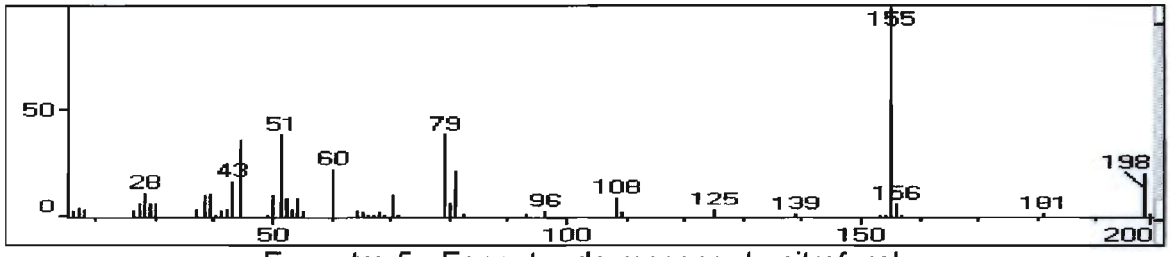

Espectro 3 – RMN $^{13}C$ (75 MHz, DMSO-$d_6$, δ ppm) de hidroximetilnitrofural.

**Tabela IV** – Atribuições de RMN $^{13}C$ do NFOH

| **RMN $^{13}C$ (DMSO-$d_6$), 75 MHz, δ= ppm** |
|---|
| 39,39 (DMSO-$d_6$); 63,07 ($C_{13}$); 112,63 ($C_3$); 115,11 ($C_4$); 127,82 ($C_6$); 151,25 ($C_2$); 152,42 ($C_5$); 154,47 ($C_9$); |



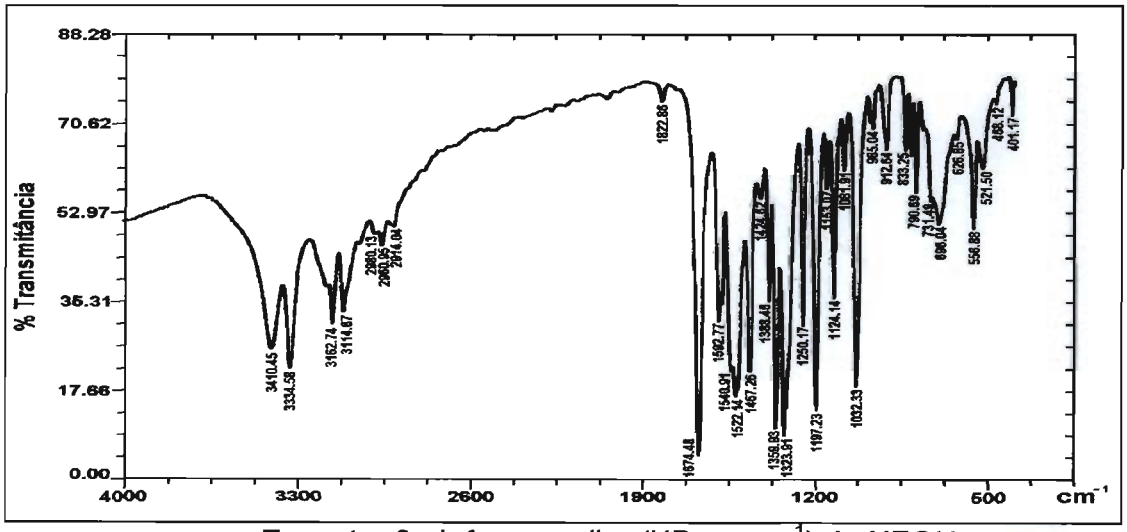

Espectro 4 - Espectro de massas do hidroximetilnitrofural.




Espectro 5 - Espectro de massas do nitrofural.

**Tabela V** - Principais fragmentações do hidroximetilnitrofural

| m/z | % | Formula molecular | Fragmentos |
|---|---|---|---|
| 228 | 1,88 | $C_7N_4O_4H_8$ | $[M]^+$ |
| 210 | 7,20 | $C_7N_4O_3H_6$ | $[M - H_2O]^+$ |
| 198 | 5,80 | $C_6N_4O_3H_6$ | $[M - CH_2O]^+$ |
| 155 | 100,00 | $C_6N_3O_3H_5$ | $[M - CNH_3O]^+$ |




Espectro 6 - Infravermelho (KBr, $\nu$ $cm^{-1}$) do NFOH.

**Tabela VI** – Atribuição das bandas de absorção no IV do NFOH

| $\nu_{máx}$ (KBr, $\nu$ $cm^{-1}$) | Atribuição |
|---|---|
| 3450-3300 | $\nu_{O-H}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular |
| 3334 | $\nu_{N-H}$ assimétrica de amida secundária |
| 3162 | $\nu_{N-H}$ simétrica de amida secundária |
| 2980<br>2960 | $\nu_{C-H}$ de alifático |
| 1674 | $\nu_{C=O}$ de amida secundária |
| 1592 | $\delta_{N-H}$ de amida |
| 1522 | $\nu$ assimétrica de $NO_2$ aromático |
| 1424 | $\delta_{CH2}$ (levemente deslocado por estar entre **N** e **O**) |
| 1388 | $\nu_{C-N}$ de amida |
| 1359 | $\nu$ simétrica de $NO_2$ aromático |
| 1250 | $\nu_{C-N}$ de amida secundária |
| 1124 | $\nu_{C-O}$ de álcool |

Em nova tentativa para diminuir o tempo de reação utilizou-se sonicação. As condições reacionais foram análogas às do experimento 1, utilizando, porém, agitação por sonicação (Experimento 11). Obteve-se, em tentativas de cristalização, composto escuro de características higroscópicas igual ao descrito no experimento 9. Analisando o produto obtido por CCD observaram-se várias manchas caracterizando produto de degradação. Em nova tentativa a reação foi realizada em erlenmeier, pois, nesse frasco, as ondas no ultrassom são mais bem absorvidas pelo meio reacional. Adicionou-se detergente no banho da lavadora para facilitar o processo de implosão (MASON, 1990). No Experimento 12, adicionou-se a solução de formaldeído em duas etapas na tentativa de reproduzir as condições do Experimento 10. Os primeiros indícios de formação do NFOH ocorreram após 30 minutos de reação, tempo no qual foi adicionada a segunda metade da solução de formaldeído. A reação se completou em 2 horas e 30 minutos, procedendo-se ao isolamento do produto contido no precipitado como descrito no experimento 10, por recristalização de $MeOH/H_2O$. Este apresentou perfil cromatográfico idêntico ao encontrado para NFOH. O produto foi caracterizado por RMN, confirmando o estrutura do NFOH, porém com rendimento de 30%, inferior ao obtido no experimento 10.

Como alternativa, tentou-se a síntese do hidroximetilnitrofural, por meio da reação com paraformaldeído. Os experimentos correspondentes (13 a 15) não apresentaram bons resultados, sendo o composto escuro obtido de caráter viscoso e higroscópico, não apresentando condições de análises posteriores, o que levou a considerar que houve degradação em presença de solvente orgânico e aquecimento. Porém, no Experimento 15, obteve-se filtrado amarelo, o qual, avaliado por CCD, apresentou mancha característica do NF, mostrando que o produto desejado não se formou.

A tabela V apresenta comparação entre os métodos em que se obteve o NFOH e o método descrito por CHUNG(1996), merece realce para o método empregado no experimento 10, adicionando-se formaldeído em duas etapas, que se mostrou promissor, com menor tempo de reação e rendimento maior.

**Tabela V** - Comparação entre pH, tempo de reação e o rendimento alcançado nos métodos utilizados

| Método (Experimento) | pH | Tempo (h) | Rendimento (%) |
|---|---|---|---|
| CHUNG (1996) | 10 | 49 | 56 |
| 3 | 2,5 | 24 | 28 |
| 10 | 11 | 5 | 61 |
| 12 | 10 | 2,5 | 30 |

### *5.1.2 Tentativa de alquilação do NF*

A síntese do derivado alquilado do NF, realizada entre o NF e o dibromometano, foi proposta com o intuito de facilitar a reação com o aminoácido e com isso permitir a obtenção, em menor tempo e com rendimento maior, dos produtos finais. Sendo o bromo um melhor *"leaving group"*, a reação ocorreria com maior facilidade.

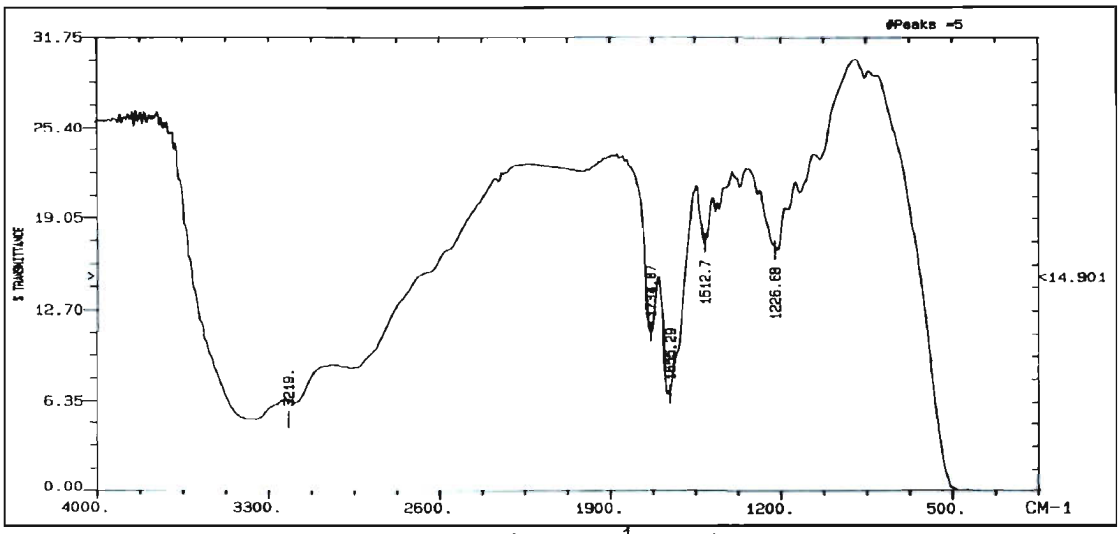
O Experimento 16 foi realizado utilizando-se como base o $K_2CO_3$, buscando aproximar as condições de basicidade daquelas utilizadas para a síntese do NFOH. Porém, análises por CCD mostraram manchas características do NF, chegando à constatação de que não houve formação do produto planejado. Como o produto desejado não foi obtido nas condições reacionais utilizadas nesse experimetno, tentou-se a reação utilizando-se KOH (Experimento 17). Sendo o KOH uma base mais forte que o $K_2CO_3$, considerou-se que a amida terminal do NF seria desprotonizada mais facilmente e com isso obter-se-ia melhor resultado, ou seja, o derivado bromometilado planejado. Novamente, o NF foi solubilizado em metanol com auxílio de sonicação. No entanto, houve a necessidade de se adicionar água, aos poucos, até a dissolução completa do material. Por análise em CCD, observaram-se várias manchas, nenhuma das quais com $R_f$ igual ao do NF, o que levou a supor a ocorrência de degradação do produto de partida. Após o produto obtido ser evaporado à pressão reduzida, efetuou-se extração de éter etílico/água, não se obtendo o resultado esperado. O composto foi novamente evaporado à pressão reduzida e suspenso em metanol com o intuito de analisar o material obtido. A suspensão foi filtrada sob pressão reduzida, obtendo-se precipitado gelatinoso insolúvel, que não foi possível de ser analisado. Cromatografou-se o filtrado, utilizando-se o mesmo sistema solvente. Obteve-se perfil idêntico ao da cromatografia anterior, levando à hipótese de degradação.

### 5.1.3 Preparação de ésteres de aminoácidos

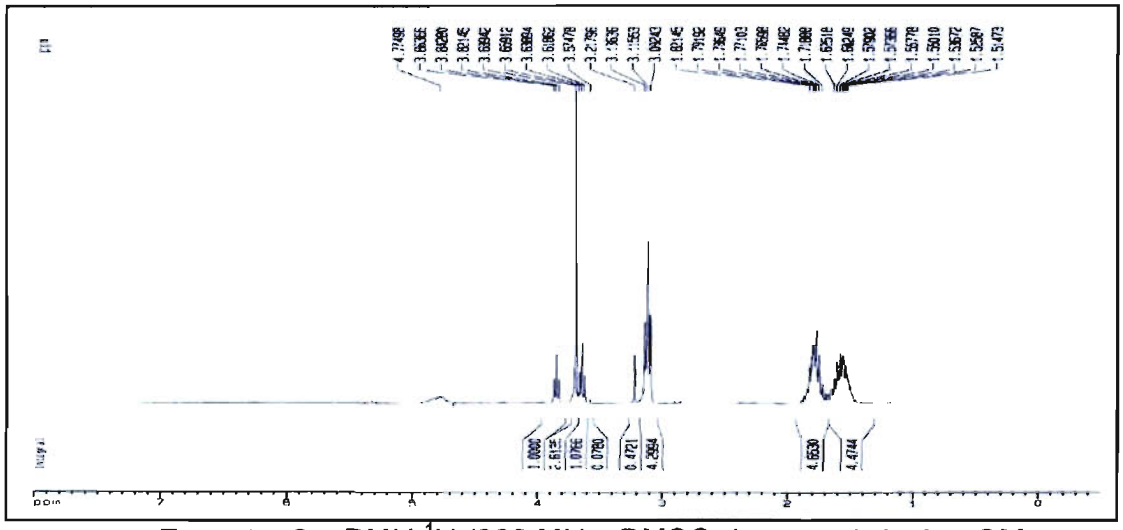
Os ésteres de aminoácidos foram sintetizados com o intuito de proteção da carbonila. Sendo a carbonila um grupo funcional mais reativo que as aminas, essa proteção faz com que o grupo amina se torne mais reativo no aminoácido, possibilitando a reação de Mannich na amina planejada.

#### 5.1.3.1 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA L-Arginina (FURNISS, 1989)

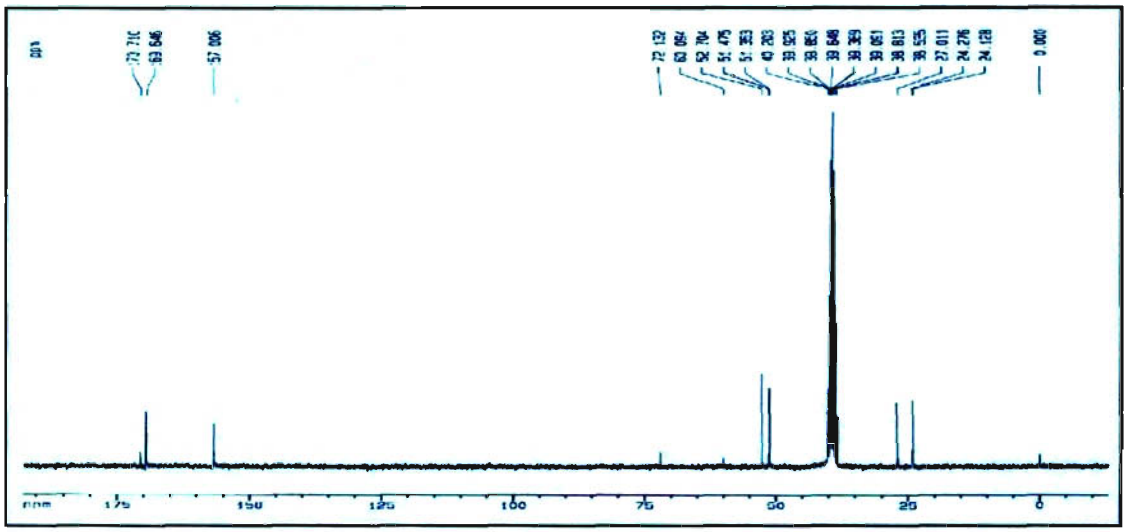
O experimento 18 foi realizado segundo técnica descrita em FURNISS (1989), colocando-se a L-Arginina em suspensão em álcool metílico e adicionando-se, gota a gota, $SOCl_2$ na proporção de 1:1 com o aminoácido, deixando-se reagir por tempo necessário à solubilização de todo o aminoácido suspenso. O produto obtido foi ressuspenso em metanol e colocado em agitação magnética com quantidade eqüimolar de $NaHCO_3$, com o intuito de retirar o cloridrato formado na reação de esterificação. O produto sólido branco obtido foi foi seco a pressão reduzida e analisado no IV (Espectro 8), observando banda de absorção de estiramento carbonila a 1734 $cm^{-1}$, característica de éster derivado do aminoácido. Foram realizadas, ainda, análises de RMN $^1H$ e $^{13}C$, os quais apresentaram sinais referentes aos hidrogênios da metoxila de éster derivado do aminoácido em 3,69 ppm (Espectro 9) e referente a carbonila de éster em 170,71 ppm (Espectro 10).




Espectro 8 – IV (NaCl, $\nu$ $cm^{-1}$) do Arg-OMe.



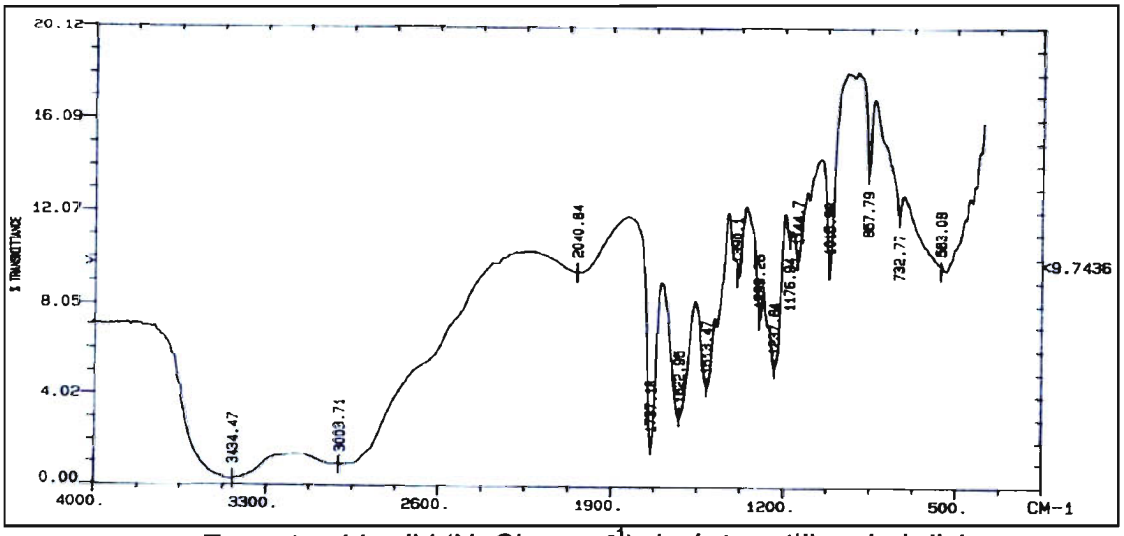
Espectro 9 – RMN $^{1}H$ (300 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) do Arg-OMe.



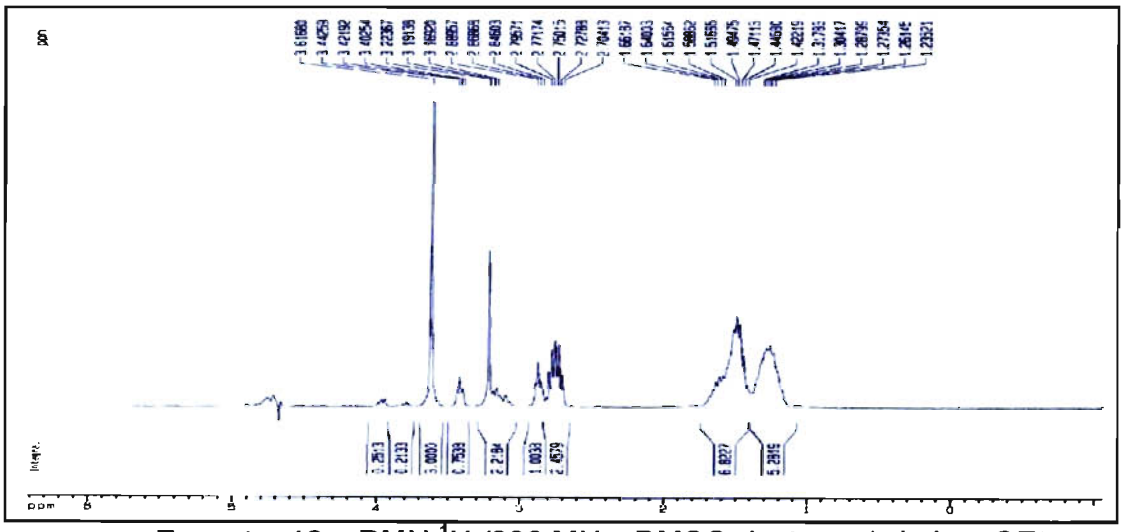
Espectro 10 – RMN $^{13}C$ (75 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) do Arg-OMe.

### 5.1.4.2 SÍNTESE DO ÉSTER ETÍLICO DA L-Lisina

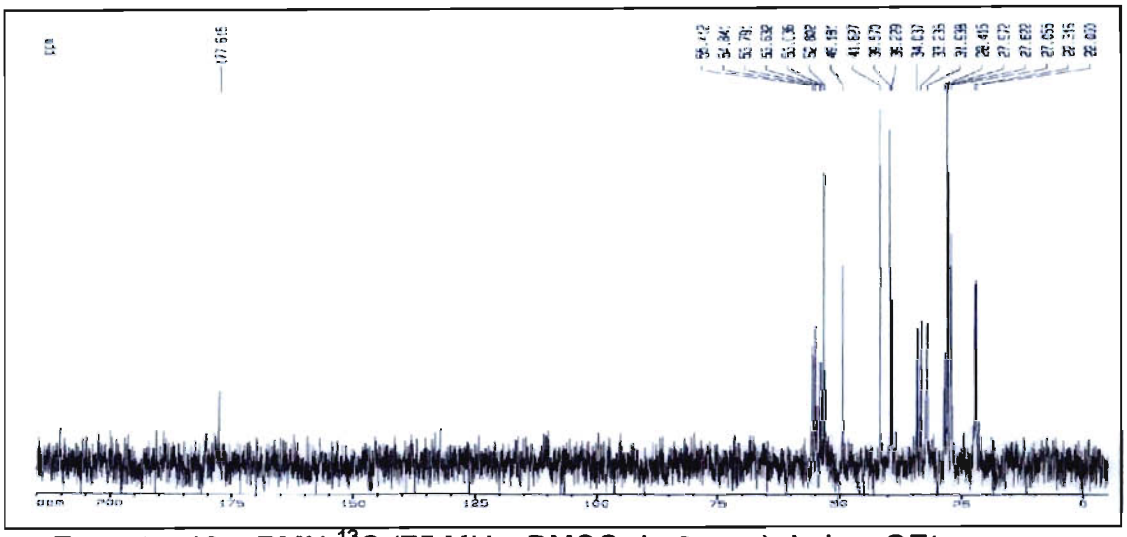
O Experimento 19 foi realizado segundo técnica descrita em FURNISS (1989) e o produto obtido, após secagem sob pressão reduzida, foi analisado no IV (Espectro 11), observando-se banda de estiramento carbonila a 1737 $cm^{-1}$, região característica de éster, confirmando a formação do produto planejado. Foram realizadas, ainda, análises de RMN $^1H$ e de $^{13}C$. O Espectro 13 apresenta o sinal referente a carboxila de éster derivado do aminoácido em 177,61 ppm. Já o espectro de $^1H$ (Espectro 12) apresenta sinal característico dos hidrogênios referentes ao grupo $OCH_2$- da etoxila em 3,61 ppm, confirmando a formação do éster derivado da lisina planejado.




Espectro 11 – IV (NaCl, $\nu$ $cm^{-1}$) do éster etílico de L-lisina.




Espectro 12 – RMN $^1$H (300 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) do Lys-OEt.

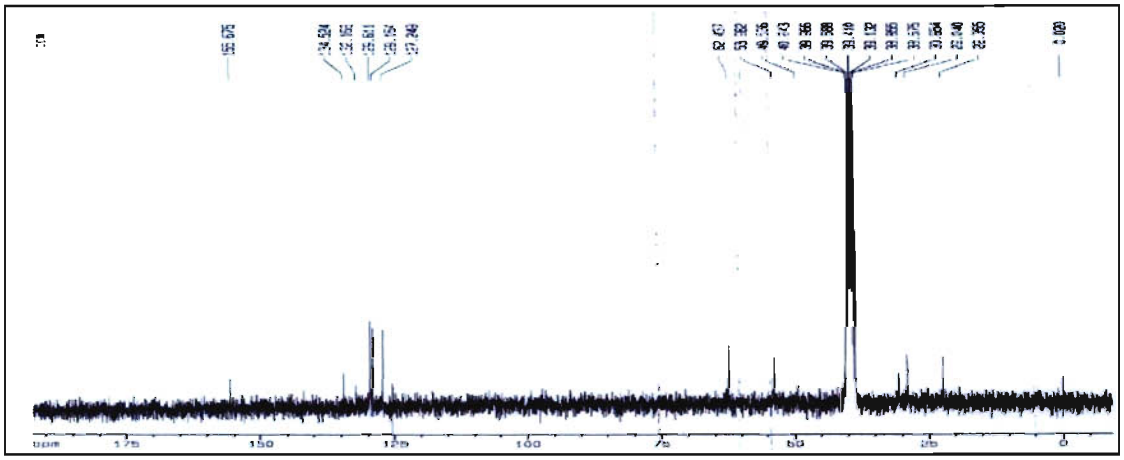


Espectro 13 – RMN $^{13}C$ (75 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) do Lys-OEt.

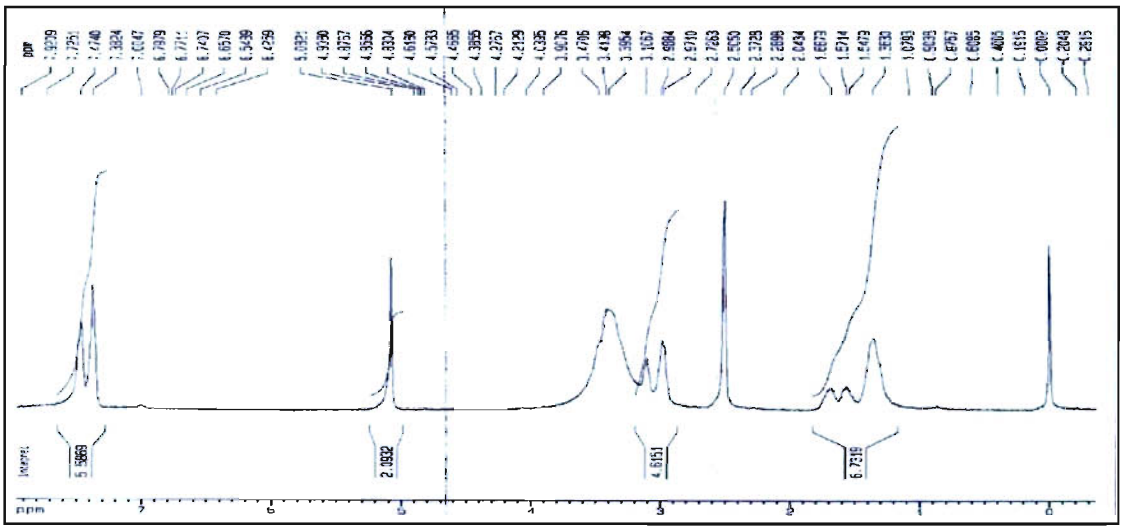
### 5.1.4.3 TENTATIVA DE SÍNTESE DO ÉSTER ETÍLICO DO Boc-Lys(ClZ)-OH

Esse éster foi proposto com o intuito de utilizá-lo na síntese da base de Mannich com o NF. Estando os grupos amínicos protegidos, após reação de esterificação seria efetuada a desproteção seletiva na amina $\alpha$ para posterior síntese da base de Mannich correspondente. Obtida a base de Mannich NF-Lys, esta tornar-se-ia intermediário essencial para o posterior acoplamento com o arginina, formando, assim, a base de Mannich com o dipeptídio Lys-Arg. O experimento foi realizado, como descrito, seguindo metodologia de FURNISS (1989) já utilizada com sucesso nos experimentos 19 e 20.

Os objetivos deste experimento não foi alcançado. Por meio da análise de RMN $^{13}C$ (Espectro 14), não se observaram sinais referentes à carbonila de ácido, tampouco aqueles correspondentes ao grupamento etoxila. Também, pode-se verificar, por RMN $^{1}H$ (Espectro 15), a ausência dos sinais de hidrogênios metílicos do Boc, que apareceriam entre 0,9 e 1,1 ppm, sinal correspondente a 9 hidrogênios e não 3, como observado no espectro. Provavelmente o resíduo de HCl, proveniente do cloreto de tionila, pode ter hidrolisado o grupo protetor, Boc, desta molécula.



Espectro 14 – RMN $^{13}C$ (75 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) do produto do Experimento 20.

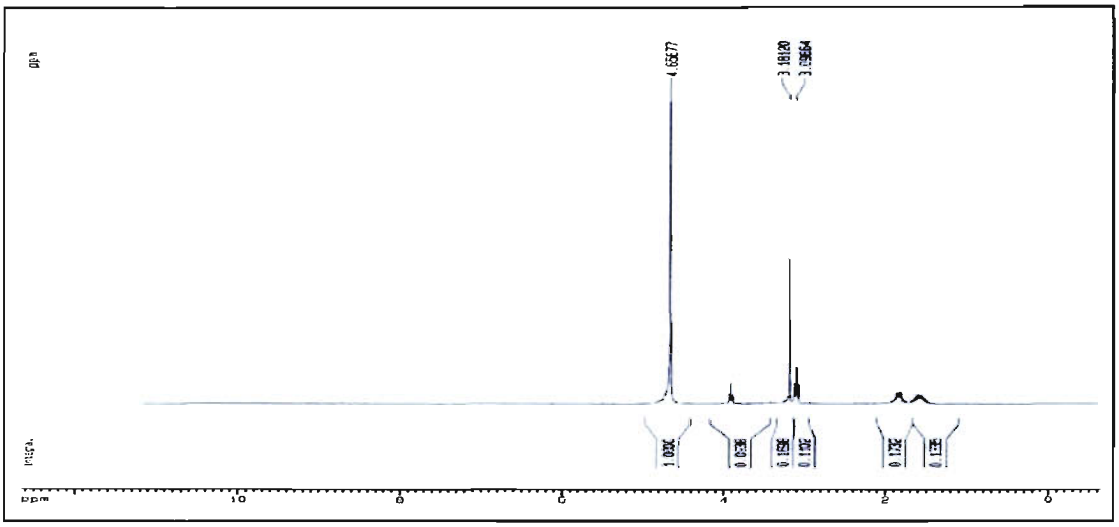


Espectro 15 – RMN $^{1}H$ (300 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) do produto do Experimento 20.

### 5.1.4.4 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA ε-Boc-Lys-OH

A utilização do aminoácido protegido na amina encontrada na posição ε tem como objetivo atingir a seletividade da reação de Mannich, que seria realizada posteriormente. O Experimento 21 procedeu segundo metodologia descrita por FURNISS (1989), em razão de essa ter sido realizada com sucesso nos

Experimentos 18 e 19. Porém, como no Experimento 20, o grupo protetor, Boc, não resistiu às condições empregadas. Isso pode ser verificado pelo espectro de RMN $^1H$ (Espectro 16) do composto obtido, que não apresenta sinal na região entre 0,9 e 1,1 ppm, referente a 9 hidrogênios, característico do grupamento Boc. É importante salientar que devido à característica altamente higroscópica do produto os espectros de RMN não foram obtidos com boa resolução.



Espectro 16 – RMN $^1H$ (300 MHz, $D_2O$, $\delta$ ppm) do produto obtido no Experimento 21.

Visto que o grupamento Boc, utilizado como forma de proteção da amina $\varepsilon$, não resiste às condições empregadas no Experimento 20, buscaram-se na literatura alternativas para a proteções de grupos carboxílicos, verificando que uma das formas usuais de proteção consiste na obtenção do éster correspondente por meio da formação de sal, segundo o grau de reatividade: Cs>Na>>K>>Li;I>Cl;HMPA.DMSO>DMF (GREENE, WUTS, 1999). Procedeu-se, então, à tentativa de esterificação por meio da formação de sal sódico do grupo carboxílico do aminoácido (Experimento 22). O método proposto seria, em uma primeira etapa, a formação do sal sódico do $\varepsilon$-Boc-Lys-OH e, em seguida, a formação do éster por meio de alquilação com $CH_3IOH$. A reação foi realizada

inicialmente em banho de gelo seco e acetona, por se tratar de reação exotérmica e, também, devido à volatilidade do alquilante. Após 24 horas de reação, observou-se o escurecimento do meio. O meio foi evaporado à pressão reduzida, obtendo-se produto oleoso de cor castanha escura. Avaliado por CCD, o produto obtido mostrou degradação do produto de partida, pois a placa apresentou várias manchas.

No Experimento 23, utilizando-se EDC/DMAP, não foi possível obter o produto esperado, observando-se apenas compostos de degradação do aminoácido.

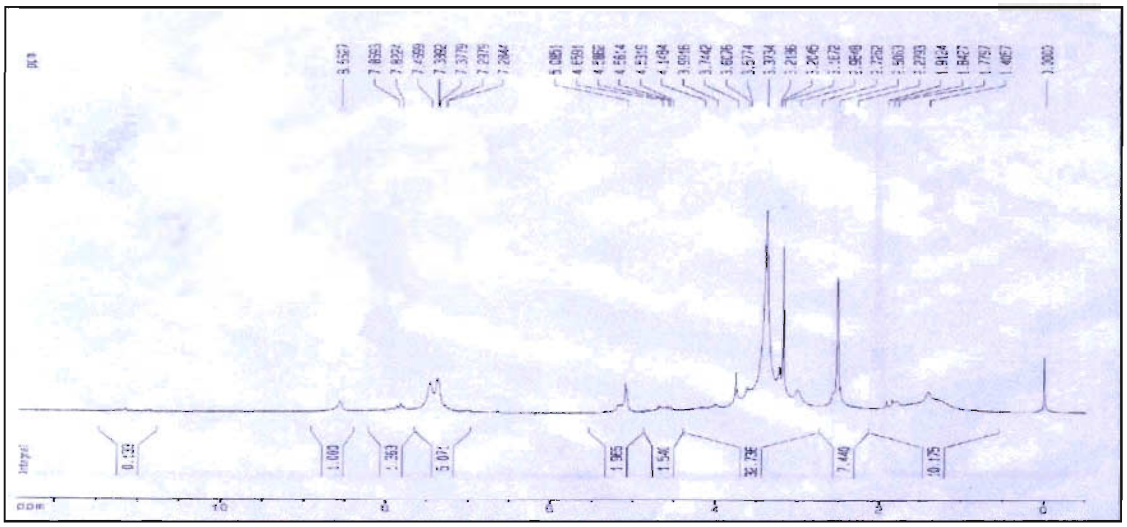
#### 5.1.4.5 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA Lys E PROTEÇÃO DA AMINA ε POR MEIO DE CLORETO DE BENZOÍLA

Não obtendo resultados positivos nas tentativas de esterificação do ε-BOC-Lys-OH, partiu-se para a síntese do éster da lisina e posterior tentativa de proteção da amina ε. O Experimento 24 foi realizado utilizando-se L-Lisina. Procedeu-se à formação do éster metílico, como descrito, por metodologia já empregada, com bons resultados, nos experimentos 19 e 20. A tentativa de proteção da amina ε se deu por meio de alcilação por cloreto de benzoíla. Após verificar-se a formação do éster metílico de lisina por meio de espectrometria de IV, procedeu-se à tentativa de proteção da amina ε, como descrito (GREENE, WUTS, 1999). A extração de CDM/água realizada mostrou-se ineficiente, pois a quantidade de composto obtido não foi suficiente nem mesmo para análises. A extração de água/éter também não mostrou bom resultado, não dispondo, assim, de produto suficiente para a avaliação estrutural.

#### 5.1.4.6 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DA Boc-Lys(CIZ)-OH E DESPROTEÇÃO DA AMINA α

Os resultados obtidos nos Experimentos 19 e 20 levaram ao estudo da estabilidade do grupo protetor Boc. Segundo DHAON, OLSEN, RAMASAMY

(1981), pode-se utilizar HCl para proteção de grupos carboxílicos através de esterificação e desproteção concomitante do grupamento Boc de aminas. Realizou-se, então, o Experimento 25, partindo-se do Boc-Lys(ClZ)-OH solução de metanol e $SOCl_2$. O composto obtido foi avaliado por RMN $^1H$ (Espectro 17). A ausência de sinal entre 0,8 e 1,1 ppm no espectro de RMN $^1H$ indica que o Boc foi cindido durante a reação. O espectro não apresentou boa resolução, porém pode-se verificar o sinal de formação do éster sobreposto com a água na região de 3,6 ppm, que corresponde aos hidrogênios da metoxila.

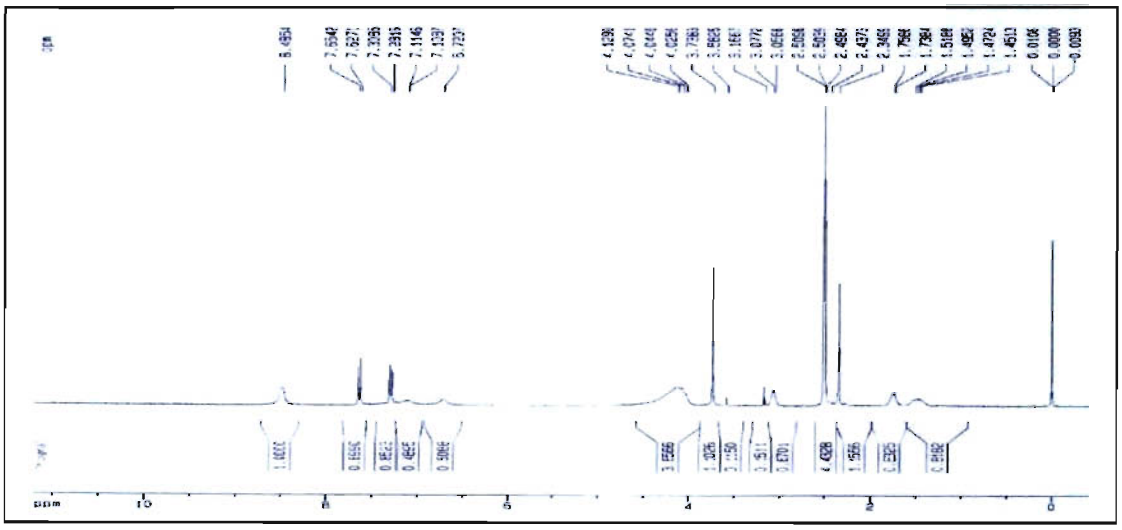


Espectro 17– RMN $^1H$ (300 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) do produto obtido no experimento 24.

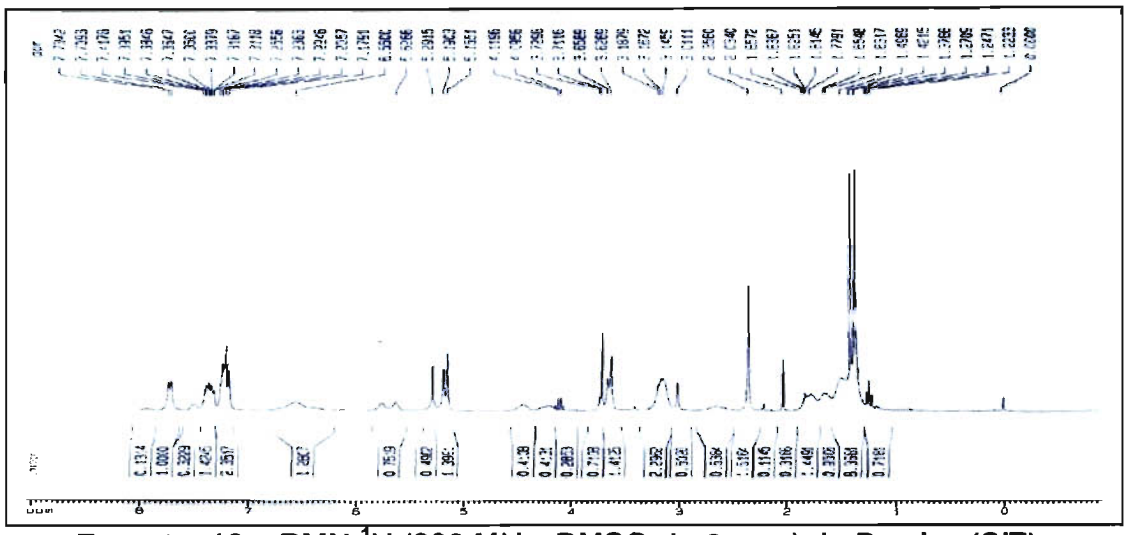
## *5.1.4 PREPARAÇÃO DO DIPEPTÍDIO Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe.HCl*

Esse experimento foi realizado como com o intuito de se obter o dipeptídio Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe, como intermediário de síntese de base de Mannich com o NF. Inicialmente, sintetizou-se o éster metílico do Boc-Arg(Tos)-OH, com desproteção da amina em $\alpha$ pela cisão do grupamento Boc. O produto obtido foi avaliado por RMN $^1H$, comprovando a formação do produto obtido pela observação da ausência de sinal referente aos hidrogênios do Boc, entre 0,8 e 1,1 ppm e também pelo sinal dos prótons da metoxila em 3,73 ppm (Espectro 18).

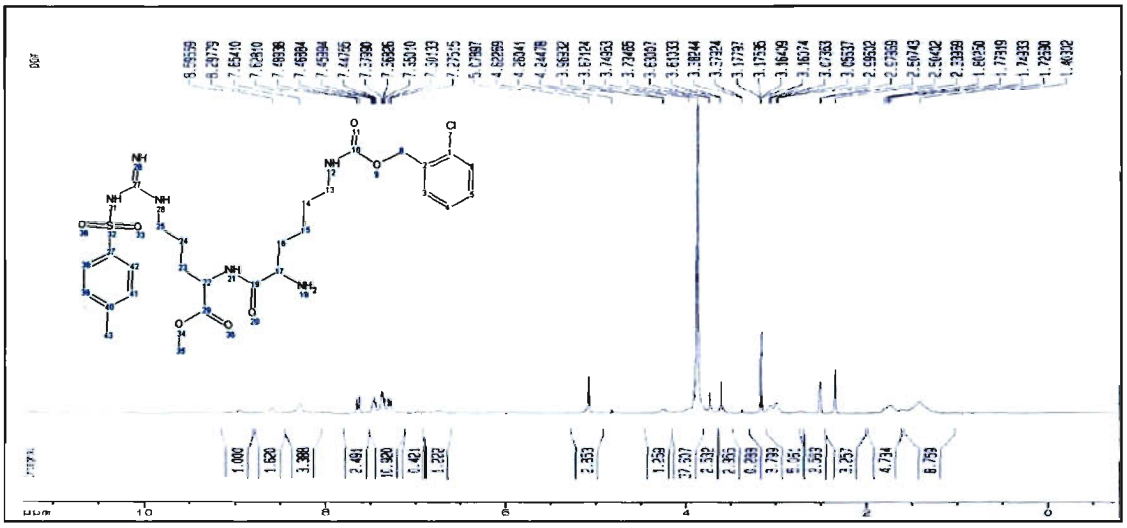
Procedeu-se, então, à reação de acoplamento com o éster obtido por meio de EDC/DMAP. Foi feita extração de DCM e acetato de etila do composto obtido, porém ambas as frações apresentaram o mesmo perfil tanto cromatográfico como por RMN $^{1}H$ e de $^{13}C$. É importante ressaltar que tanto os aminoácidos como o éster são insolúveis em solução aquosa. Sendo assim, o material obtido nas duas extrações foi juntado e realizou-se lavagem com solução saturada de $NaHCO_3$, retirando, então, o material de partida que não havia reagido. O espectro de RMN $^{1}H$ (Espectro 19) comprova a formação do Boc-Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe pelos ao duplo dubleto referente ao grupo protetor Tos em 7,6 e 7,3 ppm, sobrepostos aos sinais do grupo protetor Cl-Z, proveniente da Boc-Lys(ClZ)-OH, o sinal referente à metoxila em 3,17 ppm do éster Boc-Arg(Tos)-OMe e o sinal referente ao grupamento Boc em 1,22 ppm. Realizou-se, então, a desproteção do Boc da amina $\alpha$ do Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe. A análise por RMN $^{1}H$ (Espectro 20) mostra a desproteção do peptídeo pela ausência de sinal relativo ao grupamento Boc. O produto final da reação é o dipeptídio de lisina e argina protegido por éster metílico na carbonila, grupo tosila na amina, referente a amina $\varepsilon$ da Arg e por Cl-Z, na amina referente à amina $\varepsilon$ da lisina – Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe. As atribuições referentes aos hidrogênios do dipeptídio são apresentadas na Tabela VII.



Espectro 18 – RMN $^{1}H$ (300 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) do Arg(Tos)-OMe.



Espectro 19 – RMN $^1$H (300 MHz, DMSO-$d_6$, δ ppm) do Boc-Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe.



Espectro 20 – RMN $^1$H (300 MHz, DMSO-$d_6$, δ ppm) H do Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe.

**Tabela VII** – Atribuições de RMN $^1$H do Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe

| RMN $^1$H (DMSO-$d_6$, 300 MHz, δ= ppm) |
|---|
| 1,40-2,33 (m, 12H, $H_{16}$, $H_{15}$, $H_{14}$, $H_{23}$, $H_{24}$ $H_{25}$)*; 2,33 (s, 3H, $H_{43}$); 3,26-2,99 (m, 2H, $H_{26}$, $H_{31}$); 3,17 (s, 3H, $H_{35}$); 3,38 (s, 1H, $H_{18}$); 3,62 (s, 1H, $H_{17}$); 5,07 (s, 2H, $H_8$); 7,28 (d, J=7,8 Hz, 2H,$H_{41}$, $H_{39}$)*; 7,35-7,46 (m, 4H, $H_3$,$H_4$, $H_5$, $H_6$)*; 7,63 (d, J=7,8 Hz, 2H, $H_{42}$, $H_{38}$); 8,59 (s, 1H, $H_{21}$); 8,29 (s, 3H, $H_{12}$) |

*sinais sobrepostos

## *5.1.5 Síntese de Bases de Mannich*

Tentou-se, primeiramente, sintetizar bases de Mannich com os aminoácidos fenilalanina (Phe) e glicina (Gly). Sendo esses aminoácidos mais simples que os aminoácidos propostos no projeto inicial, estabeleceriam condições reacionais a serem empregadas com os aminoácidos Lys e Arg e peptídeo Lys-Arg. No entanto não foi possível estabelecer metodologia que fosse extrapolada para os outros aminoácidos.

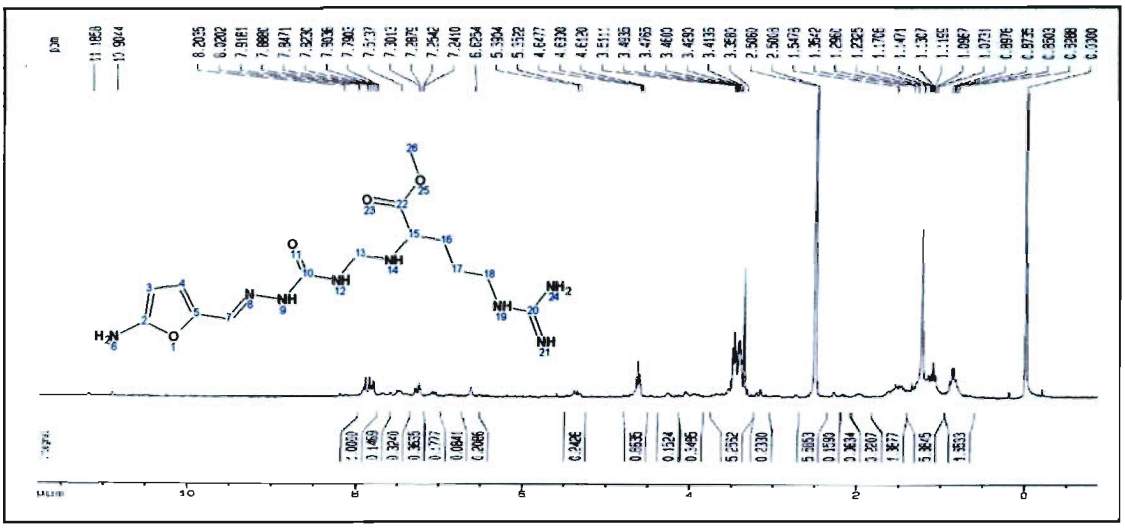
### 5.1.5.1 SÍNTESE DA BASE DE MANNICH NF-Arg-OMe

Em uma primeira tentativa reagiu-se o NFOH com o Arg-OMe (Experimento 27), com o objetivo de obter a respectiva base de Mannich, porém a reação não ocorreu, apresentando, por análise em CCD, manchas características apenas ao NFOH. Visto a dificuldade da reação entre o NFOH e aminoácidos, já observada anteriormente, partiu-se para a síntese de base de Mannich realizada *"in situ"*. No Experimento 28 optou-se por fazer a reação de Mannich pela rota que utiliza o meio ácido para a formação do derivado hidroximetilado. Acidificou-se o meio com solução de HCl a 10%, até pH 4 e 5, com o objetivo de facilitar a saída do OH do NFOH e o ataque posterior do grupo amínico do aminoácido. Observou-se, por

CCD, mistura de manchas relativas ao NF e NFOH no filtrado, além de banda larga, que se considerou tratar-se, provavelmente, do início da formação de um produto. O sólido amarelo resultante da extração foi avaliado por RMN $^1H$, observando-se presença de grande quantidade de NF e muitos sinais de menor intensidade, mal resolvidos, sem condições de atribuição.

O Experimento 29 foi realizado de acordo com a metodologia descrita por SRIDHAR e colaboradores (2001). Utilizaram-se quantidades equimolares de NF, ArgOMe, com excesso de formaldeído em meio de ácido acético. As análises por CCD mostraram mudanças no perfil a partir de 5 horas de reação. No entanto, a reação não foi interrompida, mantendo-a por 48 horas, para garantir a sua completude. O precipitado amarelo escuro e o filtrado amarelo claro obtidos foram avaliados por CCD. O precipitado mostrou perfil idêntico ao NF e o filtrado apresentou duas manchas: uma com $R_f$ igual ao NF e outra com $R_f$ superior, que seria, provavelmente, correspondente ao produto esperado. Partiu-se, então, para o isolamento do produto obtido. Primeiramente, tentou-se, sem sucesso, cristalização de éter. Esta não ocorreu mesmo após o material ficar 2 dias em repouso sob resfriamento em geladeira. Realizou-se, então, estudo para o estabelecimento de melhor condição de separação do produto obtido por meio de coluna cromatográfica de sílica-gel. Esse estudo mostrou que com sistema solvente MeOH:$CHCl_3$ (60:40) haveria boa separação entre o NF e o produto obtido. Efetuou-se, então, separação por coluna de sílica-gel 60 (70:230 MESH), utilizando-se como eluente MeOH:$CHCl_3$ (60:40). Com esse sistema, obteve-se produto amarelo, o qual foi avaliado por CCD, mostrando-se aparentemente puro. O produto foi evaporado e secado à pressão reduzida. Realizou-se, então, análise de RMN $^1H$ e de $^{13}C$. No Espectro 21 (RMN $^1H$) observa-se sinal em 4,62 ppm, e no Espectro 22 (RMN $^{13}C$) observa-se sinal em 54,63 pm, referentes à ponte metilênica, que caracteriza a formação da base de Mannich. As demais atribuições do espectro de RMN $^1H$ e de RMH $^{13}C$ estão relacionadas nas Tabela VIII e IX respectivamente. A formação do produto foi confirmada, também, por espectrometria de massas (Espectro 23), observando-se o íon molecular em 398 m/z. É importante salientar, ainda, que a fragmentação do espectro de

massas é de difícil compreensão devido à carbonização do material pelo aquecimento da amostra. O ponto de fusão encontrado para o produto obtido foi de 194,8 °C. Após repetir o experimento calculou-se o rendimento que foi de 31,4%. É importante salientar que apesar do pouco rendimento obtido, o composto foi sintetizado por metodologia diferente daquela proposta no projeto inicial. Por esta, se propôs a síntese através de arginina protegida com grupamento tosila na amina terminal. Essa metodologia alternativa foi empregada com base na maior disponibilidade do éster metílico da Arg, do que da Arg-Tos.

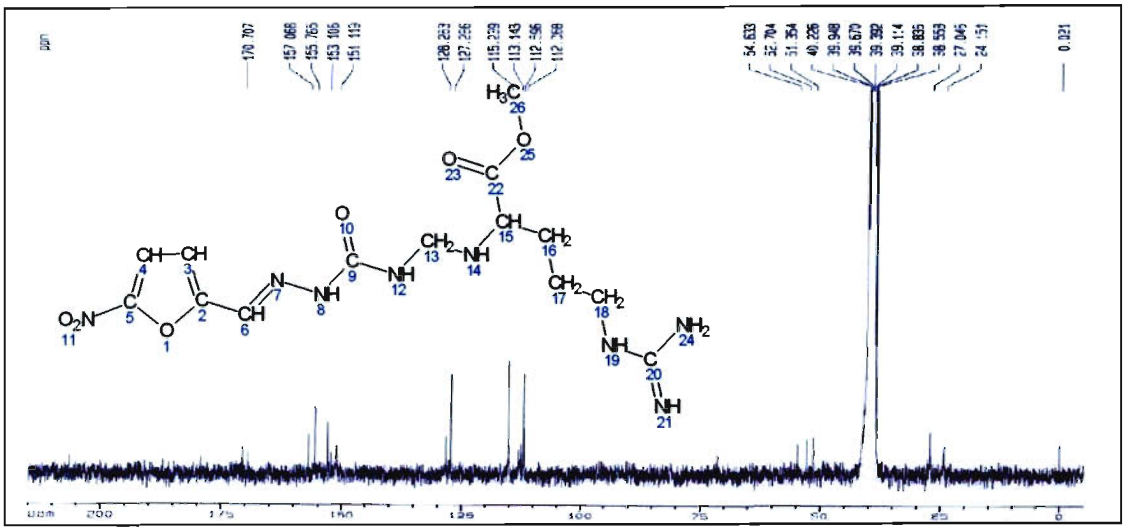


Espectro 21 - RMN $^1$H (300 MHz, DMSO-$d_6$, δ ppm) da NF-Arg-OMe.

**Tabela XI** – Atribuições de RMN $^1$H do NF-Arg-OMe

| RMN $^1$H (DMSO-$d_6$), 300 MHz, δ= ppm |
|---|
| 0,88 (q, J=6,45 Hz, 2H, $H_{18}$); 1,12 (m, 2H, $H_{16}$); 1,35 (m, 2H, $H_{17}$), 3,44 (m,2H, $H_{15}$)*+; 3,35 (s, 3H, $H_{26}$)*+; 4,62 (t, J=5,31 Hz, 2H, $H_{13}$); 6,62 (s, 1H, $H_{12}$); 7,25 (d, J=3,96 Hz, 1H, $H_3$)*; 7,51 (s, 1H, $H_8$)*; 7,79 (m, 1H, $H_6$)*; 7,81 (m, 1H, $H_4$)*; 10,90 (s, 1H, $H_{21}$); 11,18 (s, 1H, $H_{24}$) |

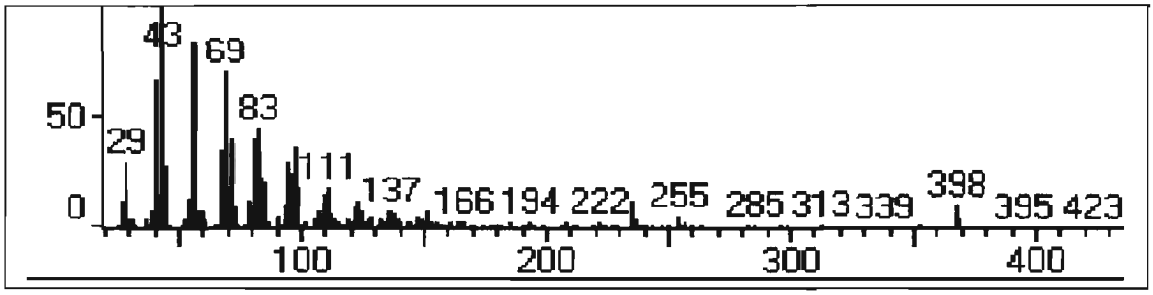
*sinais sobrepostos, +sobreposição com água



Espectro 22 - RMN $^{13}C$ (75 MHz, DMSO-$d_6$, δ ppm) do NF-Gly-OMe.

**Tabela IX** – Atribuições de RMN $^{13}C$ do NF-Arg-OMe

| **RMN $^{13}C$ (DMSO-$d_6$, 75 MHz, δ= ppm)** |
|---|
| 39,39 (DMSO-$d_6$); 24,15 ($C_{16}$); 26,04 ($C_{17}$); 51,35 ($C_{26}$); 52,70 ($C_{13}$); 54,63 ($C_{15}$) ; 112,06 ($C_3$); 115,23 ($C_4$); 127,28 ($C_6$); 151,19 ($C_5$); 153,10 ($C_2$); 155,78 ($C_{20}$); 157,06 ($C_9$); 170,70 ($C_{22}$) |



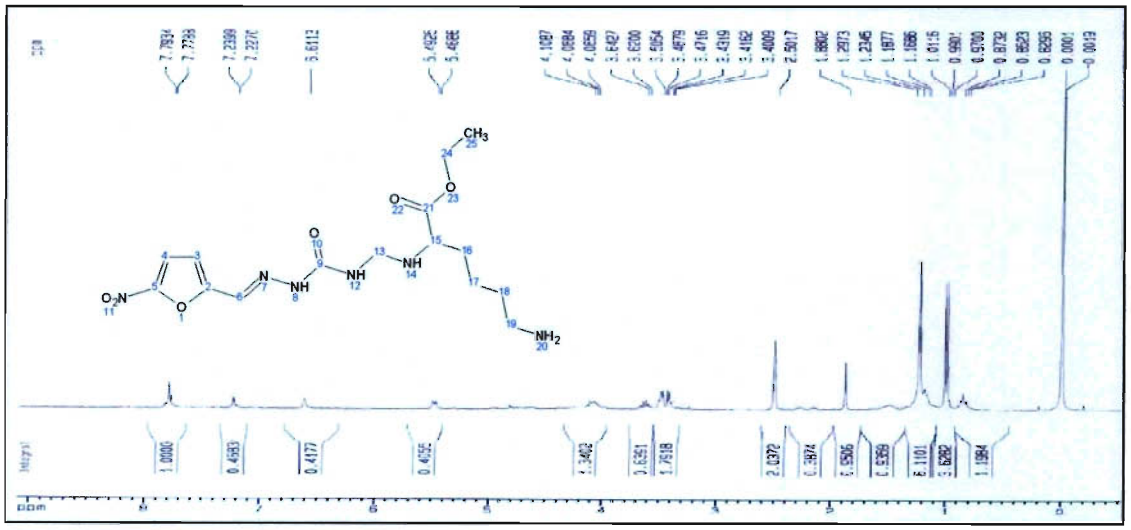

Espectro 23 - Espectro de massas do NF-Arg-OMe.

### 5.1.5.2 SÍNTESE DA BASE DE MANNICH NF-Lys-OEt

Como primeira tentativa reagiu-se o NFOH com o Lys-OEt (Experimento 30), porém, novamente a reação não ocorreu, comprovando a sua dificuldade e a baixa reatividade dos compostos. Realizou-se, então, experimento partindo-se do NF e do éster etílico da lisina. Esse experimento foi feito simultaneamente ao Experimento 28, nas mesmas condições, esperando em uma primeira etapa a formação do NFOH e em uma segunda, a formação da base de Mannich (Experimento 31). Analogamente ao observado no Experimento 28, mediante CCD observou-se, além de NF e NFOH, banda larga, provavelmente devido ao produto desejado. No entanto, após a extração, verificou-se a degradação do produto. Procedeu-se a outra tentativa, agora utilizando-se meio de ácido sulfúrico como catalisador (Experimento 32). Apesar da reação apresentar formação de produto diferente daquele de partida após 30 minutos de reação, não se conseguiu isolar o composto obtido, pois esse apresentou degradação após sucessivas tentativas de cristalização.

Empregando-se as mesmas condições que aquelas utilizadas no Experimento 29, efetuou-se o Experimento 33, segundo metodologia descrita em SRIDHAR *et al.* (2001) A análise cromatográfica permaneceu inalterada até 10 horas de reação, quando se verificaram os primeiros traços de formação de produto. A reação foi continuada até o perfil cromatográfico se tornar estável, entre 74 e 80 horas de reação. Ao final, observaram-se duas manchas, uma referente ao NF e outra com $R_f$, diverso, provavelmente relativa ao produto esperado. Filtrou-se o meio reacional à pressão reduzida, obtendo-se precipitado amarelo escuro, que mostrou $R_f$ igual ao NF, e um filtrado amarelo oleoso, apresentando duas manchas, como as descritas ao final da reação. O material foi evaporado e secado à pressão reduzida. Partiu-se, então, para o isolamento do produto por meio de cristalização de $MeOH/H_2O$. Obteve-se precipitado amarelo amorfo. Este, na avaliação por CCD, apresentou perfil idêntico ao anterior. Realizou-se, então, estudo para a tentativa de isolamento por coluna de sílica-gel. O sistema solvente mais promissor para o isolamento por coluna foi $CHCl_3$:MeOH:$CH_3COOH$ 85:10:3,

que propiciou separação razoável dos compostos. Por coluna cromatográfica, conseguiu-se separar pequena quantidade do produto aparentemente puro. Esse composto foi secado à pressão reduzida e avaliado por RMN $^{1}H$, confirmando-se a formação do produto desejado (Espectro 24). O tripleto a 4,08 ppm, correspondente à ponte metilênica entre o NF e o aminoácido, caracteriza a formação da base de Mannich. Ademais, podem-se verificar os sinais referentes aos outros hidrogênios da molécula, como o apresentado na Tabela X. O espectro de RMN $^{13}C$ foi realizado. Contudo, mesmo após 24 horas de acúmulo, os sinais não se apresentaram evidentes. O ponto de fusão do composto obtido foi de 171,6 °C. A reação foi repetida, apresentando rendimento de 16%. Este pode ser melhorado com a otimização da síntese. A metodologia empregada apresenta-se como alternativa para a síntese proposta no projeto inicial, que envolvia a utilização da lisina protegida pelo grupamento Boc na amina em ε. Essa metodologia permite diminuição no custo, visto que o preço deste tipo de aminoácido protegido é extremamente alto.




Espectro 24 - RMN $^{1}H$ (300 MHz, DMSO-$d_6$, δ ppm) da NF-Lys-OEt

**Tabela X** – Atribuições de RMN $^1$H do NF-Lys-OEt

| RMN $^1$H (DMSO-$d_6$), 300 MHz, δ= ppm |
|---|
| 0,87 (t, J=5,9, 3H, $H_{25}$); 1,01-0,99 (m, 2H, $H_{18}$); 1,29-1,16 (m, 4H, $H_{17}$, $H_{16}$)*; 1,88 (m, 2H, $H_{19}$); 3,50-3,40 (m, 2H, $H_6$, $H_{15}$)*+; 3,63 (q, J=5,9, 2H, $H_{24}$); 4,08 (m, 2H, $H_{13}$); 5,75 (m, 2H, $H_{12}$, $H_{14}$); 6,61 (s, 1H, $H_8$); 7,23 (d, J=3,92 Hz, 1H, $H_3$); 7, 78 (d, J=3,92 Hz, 2H, $H_4$; 1H, $H_6$)* |

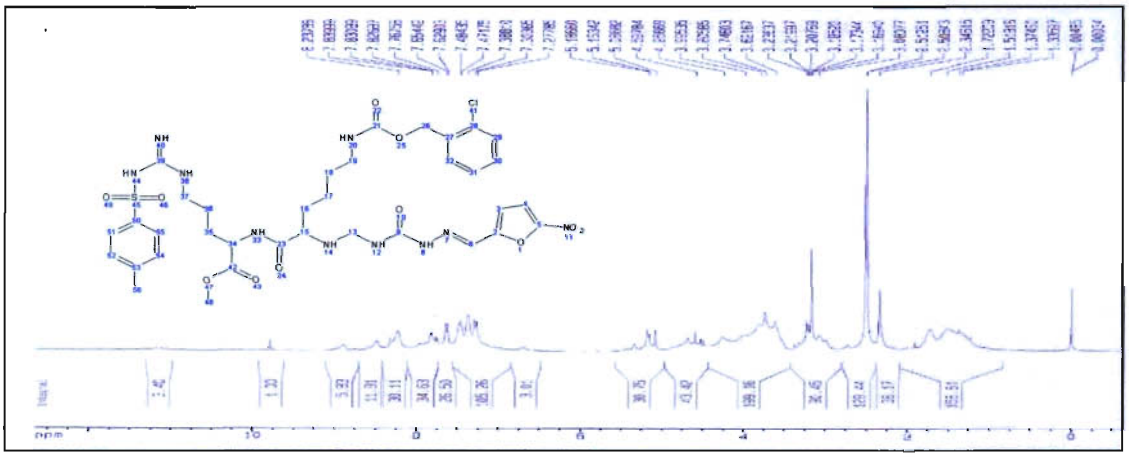
*sinais sobrepostos, +sobreposição com água

Contudo, o uso de aminoácidos protegidos pode levar à formação da base de Mannich com menor tempo e melhor rendimento, visto que com uma única amina livre não há competição entre os grupos reativos da molécula, possibilitando a maior facilidade de reação.

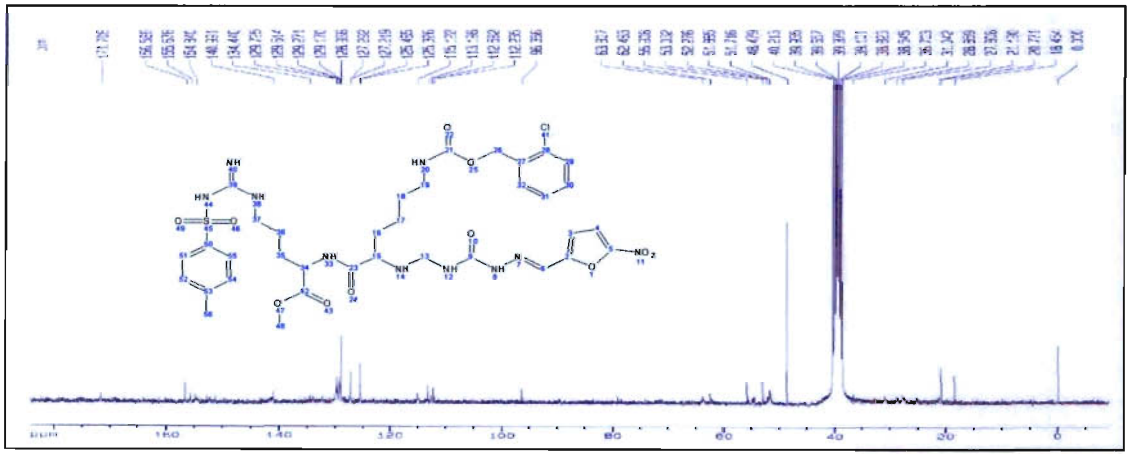
### 5.1.5.3 SÍNTESE DA BASE DE MANNICH NF-Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe

A síntese para a obtenção da base de Mannich NF-Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe foi realizada conforme a metodologia empregada nos Experimentos 29 e 33, nos quais se observou a formação dos produtos desejados. Partindo-se de NF e do dipeptídio previamente sintetizado como descrito no Experimento 21, realizou-se a síntese de Mannich. O tempo excessivo de reação foi, provavelmente, devido à baixa reatividade dos reagentes. Os primeiros sinais de formação do produto foram visualizados ao final de 4 dias de reação. Após uma semana de reação, interrompeu-se o experimento. Foi feita análise por CCD, que apresentou manchas de um produto além de outra referente ao dipeptídio. O meio foi evaporado à pressão reduzida com o intuito de isolar o composto obtido. Realizando-se nova análise por CCD, observou-se, além das manchas já mencionadas, a presença de NF. Foi efetuada, então, a ressuspensão do material resultante em pequena quantidade de metanol. Como a melhor forma encontrada, até o momento, para a separação dos compostos foi a cromatografia por coluna, esta foi utilizada visando encontrar o melhor sistema de separação. O sistema

solvente mais promissor para o isolamento por coluna foi $CHCl_3$:MeOH (60:40). Obteve-se composto oleoso, altamente higroscópico. Avaliado por RMN $^1H$ e de $^{13}C$ apresentou sinais em 4,25 ppm, como mostra o espectro de RMN $^1H$ (Espectro 25) e em 55,90 ppm, no espectro de RMN $^{13}C$ (Espectro 26) , referentes à ponte metilênica, que caracteriza a formação da base de Mannich. Os espectros não se apresentaram com boa resolução devido às características higroscópicas do produto e também à quantidade de sinais que se sobrepõem. Apesar da presença dos sinais referentes à formação do produto desejado, as análises realizadas, RMN $^1H$ e de $^{13}C$, não são conclusivas para a caracterização do mesmo, necessitando, assim, de estudos mais aprofundados.



Espectro 25 - RMN $^1H$ (300 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) do Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe.



Espectro 26 - RMN $^{13}C$ (75 MHz, DMSO-$d_6$, $\delta$ ppm) do Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe.

# VI. CONCLUSÕES PARCIAIS

6.1 Otimizou-se a síntese do hidroximetilnitrofural, chegando-se a método de obtenção por meio de adição de formaldeído em duas etapas, com rendimento de 61%, em 5 horas de reação.

6.2 A reação com paraformaldeído com solventes apróticos ou não-apróticos não foi bem-sucedida, observando-se a ocorrência de degradação do fármaco de partida.

6.3 Sintetizaram-se os ésteres metílico de arginina e etílico de lisina como forma de proteção do grupo carboxílico dos respectivos aminoácidos para reação posterior com o nitrofural.

6.4 A síntese do éster metílico da Boc-Lys-OH não foi bem sucedida devido ao grupo protetor não resistir às condições reacionais empregadas. Sintetizou-se, então, o éster metílico do Boc-Lys(Cl-Z)-OH, com desproteção simultânea da amina $\alpha$, pela cisão do grupamento Boc.

6.5 Sintetizou-se o dipeptídeo Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe para posterior síntese da base de Mannich proposta.

6.6 A melhor rota sintética para a preparação das bases de Mannich foi a que emprega quantidades equimolares de NF e do aminoácido protegido na forma de éster e excesso de formaldeído, em meio ácido.

6.7 Por permitir a obtenção dos produtos desejados, a utilização dos aminoácidos apenas protegidos na forma de ésteres metílico e etílico mostrou-se como alternativa ao emprego de aminoácidos protegidos com Boc e Tos.

6.8 Foram obtidas as bases de Mannich NF-Arg-OMe, Lys-OMe e NF-Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)-OMe.

# VII. PERSPECTIVAS

7.1 Desproteção das bases de Mannich obtidas com aminoácidos e com o dipeptídeo Lys-Arg.

7.2 Ensaios de liberação do NFOH e das respectivas bases de Mannich por eletroforese capilar.

7.3 Ensaios biológicos dos produtos obtidos (com a colaboração do Prof. Dr. Sérgio Albuquerque, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, RP).

7.4 Ensaios de mutagenicidade (com a colaboração da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara).

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGABAYAN, A. G.; GEVOGYAN.G. A.; MNDZHOYAN, O. L. Aminoacids as the amine component in Mannich reaction. *Russ. Chem. Rev.,* v.51, p. 387-96, 1982.

AJAY, L.; WALTERS, W. P.; MURCKO, M. A. Can we learn to distinguish between "drug-like" and "nondrug-like" molecules? *J. Med. Chem.,* v. 41, p. 3314-3324, 1998.

ANDRADE, Z.A.; BRENNER, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do Trypanosoma cruzi na doença de Chagas experimental. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.11, p.222-228, 1969.

AUGUSTO, O.; ALVES, M.J.M.; COLLI, W.; FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Primaquine can mediate hydroxyl radical generation by *Trypanosoma cruzi* extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.135, p.1029-1034, 1986.

AUGUSTO, O.; ALVES, M. J.M.; COLLI, W.; FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Megazol reductive metabolism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81, suppl, p. 158, 1986.

BERKELHAMMER, G.; ASATO, G. 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)1,3,4-thiadiazole: a new antimicrobial agent. *Science*, v.162, p.1146, 1968.

BIAVA, M.; FIORAVANTI, R.; PORRETA, G. C.; Study of the Mannich reation: *β*-amino-methylationof n-aryl and *N*-azaheteroaryl-substituited 2,5-dimethylpyrroles, compounds with potential biological activity. *Farmaco*, v. 50, n. 60, p. 431-8, 1991.

BODANSZKY, M.; BODANSZKY, A. *The Practice of peptide synthesis*. Cleveland: Springer-Verlag, Berlin, 1984. p.179.

BODOR, N.; FARAG, H.H.; BREWSTER, M.E. Site-specific, sustained release of drugs to the brain. *Science*, v.214, p.1370-1372, 1981.

BÖHM, H.-J. Ligand design. In: KUBINYI, H., Ed. *3D QSAR* in *Drug Design*. Theory, methods and applications. Leiden: ESCOM, 1993. p. 386-405.

BÖHM, H-J.; BOEHRINGER, M.; BUR, D.; GMUENDER, H.; HUBER, W.; KLAUS, W.; KOSTREWA, D.; KUEHNE, H.; LUEBBERS, T.; MEUNIER-KELLER, N.; MUELLER, F. Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. A promising alternative to random screening, *J. Med. Chem.*, v. 43, p.2664-2674, 2000.

BONAMETTI, A. M.; CASTELHO FILHO, A.; RAMOS, L. R.; BALDY, J. L.S.; MATSUO, T. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em candidatos a doador de sangue, *Rev.Saúde Pub.*, v. 32, p. 566-571, 1998.

BRENER, Z. A descoberta. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.84 (supl II), p.1-6, 1989.

BUNDGAARD, H. *Design of prodrugs*, Elsevier: Amsterdam, 1985. 360p.

BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs Fut.*, v.16, p.443-458, 1991.

BUNDGAARD, H.; JOHANSEN, M. Hydrolysis of N-(α-hydroxyalkyl) amide derivatives: implications for the design of N-acyloxylkyl-types prodrugs. *Int. J. Pharm.*,v.22, 45-56, 1984.

BUNDGAARD, H.; RASMUSSEN, G. J. Prodrug of Peptides. 11. Chemical and enzymatic hydrolysis kinetics of N-acyloxymethyl derivatives of a peptide-like bond, *Pharm. Res.*, v.8, 1238-1242, 1991.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 58, p. 79-110, 1989.

CANÇADO, J.P. Forma aguda da doença de Chagas no Brasil. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 26, p.285-288, 1980.

CANÇADO, J.P. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benzonidazol. In: BRENER, Z.; ANDRADE, A.A.; BARRAL-NETO, M., Eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 389-405.

CAZZULO, J.J.; CAZZULO FRANKE, M.C.I.; MARTINEZ, J.; FRANKE DE CAZZULO, B.M. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi. Biochim. Biophys. Acta*, v.1037, p.186-191, 1990a.

CAZZULO, J.J.; HELLMAN, V.; COUSO, R.; PARODI, A.J. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanossoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.38, p.41-48, 1990b.

CAZZULO, J.J.; STOKA, V.; TURK. V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi. Biol. Chem.*, v.378, p.1-10, 1997.

CHAGAS, J.R.; AUTHIE, E.; SERVEAU, C.; LALMANACH, G.; JULIANO, L.; GAUTHIER, F. A comparison of the enzymatic properties of the major cysteine proteinase from *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.88, p.85-94, 1997.

CHAN, C.; YIN, H.; GARFORTH, J.; MCKIE, J.H.; JAOUHAIN, R.A.; DOUGLAS, K.T.; FAIRLAMB, A.H.; CROFT, S.L. Inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal drugs. *Biochem. Soc. Trans.*, v.23, s.511, 1995.

CHAN, C.; YIN, H.; GARFORTH, J.; MCKIE, J.H.; JAOUHAIN, R.A.; DOUGLAS, K.T.; ROCK, P.J.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L.L; FAIRLAMB, A.H. Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. *J. Med. Chem.*, v.41, p.148-156, 1998.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, v. 59, p. 527-605, 1997.

CHUNG, M. C; FERREIRA, E. I. O processo da latenciação no planejamento de fármacos. *Quim. Nova*, v.22, p. 75-84, 1999.

CHUNG, M. C.; GONÇALVES, M. F.; COLLI, W.; FERREIRA, E. I.; MIRANDA, M. T. M. Synthesis and *in vitro* activity of dipeptide prodrugs of primaquine potentially antichagasic. *J. Pharm. Sci.,* v. 86, p. 1127-1131, 1997.

CHUNG, M. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. T.; GÜIDO, R.V.C.; VARANDA, E.A.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K.C.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and *in vitro* antichagasic activity of hydroxymethylnitrofurazone, a prodrug of nitrofurazone, *Bioorg. Med. Chem.,* v.11, p. 4779-4783, 2003.

CHUNG, M.C. *Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de NF e primaquina potencialmente antichagásicos*. São Paulo, 1996, 196p. [Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo]

CHUNG, M.C.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E.I. Potential antichagasic prodrugs: synthesis of Mannich base of dipeptide primaquine and nitrofurazone. *Abstracts of 211th American Chemical Society Meeting*, 1996. Abstract 187.

COLLI, W.; ALVES, M.T.M. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.94, p.37-49, 1999.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p.3-24, 2002.

CRENSHAW, C.A.; GLANGES, E.; STUART, B.H.; PIERCE, J. Nitrofurazone therapy in "middle burns": a review. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.*, v.19, p.487-492, 1976.

CRUCIANI, G.; CLEMENTI, S.; PASTOR, M. GOLPE-Guided Region Selection. *Persp. Drug Disc. Design*, v 12, p.71-86, 1998.

D'SILVA, C.; DAUNES, S. Structure-activity study on the *in vitro* Antiprotozoal activity of glutathione derivatives. *J. Med. Chem*, v. 43, p. 2072-2078, 2000.

DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. L. Effect of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell *in vitro*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.82, p.209-218, 1986.

DE CASTRO, S.L.; MEIRELLES, M.N.L. Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivative upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.85, p.95-99, 1990.

DECLERCK, P.J.; DE RANTER, C.J. *In vitro* reductive activation of nitroimidazoles. *Biochem. Pharmacol.*, v.35, p.59-61, 1986.

DECLERCK, P.J.; DE RANTER, C.J. Polarographic evidence for the interaction of reduced nitroimidazole derivatives with DNA bases. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, v.83, p.257-265, 1987.

DEL NERY, E; JULIANO, M. A.; LIMA, A. P.; SCHARFSTEIN, J.; JULIANO, L. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi. J. Biol. Chem.*, v.272, p.25713-25718, 1997.

DEPARTAMENT for Tropical Medine and Medicine and Infections Diseases of Munich University LMU [last op dadte 15/08/2001] disponivel na Internet http://www.fit-for-travel.de/en/Krankheiten/chagas.htm

DEZAN, C. M.; ALMEIDA, A. E.; SILVA, M.; NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E. I., CHUNG, M. C. Síntese do pró-fármaco polimérico succinilidroximetilNF dextrano potencialmente antichagásico. *Rev. Bras. Ciên.Farm.*, v.34, Supl.2, p.88. Res. FM53, 1998 [publicado também no V Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica. *Programa e Resumos*, p. 28, 1998].

DIAS, J. C. P. *Chagas' disease – American trypanosomiases: its impact on transfusion and clinical medicine.* In: http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter4.html, 1992.

DIAS, J.C.P. *Doença de Chagas*: clínica e terapêutica. Brasília, DF: Ministério da Saúde, SUCAM, 1990.

DIAS, J.C.P. *Doença de Chagas*: epidemiologia e prevenção. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.63, p.451-455, 1994.

DIAS, J.C.P.; BRENER, S. Chagas' disease and blood transfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.79, supl., p.139-147, 1984.

DIAS, J.C.P.; JATENE, A.D. Doença de Chagas no Brasil – Situação atual e perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.25, supl.3, p.6-8, 1992.

DIMMOCK, J. R.; ADVIKOLANU, K. M.; SCOTT, H. E.; DUFFY, M. J.; REID, R. S.; QUAIL, J. M.; JIA, Z.; HICKIE, R. A.; ALLEN, T. M.; RUTLEDGE, J. M. *et al.* Evaluation of citotoxicity of some Mannich bases of various aryl and arylidene ketones and their corresponding arylhydrazones. *J. Pharm. Sci.*, v. 81, p. 1147-52, 1992.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem. Biol. Interact.*, v.73, p.1-27, 1990.

DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *T. cruzi. Rev. Infect. Dis.*, v.6, p.233-238, 1984.

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

DODD, M.C.; STILLMAN, W.B. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. *J. Pharmacol. Exp.Ther.*, v.82, p.11-18, 1944.

EDWARDS, D.I. DNA binding and nicking agents. In: HANSCH, C., SAMMES,P. G., TAYLOR, J. B., Eds. Comprehensive Medicinal Chemistry. The rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds, v.2. Oxford: Pergamon Press, 1990. p.725-751.

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

FAIRLAMB, A.H. Future prospects for the chemotherapy of Chagas' disease. *Med. Buenos Aires*, v.59, p.179-187, 1999.

FAIRLAMB, A.H.; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B.T.; CERAMI, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)sperdmidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids, *Science*, v.227, p.1485-1487, 1985.

FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Identification of a novel thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biol. Parasitol.*, v.14, p.187-198, 1985.

FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanotione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 46, p. 695-729, 1992.

FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *T. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.81, p.755-759, 1987.

FILARDI, L.S.; BRENNER, Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 76, p.293-297, 1982.

FRIIS, G. J.; BAK, A.; LARSEN, B.D.; FORKJAER, S. Prodrugs of peptides obtained by derivatization of the C-terminal peptide bond in order to effect protetion against degradation by carboxpeptidases, *Int. J. Pharm.*, n.36, p.612-69, 1996.

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

FUJITA, T. The extrathermodynamic approach to drug desig, In: HANSCH, C., SAMMES, P. G., TAYLOR, J. B., Eds. *Comprehensive Medicinal Chemistry.* The rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds, v.4. Oxford: Pergamon Press, 1990. p.497–560.

FURNISS, B. S.; HANNAFORD, J.; SMITH, P.W.G.; TATCHELL, A.R., Eds. *Vogel's Texbook of pratical organic chemistry,* 5ª, Ed. New York: *Logman Scientific & Technical,* 1989. p. 1514.

GENG, B.; FLEMING, P. R.; UMLAUF, S.; LIN, A.; PALLAI, P. V. The synthesis and selective IL-2 inhibitorry activity of bis piperazine-phenol Mannich adducts, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* v.12, p. 775-778, 2002.

GEVORGYAN, G.A.; AGABABYAN A.G.; MNDZHOYAN, O.L. Achievements in beta-aminoketone chemistry, *Uspekhi Khimii,* v.6, p. 971-1013, 1984.

GEVORGYAN, G.A.; AGABABYAN, A.G.; MNDZHOYAN, O.L. Achievements in beta-aminoketone chemistry. *Uspekhi Khimii,* v.5, p. 837-874, 1985

GIRAULT, S.; BAILLET, S.; HORVATH, D.; LUCAS, V.; DAVIOUDCHARVET, E.; TARTAR, A.; SERGHERAERT, C. New potent inhibitors of trypanotione reductase from *Trypanosoma cruzi* in the 2-aminodiphenylsulfide series. *Eur.J. Med. Chem.*, v. 32, p. 39-52, 1997.

GOAD, L.J.; BERNENS, R.L.; MARR, J.J.; BEACH, D.H.; HOLZ, G.G.Jr. The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 32, p. 179-189, 1989.

GONÇALVES, M.T.; CHUNG, M.C.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E. I. Ação da associação da primaquina e nitrofurazona em células LLC-MK2 com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,* v. 27, supl.1, Res. 328, p. 164, 1994.

GORDON, E.M.; KERWIN Jr, J. F., Eds. *Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery.* New York: Wiley-Liss, 1998.

GRANT, I.; GOLD, J.W.H.; WITTNEE, M.; TANOWITZ, M.B. Transfusion-associated acute Chagas' disease acquired in United States. *Ann. Intern. Med.*, v.111, p.849-851, 1989.

GREENE, T. W.; WUNTS, P.G.M. *Protective groups in organic synthesis.* 3 ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999. 779 p.

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

GÜIDO, R. V. C.; FERREIRA, E. I.; NASSUTE, J. C.; VARANDA, E. A.; CHUNG, M. C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao NF (nitrofurazona), *Rev. Ciênc. Farm.*, v. 22, p. 319-333, 2001.

GÜIDO, R. V. C.; VARANDA, E. A.; FERREIRA, E. I.; CHUNG, M. C. Hydroxymethylnitrofurazone, a potential antichagasic prodrug with decreased mutagenic activity related to nitrofurazone. *International Congress of Pacific Basin Societies,* Honolulu, Hawaii, USA, dezembro de 2000. Book of Abstracts, Part 1.

GUISSANI, A.; HENRY, Y.; LOUGMANI, N.; HICKEL, B. Kinetics studies of four types of nitroheterocyclic radicals by pulse radiolysis: correlation of pharmacological properties to decay rates. *Free Rad. Biol. Med.*, v.8, p.173-189, 1990.

GUPTA, R.P.; NARAYANA, N.L. Synthesis of some Mannich bases of 1-cycloxylidine–N(1,2-dihydro-2-oxo-3H-indo-3-ylidene)thiosenicarbozones and their antibacterial activity. *Pharm. Acta Helv.*, n.72, 43-45, 1995.

HANSCH, C.; FUJITA, T. Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *J. Am. Chem. Soc.,* v.86, p.1616-1626, 1964.

HARTH, G.; ANDREWS, N.; MILLS, A.A.; ENGEL, J.C.; SMITH, R.; McKERROW, J.H. Peptide-fluormethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol.,* v.58, p.7-24,1993.

HENDERSON, G.B.; MURGOLO, N.J.; KURIYAN, J.; OSAPAYU, K.; KOMINOS, D.; BERRY, A.; SCRUTTON, N.S.; HINCHLIFFE, N.W.; PERHAM, R.N.; CERAMI, A. Engineering the substrate specificity of glutathione reductase toward that trypanothione reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.88, p.8769-8773, 1991.

HENDERSON, G.B.; ULRICH, P.; FAIRLAMB, A.H.; ROSENBERG, I.; PEREIRA, M., SELA, M.; CERAMI, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione dissulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, v.85, p.5374-8, 1988.

INCI GUL, H.; VESPSALAINEN, J.; GUL, M.; ERCIYAS, E.; HANNINEM, O. Cytotoxic activities of mono bis-Mannich bases derived from acetophenone agains Renca and Jurkat cells. *Pharm. Acta Helv.*, n.74, p.393-398, 2000.

JARPA, A. *Contribuición al estudio de la enfermedad de Chagas. X. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas experimental.* Tesis, Universidad de Chile, 1950. *Apud*: RUBIO, M.F.; PIZZI, T. Acción de la primaquina, pentaquina y pentaquina-quinina, sobre formas sanguíneas virulentas de *Trypanosoma cruzi. Bol. Chil. Parasitol.*, v.9, p.75-9, 1954.

JOCKERS-SCHERUBL, M.C.; SCHIRMER, R. H.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Trypanotione reductase from *T. cruzi*; catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur. J. Biochem.*, v.180, p.267-272, 1989.

JULIANO, L. Química de peptídios. Uma breve revisão dos processos de síntese, *Quimica Nova,* v.13, p. 176-190, 1990.

KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceutical and sources for lead structures. In: WERMUTH, C.G., ed. *The practice of medicinal chemistry,* San Diego: Academic Press, 1996. p.101-116.

KLEBE, G. Structural alignment of molecules. IN: KUBINYI, H. , Ed. *3D QSAR* in *drug design.* Theory, methods and applications, *Leiden:* ESCOM, 1993. p. 173-199.

KLEBE, G.; ABRAHAM, U. Comparative molecular similarity index analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *J. Comput. Aided. Mol. Des.,* v.13, p.1-10, 1999.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico Guanabara*, Ed.2003/2004, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*, 2 ed, New York: Wiley-Interscience, 1988. p.579-670.

KUBINYI, H.. Similarity and dissimilarity: A medicinal chemist's view. *Persp. Drug Des. Disc.,* v. 9, p.225-252, 1998a.

KUBINYI, H. Combinatorial and computational approaches in structure-based drug design. *Curr. Opin. Drug Design Discov.,* v.1, p.16-27, 1998b.

KUBINYI, H. Structure-based design of enzyme inhibitors and receptor ligands. *Curr. Opin. Drug Des. Discov.,* v.1, p.4-15, 1998c.

KUBINYI, H.; HAMPRECHT, F.A.; MIETZNER, T. Three-dimensional quantitive similarity-activity relationships (3D-QSiAR) from SEAL similarity matrices, *J. Med Chem.*, v.41, p. 2553-2564, 1998.

KUBINYI, H. *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches.* In: MANNHOLD, R., KROSGAARD-LARSEN, P., TIMMERMAN, H., Eds. *Methods and principles in Medicinal Chemistry*, v.1, Weinheim: VCH, 1993. p. 240.

KUBINYI, H. Strategies and recent technologies in drug discovery. *Pharmazie*, v.50, p.647-662, 1995.

KUBINYI, H., Ed. *3D QSAR* in *drug design.* Theory, methods and applications. *ESCOM*: Leiden, 1993. 759p.

KUBINYI, H. The Quantitative Analysis of Structure-Activity Relationships, In: WOLFF, M.E., Ed. *Burger's Medicinal Chemistry,* 5. ed, v. 1, New York: Wiley, 1995. p 497-571.

KUDRIN, A.N.; VOROB'EV, V.G.; Aminoketony (Aminoketones). Moscou: Izd.Medetisine, 1970. P. Apud: AGABAYAN, A. G.; GEVOGYAN.G. A.; MNDZHOYAN, O.L. Aminoacidds as the amine component in Mannich reaction. *Russ. Chem. Rev.*, v.51, p. 387-96, 1982.

LAGES-SILVA, E.; FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.85, p.401-405, 1990.

LA-SCALEA, M. A.; MAN CHIN, C.; FERREIRA, E. I. Geração eletroquímica do nitro radical aniônico a partir do NF utilizando-se eletrodo de carbono vítreo. 10° Encontro Nacional de Química Analítica, Química Analítica e qualidade das águas, Santa Maria, RS, 1999. *Livro de Resumos*, Res. EL-4.

LA-SCALEA, M.A. Comportamento voltamétrico e mecanismo de ação biológica de nitroimidazóis. *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, v.34, p.59-75, 1998.

LEWINSOHN, R. Carlos Chagas and the discovery of Chagas' disease (American Trypanosomiasis). *J. Roy. Soc. Med.*, v.74, p.451-455, 1981.

LLOYD-WLLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, London: *CRC Press*, 1997. 278.

LOPEZ, J.A.; CARVALHO, T.U.; DE SOUZA, W.; FLOHE, L.; GUERRERO, S.A.; MONTEMARTINI, M.; KALISZ, H.M.; NOGOCEKE, E.; SINGH, M.; ALVES, M.J.M.; COLLI, W. Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi* . *Free Rad. Biol. Med.,* v.28, p.767-772, 2000.

MASON,T. J. *Sonochemistry.* The uses of ultrasound in chemistry. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1990. 137p.

McCABE, R.E. Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. *J. Infect. Dis.*, v. 158, p.1408-1409, 1988.

McGRATH, M.E.; EAKIN, AE.; ENGEL, JC.; McKERROW, J.H.; CRAIK, C.S.; FLETTERICK, R.J. The crystal struture of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *J. Mol. Biol.,* v.247, p.251-259, 1995.

McGRATH, M.E.; EAKIN, A.E.; ENGEL, J.C.; McKERROW, J.H.; CRAIK, C.S.; FLETTERICK, R.J.. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chaga's disease. *J. Mol. Biol.,* v.247, p.251-9, 1995.

McKERROW, J.H.; Mc GRATH, M.E.; ENGEL, J.C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. *Parasitol. Today,* v. 11, p.272-82, 1995.

MEHLOTRA, R.K. Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. *Crit. Rev. Microbiol.*, v.22, p. 295-314, 1996.

MEIRELLES, M.N.L.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S.G.; COSTA, E.M.; MURTA, A.C.; SCHARFSTEIN, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.52, p. 175-84, 1992.

MELTON, R.G.; KNOX, R.J.; CONNORS, T.A. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Drugs Fut.*, Auckland, v. 21, p. 167-181, 1996.

MEYER, P. Discovering new drugs. In: WERMUTH, C.G., Ed. *The practice of Medicinal Chemistry,* London: Academic Press, 1996. p. 11-24.

MORENO, S.N.; MASON, R.P.; MUNIZ, R.P.A.; CRUZ, F.S.; DOCAMPO, R. Generation of free radicals from metronidazole and other nitroimidazoles by *Tritrichomonas foetus. J. Biol. Chem.*, v.258, p.4051-4054, 1983.

NARVÁEZ, A. J. R. *Bases de mannich potencialmente quimioterápicos.* São Paulo, 1983. 122p. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

NICKERSON P.; ORR, P.; SCHROEDER, M.C.; SEKLA, L.; JOHNSON, J. Transfusion associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Ann. Intern. Med.*, v.111, p.851-853, 1981.

NUDELMAN, A.; BECHOR, Y.; FALB, E.; FISHER, B.; WEXLER, B.A.; NUDELMAN, A. Acetyl chloride-metanol as a convenient reagent for: A) Quantitative formation of amine hydrochloride. B) Caboxylate ester formations. C) Mild removal of N-t-Boc-Protecting group. *Synth. Commun.*, v.28, p. 471-474, 1998.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofuran compounds, *J. Parasitol.*, n.38, p. 30-40, 1952.

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

PAGLIARA, A.; REIST, M.; GEINOZ, S.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Evaluation and prediction of drug permeation. *J. Pharm. Pharmacol.,* v.51, p.1339-1357, 1999.

PANDEYA, S.N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DE CLERCQ, F. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV evaluation of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with triazoles. *Arznein.-Forsch./Drug* Res., v.50, p. 55-59, 2000.

PANDEYA, S.N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DE CLERCQ, F. Synthesis, antimicrobial actives of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine, *Farmaco*, v. 54, p.624-628, 1999a.

PANDEYA, S. N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DE CLERCQ, F. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV evaluation of Schiff and Mannich bases of isatin and derivatives with 3-amino-2-methylmercapto quinazolon-4(3h)-one. *Pharm. Acta Helv.,* v.74, p.11-17, 1999b.

PEREIRA DA SILVA, L.H.; KIRCHNER, J.A. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection in tissue culture. A comparative study on the action of primaquine, carbidumsulphate and the aminonucleoside of stylomycin. *Rev. Inst .Med. Trop. S. Paulo*, v.4, p.16-28, 1962.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. *Parasitologia Médica*, 11ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

POLLI, M.C. *Antichagásicos potenciais:* Síntese de pró-fármacos de megazol e primaquina, 2003, 157p. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

PORSZASZ, J.; MATKOVICS, B.; FOLDEAK, S. Synthese N-substituierter, auf das zentralnervensystem wirkender tertiarer amine. *Ang. Chem.-Int. Ed.* v.72, p. 635-635, 1960. Apud: AGABAYAN, A. G., GEVOGYAN.G. A., MNDZHOYAN,O. L. Aminoacids as the amine component in Mannich reaction. *Russ. Chem. Res.*, v.51, p. 387-96, 1982.

PROFFT, E. Die falikaine, ihre chemmie, pharmacologie, sowie anwendungder der medizin. Berlin: Verlag Tec., 1954. Apud: AGABAYAN, A. G., GEVOGYAN.G. A., MNDZHOYAN,O. L. Aminoacids as the amine component in Mannich reaction. *Russ. Chem. Res.*, v.51, p. 387-96, 1982.

PROKAI, L.; PROKAI-TATRAI, L.; BODOR, N. Targeting drugs to the brain by redox Chemical Delivery Systems. *Med. Res. Rev.*, v.20, p.367-416, 2000.

RONDEAU, J.-M.; SCHREUDER, H. The use of X-ray structures of receptors and enzymes in drug discovery. In: WERMUTH, C.G., Ed. *The practice of Medicinal Chemistry,* London: Academic Press, 1996. p. 485-522.

ROSS W.J. Chemotherapy of trypanosomiasis and other protozoan diseases. In: WOLFF, M. E., ed. *Burger's medicinal chemistry*, 4th ed, v.2, New York: Wiley, 1980. p.440-479.

ROZENSKI, J.; DE RANTER, C.J.; VERPLANKEN, H. Quantitative structure-activity relationships for antimicrobial nitroheterocyclic drugs. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, v.14, p.134-141, 1995.

RUBIO, M.; PIZZI, T. Acción de la primaquina, pentaquina y pentaquina-quinina, sobre formas sanguíneas virulentas de *Trypanosoma cruzi. Boll.Chil.Parasitol.*, v.9, p.75-79, 1954.

SCHACHT, E. H.; VANSTEENKISTE, S.; SEYMOUR, L. Macromolecular carriers for drug targeting. In: WERMUTH, C. G., Ed. *The practice of Medicinal Chemistry*, London: Academic, 1996. p.717-736.

SCHARFSTEIN, J.; SCHECHTER, M.; SENNA, M.; PERALTA, J.M.; MENDONÇA-PREVIATO, L., MILES, M.A. *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (Gp57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol.*, v.137, p.1336-1341, 1986.

SCHMUÑIS, G.A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, A.A.; BARRAL-NETO, M., Eds. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 1-15.

SERVEAU, C.; LALMANACH, G.; JULIANO, M. A.; SCHARFSTEIN, J.; JULIANO, L.; GAUTHIER, F. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrate s and inhibitors. *Biochem. J.*, v. 313, p.951-956, 1996.

SHUKER, S.B.; HAJDUK, P.J.; MEADOWS, R.P.; FESIK, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science,* v.274, p.1531-1534, 1996.

SILVA, J.L. A doença de Chagas no Brasil. Índices de sua ocorrência e distribuição até 1909. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v.27, p.219-223, 1985.

SINGH, G.; SHARMA, P.D. Mutual prodrugs – a recent trend in prodrug design. *Indian J. Pharm. Sci.*, v.56, p.69-79, 1996.

SOUZA, D.H.F; GARRATT, R.C; ARAUJO, A.P.U.; GUIMARÃES, B.G.; JESUS, W.D.P.; MICHELS, P.A.M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. *Febs Lett.*, v. 424, p.131-135, 1998.

SRIDHAR, S.K.; PANDEYA, S.N.; DE CLERCQ, E.; Synthesis and anti-HIV activity of some isatin derivatives. *Boll. Chim. Farm.*, v.140, p. 302-305, 2001.

STOKA, V.; McKERROW, J.H.; CAZZULO, J.J.; TURK, V. Substrate inhibition of cruzipain is not affected by the C-terminal domain. *Febs Lett.*, v.429, p.129-133, 1998.

SZAJNMAN, S.H.; YAN, W.; BAILEY, B.N.; DOCAMPO, R.; ELHALEM, E.; RODRIGUEZ, J. B. Design and syntesis of aryloxythyl thiocyanate derivates as potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation. *J. Med. Chem.,* v.43, p. 1826-1840, 2000.

TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v.18, p.207-231, 1995.

TAKAKURA, Y.; MAHATO, R.I.; NISHIKAWA, M.; HASHIDA, M. Control of pharmacokinetic profiles of drug-macromolecule conjugates. *Adv. Drug. Del. Rev.*, v.19, p. 377-399, 1996.

TESTA, B.; CALDWELL, J. Prodrugs revisited: the "ad hoc" approach as a complement to ligand design. *Med. Res. Rev.,* v.16, p.233-241, 1996.

TOCHER, J.H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *Gen. Pharmacol.*, v.28, p.485-487, 1997.

TRACY, J.W.; WEBSTER JR, L.T. Chemotherapy of parasitic infections. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, G.A., Eds. *Goodman & Gilman's.* The pharmacological bases of therapeutics, 9.ed. New York: McGraw Hill, 1996. p. 955-1007.

TRAMONTINI, M.; ANGIOLINI, L. Further advances in the chemistry of Mannich bases. *Tetrahedron,* v.6, p.1791-1837, 1990.

TSUHAKO, M.H.; ALVES, M.J.M.; COLLI, W.; BRENER, Z.E.; AUGUSTO, O. Restricted bioreductive metabolism of nitroimidazole-thiadiazol derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Biochem. Pharmacol.*, v.38, p.4491–4496, 1989.

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A.; LAZARDI, K.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY, J.F. Cure of short-and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science.*, v. 273, p. 969-971, 1996.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversis and advances, *Trends of Pasitology,* v.19, n.11, p.495-501, 2003.

URBINA, J.A.; VIVAS, J.; VISBAL, G.; CONTRERAS, L.M. Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by $\Delta^{24(25)}$–sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with Ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.,* v. 73, p. 199-210, 1995.

VINHAES, M.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil, *Cad. Saúde Pub.*, v. 16, sup., 2, p. 7-12, 2000.

VIODÉ, C.; ALBUQUERQUE, C. N.; CHAUVIÈRE, G.; HOUÉE-LÉVIN, C.; PÉRIE, J. Comparative study by pulse radiolysis of the radical anion derived from compounds used in Chagas' disease therapy. *New J. Chem.*, v.21, 1331-1338, 1997.

VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R.L., CHAUVÈRE, G., BAKALARA, N., PÉRIÉ, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles; *Biochem. Pharmacol.*, v.57, p.549-557, 1999.

WALSH, C.; BRADLEY, M.; NADEAU, K. Molecular studies on trypanothione reductase, a target for antiparasitic drugs. *Tibs*, v.16 p. 305-309, 1991.

WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. Chagas disease (American tripanosomiasis): its impact on transfusion and and clinical medicine. ISTB – SBHH (Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia), 1992.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: JOLLE, G., WOOLDRIGE, K.R.M., Eds. *Drug Design*: fact or fantasy? London: Academic Press, 1984. p. 47-72.

WERMUTH, C.G., Ed. *The practice of Medicinal Chemistry,* London: Academic Press, 1996a.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors II. Bioprecursors prodrugs. In: WERMUTH, C.G., Ed. *The practice of Medicinal Chemistry,* London: Academic Press, 1996b. p. 697-716.

WERMUTH, C.G.; GAIGNAULT, J.C.; MARCHANDEAU, C. Designing prodrugs and bioprecursors I. Carrier prodrugs. In: WERMUTH, C.G. ed. *The practice of Medicinal Chemistry*. London: Academic Press, 1996. p. 671-696.

WHO in: http://www.who.mt/ctd/html/chagas/life_cycle.html, 2003 [Acesso em 04/02/04].

WHO in: http://www.who.mt/ctd/html/chagdts/html, 2001 [Acesso em 04/02/04].

ZAHOOR, A.; LAFLEUR, M.V.M.; KNIGHT, R.C.; LOMEN, H.; EDWARDS, D.I. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. *Biochem. Pharmacol.*, v.36, p.3299-3304, 1987.

ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*-interactions with host cells. *Curr. Top. Microbiol.*, v.117, p.129-152, 1985.