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

Antichagásicos potenciais: planejamento e estudo da
síntese de bioisósteros imidazólicos e triazólicos do
hidroximetilnitrofural

Hamilton Marcel Bigatão

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2010

Hamilton Marcel Bigatão

Antichagásicos potenciais: planejamento e estudo da
síntese de bioisósteros imidazólicos e triazólicos do
hidroximetilnitrofural

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Tit. Elizabeth Igne Ferreira
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais Maria Conceição Saravalli e João Bigatão Neto,
meu irmão Amilcar, minha avó Rosária e meu avô
Paulo Saravalli que faleceu com doença de Chagas,
não permitindo que o conhecesse.

Agradecimentos

À minha orientadora, professora titular Elizabeth Igne Ferreira, verdadeira “mãe científica”, que além de me defender e puxar a orelha sempre que necessário, é meu grande exemplo de profissional.

Aos meus pais, Maria Conceição Saravalli e João Bigatão Neto, pelo amor e educação dada que me permitiu chegar até este estágio.

Ao meu irmão, Dr. Amilcar Marcelo Bigatão, modelo de dedicação profissional e inteligência.

Ao amigo e professor doutor Gustavo Trossini, exemplo de que a ciência é feita através de parcerias e trabalhos conjuntos de grupos distintos.

À professora doutora Carlota de Oliveira Rangel-Yagui pelos ensinamentos e excelentes aulas durante o estágio do PAE.

Ao Dr. Márcio Henrique Zaim pela paciência, ajuda e formação na parte de síntese orgânica.

Ao professor doutor Diogo Seibert Lüdtke, pelos conselhos na parte de síntese orgânica e discussões sobre o campeonato brasileiro de futebol.

Ao professor doutor Adriano Defini Andricopulo por ser um exemplo de professor e pesquisador, além dos incentivos nos encontros em congressos e simpósios.

À Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto e ao aluno de doutorado Euzébio Barbosa pelo auxílio na parte de química computacional.

Ao Prof. Dr. Ronald Ranvaud por ter sido meu primeiro orientador de iniciação científica e ter me incentivado à vida de pesquisador.

Aos técnicos de laboratório Charles e Kátia pela ajuda de fundamental importância nos materiais de laboratório.

Ao companheiro de laboratório e amigo Ricardo Serafim pelas discussões científicas no laboratório ao som do bom rock n’ roll da rádio Kiss FM.

Aos companheiros de laboratório e pós-graduação: Profa. Dra. Daniela Rando, Profa. Dra. Carolina Horta, Fredson, Jeanine, Vanessa, Kely, Bárbara, Soraya, Patrícia, Andressa, Sun, Plínio, Croffi, Leonardo, Janaína, Juliana, Érica, Giancarlo, Jesus, Fernando, Mônica, Ana Dionéia, Hugo Braga, Adriele, Marcela e Camila, pela amizade, ensinamentos, e por dividir os momentos bons e os não tão felizes da vida de pesquisa.

À minha avó Rosária e todos os demais familiares, pelo apoio e pela torcida, mesmo que de uma distância física não tão próxima.

Aos meus avós Mafalda e Alexandre Bigatão (*in memoriam*) pelo carinho que recebi sempre que fui até Mirassol-SP.

Aos amigos que estudaram comigo durante a graduação e que até hoje me encontram para relembrar os grandes momentos de nossas vidas.

Aos companheiros e companheiras de Farmácia-USP, que defenderam comigo as cores bordô e branco nos jogos de basquete e rugby em edições de interusp e demais competições.

Ao Dr. João Paulo Fabi e ao amigo Fernando Diniz por tornarem a hora do almoço o momento mais divertido do dia.

Aos amigos da diretoria, Alberto Chamlian Filho, Bruno Polloni e Guilherme Chammas pela presença nos intermináveis churrascos “indoor”.

Aos amigos Prof. Dr. Gabriel Anhê, Dr. Alvaro Yogi, Dr. José Edgar Carvalho e João Henrique Perrella pela amizade desde os primeiros meses de Universidade de São Paulo.

Ao amigo Guilherme Figueiredo, sua mulher, Profa. Dra. Renata Gorjão e sua maravilhosa filha Júlia, meus verdadeiros “irmãos sem ser de sangue”.

Aos amigos Márcio (Menudo), Édson, Alacir, Tiago (Gomo), Antônio (Tatá), Heitor e Vogt pelos sábados à noite recheados de muito pôquer, e, acima de tudo, risadas.

Aos amigos Mário Pin, Tiago Pariz e Renato Santiago pelas conversas regadas a bacon e punk rock.

Aos amigos Lucas Pinto (Fusca) e Raphael Pareschi pela inesquecível viagem no feriado de ano novo de 2010.

Ao auxílio financeiro providenciado pelas agências CAPES e CNPQ.

SUMÁRIO

1. Introdução	7
1.1 Doença de Chagas	7
1.1.1 Descrição	7
1.1.2 Transmissão	8
1.1.3 Sintomatologia e diagnóstico	9
1.1.4 Ciclo biológico do parasita	10
1.1.5 Prevenção	11
1.2 Tratamento	12
1.2.1 Tratamento atual – quimioterapia	12
1.2.2 Compostos ou fármacos em experimentação	13
1.2.2.1 <u>Inibidores da síntese de esteróis</u>	13
1.2.2.2 <u>Inibidores da cisteíno-protease</u>	16
1.2.2.3 <u>Nitroderivados/ Inibidores de tripanotiona redutase</u>	17
1.2.2.4 <u>Compostos com outros mecanismos</u>	18
1.3 Modificação molecular no planejamento racional de novos fármacos	19
1.3.1 Bioisosterismo	20
1.4 Modelagem molecular	21
1.5 “Docking”	22
1.6 Dinâmica Molecular	23
2. Objetivos e justificativa	25
3. Materiais e métodos	27
3.1 Materiais	27
3.1.1 Reagentes e solventes	27
3.1.2 Equipamentos	28
3.1.3 Softwares para Modelagem Molecular	29
3.2 Métodos	30
3.2.1 Síntese	30
3.2.1.1 <u>Derivados nitromidazólicos</u>	30
3.2.1.1.1 Primeira rota proposta	30
3.2.1.1.2 Segunda rota proposta	37
3.2.1.1.3 Terceira rota proposta	38
3.2.1.2 <u>Derivados nitrotriazólicos</u>	39
3.2.1.2.1 Primeira rota proposta	40
3.2.1.2.1 Segunda rota proposta	43

3.2.1.2 <u>Derivados nitrobenzênicos e imidazólicos do NFOH</u>	44
3.2.2 <i>Análise</i>	46
3.2.2.1 <u>Faixa de fusão</u>	46
3.2.2.2 <u>Análise espectrométrica</u>	46
3.2.2.3 <u>Espectrometria de massas</u>	47
3.2.2.4 <u>Análise cromatográfica por CLAE</u>	47
3.2.2.5 <u>Microanálise</u>	47
3.2.3 <i>Modelagem molecular</i>	47
3.2.4 <i>“Docking” com dinâmica molecular</i>	49
4. Resultados e discussão	53
4.1 Síntese e análise dos protótipos	53
4.1.1 <i>Derivados nitroimidazólicos</i>	53
4.1.1.1 <u>Primeira rota sintética</u>	53
4.1.1.1.1 Etapas I e II	53
4.1.1.1.2 <u>Segunda rota sintética</u>	54
4.1.1.1.2.1 Etapa I	54
4.1.1.1.2.2 Etapa II	60
4.1.1.1.2.3 Etapa III	62
4.1.1.1.3 <u>Terceira rota sintética</u>	64
4.1.1.2 <i>Derivados nitrotriazólicos</i>	66
4.1.1.2.1 <u>Primeira rota sintética</u>	66
4.1.1.2.1.1 Etapa I	66
4.1.1.2.1.2 Etapa II	69
4.1.1.2.1.3 Etapa III	73
4.1.1.2.2 <u>Segunda rota sintética</u>	83
4.1.1.3 <i>Derivados nitrobenzênicos e imidazólicos</i>	87
4.2 Modelagem Molecular	101
4.3 “Docking” com dinâmica molecular	108
5. Conclusões	110
6. Perspectivas	112
7. Referências bibliográficas	113

RESUMO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada, endêmica, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, parasita intracelular obrigatório, que necessita de seres vivos de duas classes totalmente diferentes (insetos, o mais comum, *Triatoma infestans*, e mamíferos, como, por exemplo, o homem) para completar seu ciclo. Em 2009, a doença completou 100 anos de conhecimento pela humanidade, no entanto não há motivos para comemoração, uma vez que, apesar de quase totalmente descrita desde sua descoberta por Carlos Chagas, não há um fármaco que seja ativo na fase crônica. Sabendo que a fase aguda é de difícil diagnóstico e devido à ausência de sintomas indicativos, pode-se dizer que a doença de Chagas é praticamente incurável. Os fármacos utilizados na terapêutica, benznidazol e nifurtimox, são os mesmos há várias décadas. É, portanto, imperioso se buscar candidatos a fármacos antichagásicos que possam suprir o arsenal terapêutico altamente escasso da parasitose. O hidroximetilnitrofural (NFOH), derivado sintetizado em nosso laboratório, se mostrou antichagásico promissor, com maior atividade *in vitro* em relação ao benznidazol, além de ser quatro vezes menos tóxico que o nitrofural, seu precursor. Por outro lado, o bioisosterismo consiste na substituição de elementos ou grupos a fim de se obter melhores propriedades biológicas do fármaco protótipo, caracterizando-se, assim, como forma de modificação molecular. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi a aplicação de bioisosterismo no anel furânico do NFOH, sintetizando derivados imidazólicos e triazólicos, além do mesmo tipo de modificação molecular na cadeia lateral, através da formação de semicarbazonas e tiosemicarbazonas. Dessa forma, pretendeu-se sintetizar compostos que atuariam sobre o parasita por três diferentes vias: a geração de peróxido de hidrogênio, tóxico por ser dificilmente reduzido pelo parasita, através de reações de oxidorredução mediadas pelo grupo nitro; a inibição da enzima cruzaina (presente somente no *Trypanosoma cruzi*) e inibição da 14- α esteroide desmetilase, enzima fundamental na cascata de reações de formação de ergosterol, componente da parede celular do parasita. A síntese dos imidazóis, prevista para ser realizada em cinco ou seis etapas (há possibilidade de realizar em dez etapas através de outra rota), teve duas etapas completadas, com a proteção, utilizando tritila, do nitrogênio 1 do 4-carboxialdeído imidazol e a produção do agente nitrante. Houve problemas na proteção do hidrogênio ligado à carbonila do mesmo composto, necessária para o êxito da nitração ao carbono 2, seguida de reação de acoplamento com a semicarbazona (e tiosemicarbazona) e hidroximetilação. No caso da síntese dos triazóis, também prevista para ser realizada em cinco etapas, concluíram-se duas delas - oxidação do grupo amina a nitro do 3-aminotriazol e hidroximetilação no nitrogênio 1, utilizando formaldeído. A etapa seguinte, de oxidação e formação da carbonila, a fim de permitir reação com semicarbazona, não foi bem-sucedida, uma vez que o composto não se mostrou estável nas condições da reação. Tentativas com diferentes métodos foram realizadas, mas não houve sucesso na formação da carbonila ligada ao nitrogênio 1. Análogos do nitrofural contendo anéis nitrobenzênicos e imidazólicos (sem nitro) foram sintetizados e poderão ser ensaiados no prosseguimento deste trabalho. Através de Modelagem Molecular, realizou-se avaliação comparativa entre a capacidade de redução do grupo nitro dos quatro compostos propostos no projeto em relação aos análogos já sintetizados e conhecidos (contendo anel furânico e tiofênico), além de outros catorze compostos propostos contendo mudanças no anel aromático e na semicarbazona/tiosemicarbazona. Foi possível prever a atividade por um dos mecanismos propostos, que podem estar envolvidos também com toxicidade. Dentre os 22 derivados, o composto imidazólico contendo semicarbazona, que está sendo sintetizado, mostrou-se com maior capacidade de sofrer redução no grupo nitro. Dinâmica molecular associada ao *docking* foi utilizada como ferramenta a fim de se avaliar o mecanismo de inibição sobre a cruzaina. Assim, selecionaram-se o NFOH, além de outros sete bioisósteros, dentre eles os quatro que foram propostos neste projeto. Após dinâmica molecular de 3 ns, observou-se que a CYS25 da proteína se distanciou da carbonila do NFOH, sugerindo dificuldade ao ataque proposto na literatura para outros compostos contendo esta região da molécula. Estudos adicionais sobre a forma de inibição do NFOH à cruzaina se fazem necessários.

PALAVRAS CHAVE: Doença de Chagas. Bioisosterismo. Hidroximetilnitrofural. Planejamento de fármacos. Química farmacêutica.

**Potential antichagasic agents: design and synthesis study of imidazole and triazole
bioisosters of hydroxymethylnitrofurazone**

ABSTRACT

Chagas' disease is an endemic, neglected disease caused by *Trypanosoma cruzi* protozoan, which is an intracellular parasite that requires another type of completely different species (insects, the most common, *Triatoma infestans* and mammals as human being, for example) to complete its cycle. In 2009, this sickness completed 100 years of discovery, however there is no reason for a happy celebration. In spite of being completely described by Carlos Chagas since that time, there is not even one drug that is active in the chronic phase. As the acute phase is very hard to diagnose, and due to the absence of symptoms, nowadays Chagas' disease is practically incurable. The drugs used in the therapeutics are the same since decades ago, benznidazole and nifurtimox. So, it is peremptory to find new candidates of antichagasic drugs that may supply the scarce of therapeutic options to this parasitosis. Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), which is already synthesized in our laboratory, has shown to be promising antichagasic with higher activity and four times less toxic *in vitro* when compared to benznidazole, its precursor. On the other hand, bioisosterism is a useful kind of molecular modification that consists of substitution of elements and groups in order to obtain better biological properties of a prototype. Therefore, the aim of this work was the application of bioisosterism in the furan ring of NFOH by synthesizing imidazole and triazole aromatic ring compounds. Bioisosterism is also applied in the side chain, while semicarbazone and thiosemicarbazone compounds were designed for these possessing nitrogen aromatic rings. So, it was attempted to synthesize compounds that are able to kill the parasite by three different ways: generation of hydrogen peroxide by nitro group, which is highly toxic to the parasite that have problems to neutralize it; inhibition of cruzain, a major cysteine-protease that is present in some catalytic ways of the parasite, and inhibition of 14- α sterol demethylase, a fundamental enzyme in the pathway of ergosterol production, which is a cell wall component. In the imidazole synthesis route, two of the five or six steps (there is possibility to achieve in ten steps, by another route), planned were completed, with the trityl protection of the nitrogen 1 of 4-carboxaldehyde imidazole and the nitrating agent was also produced successfully. Some problems were observed in the protection of the hydrogen bound to the same compound carbonyl by ketal production, which is necessary to provide the nitration in the carbon 2, followed by coupling reaction to the semicarbazide or thiosemicarbazide and the hydroxymethylation, which is the last step of synthesis. In the triazole synthesis, which was predicted to be achieved in five steps, only two were also concluded – oxidation of the amino group to produce 3-nitrotriazole and hydroxymethylation of the nitrogen 1, using formaldehyde. The next step, oxidation to produce carbonyl, in order to allow reaction with the thio or semicarbazone moiety, was not well succeeded, because this compound was not stable in the reaction conditions. Different methods were tempted, but no success was observed for the carbonyl formation on the nitrogen 1. Nitrofurazone (NF) analogs containing nitrobenzenic and imidazolic nucleus (without nitro presence) were synthesized and now are able to be tested in a possible continuation of this work. By using molecular modeling, a comparative evaluation of the nitro reduction capacity by the nitrocompounds designed in this project related with other bioisosters that were already synthesized by our group have been made, in addition to other selected bioisosters. It was possible to predict the activity of these compounds by one of the proposed mechanisms, which can also be evolved with toxicity. Among the 22 calculated compounds, the imidazole compound with sulfur in the side chain presented higher ability to nitro reduction. Molecular dynamics, associated with docking, was used as a tool in order to evaluate the inhibition mechanism over the cruzain. So, NFOH and seven other bioisosters were chosen. After 3 ns of simulation, it was observed that the CYS 25 residue of the protein was distant to the NFOH carbonyl, suggesting difficulty in the proposed in the literature interaction for other compounds containing the moiety. Additional studies to clarify the inhibition form of NFOH to cruzain are necessary.

KEY WORDS: Chagas' disease. Bioisosterism. Hydroxymethylnitrofurazone. Drug design. Medicinal chemistry.

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Doença de Chagas

1.1.1 – Descrição

A doença de Chagas, ou tripanossomíase, é uma protozoose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado (Figura 1) da ordem dos cinetoplastídeos. A doença é assim chamada em homenagem a Carlos Chagas, talvez o maior pesquisador do século XX. Além de identificar o *T. cruzi*, Carlos Chagas efetuou descobertas em todos os aspectos da doença, tais como: anatomia patológica, epidemiologia, etiologia, formas clínicas, meios de transmissão, patogenia, profilaxia e sintomatologia. O ciclo completo do agente causador da doença também foi definido pelo pesquisador, sendo assim o único pesquisador a fazer um relato tão detalhado de uma doença (AMATO NETO, 1950).

Figura 1 – *Trypanosoma cruzi* em sua forma tripomastigota.

Fonte: <http://www.medicine.mcgill.ca/tropmed/images/systemicprot/quintttryp.jpg>

Muitos avanços recentes têm sido observados no diagnóstico e no tratamento da doença de Chagas. No entanto, ela é, ainda, considerada até os dias atuais como a principal doença parasitária surgida na América do Sul (DIAS, 2002). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2006 foi constatada taxa de mortalidade anual de 12,5 mil habitantes, sendo que 15 milhões de pessoas encontravam-se infectadas. O valor de pessoas que estão sob o risco de infecção teria se reduzido de 40 milhões em 2000 para 28 milhões de pessoas em 2006 (WHO, 2007). Este último número está em

discordância com o que Coura e Dias apresentaram em 2009, no qual 90 milhões de pessoas ainda estão sob risco de infecção. De qualquer forma, estes números justificam a atenção que deve ser dada ao diagnóstico e a novas formas de tratamento desta parasitose.

A distribuição geográfica da doença de Chagas se dá em vinte e um países e duas zonas ecológicas (Figura 2) da América Latina, sendo que ultimamente foram diagnosticados casos no Sul dos Estados Unidos (HOTEZ, 2008). Estes locais são os de habitat do vetor da doença (COURA, DIAS, 2009).

Figura 2 – Distribuição geográfica da doença de Chagas.
Fonte: COURA, DIAS, 2009

1.1.2 - Transmissão

O principal vetor da doença de Chagas é o *Triatoma infestans*, um artrópode da classe dos insetos. No entanto, outros insetos do gênero dos triatomíneos são considerados transmissores da doença, tais como *Triatoma dimidata*, *Triatoma pseudomacula*, *Panstrongylus megistus* e outras espécies domésticas (URBINA, DOCAMPO, 2003). No Brasil, os vetores são chamados popularmente de “barbeiros” por picarem os indivíduos na região do rosto (onde a pele é mais fina).

A transmissão se dá, principalmente, por três maneiras: 1) Pela picada do inseto infectado pelo *T. cruzi*. Ao picar o indivíduo, o vetor deixa suas fezes no local. O contato das fezes com o local da picada permite a passagem do parasita para a corrente sanguínea. 2) Através da transfusão de sangue infectado. 3) De modo congênito, passando da mãe para o feto (BITTENCOURT, 2000; DIAS, 2000).

Ultimamente, descobriu-se e está sendo estudada nova forma de transmissão, que se dá através do consumo de frutas como o açaí ou por meio do consumo de caldo de cana de açúcar, que estejam contaminados com o parasita, caracterizando transmissão através de alimentos contaminados (MAEGAWA *et al.*, 2003).

1.1.3 – Sintomatologia e diagnóstico

A fase aguda da doença dura poucos meses e tem como sintomas o desenvolvimento de feridas no local da picada e da entrada do parasita. Se a picada ocorrer na região do olho, pode provocar a formação de conjuntivite ou de inchaço na pálpebra denominado “sinal de Romaña” (DIAS, 1997). Após esta etapa, podem surgir sintomas como febre ou inchaços em gânglios linfáticos. Para muitos pacientes esta fase aguda é assintomática, assim como a fase crônica nos seus primeiros anos. Na fase crônica, o parasita invade muitos órgãos do corpo, como intestino, esôfago e coração, causando danos irreversíveis (GUILLÉN *et al.*, 2006). Nesta fase, quando se identifica a presença do parasita, não há mais tempo de recuperação, principalmente devido aos danos causados no coração, gerando insuficiência cardíaca.

O diagnóstico da doença é feito por meio da visualização microscópica do protozoário, sendo este método aplicável na fase aguda da doença. Métodos de imunodiagnóstico, especialmente a imunofluorescência, ELISA e hemaglutinação são utilizados na fase crônica, detectando-se anticorpos específicos para este parasita. Além disso, sorologia, cultura ou análise do DNA do parasita por PCR também são métodos viáveis. Também, pode ser feita a inoculação do sangue do paciente em animais de laboratório, observando-se o desenvolvimento da doença nos mesmos (DE MARCHI, AMARO NETO, ALMEIDA, 2007; PICKA *et al.*, 2007).

1.1.4 – Ciclo biológico do parasita

O ciclo da doença de Chagas está representado na Figura 3.

Figura 3 – Representação do ciclo do *T. cruzi*.

Fonte: http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Trypanosoma.htm

Na primeira fase (A, na figura 3) o inseto infectado elimina, em suas fezes, o parasita na sua forma de tripomastigota metacíclico. Esta forma possui estrutura em forma de foice, com flagelo livre em sua extremidade anterior e núcleo centralizado. O cinetoplasto, característico de espécies dos cinetoplastídeos, localiza-se em sua extremidade posterior. É encontrada em esfregaços de sangue do hospedeiro definitivo, principalmente em sua fase aguda, ou seja, nos primeiros momentos pós-infecção, quando o parasita entra em contato com o hospedeiro vertebrado.

Em seguida (B), o homem coloca as fezes em contato com a corrente sanguínea ao coçar o local da picada. Uma vez no sangue, há a penetração da forma tripomastigota metacíclica em células, como macrófagos e fibroblastos (C), e, então, o parasita se transforma na forma amastigota. Esta (D) possui estrutura arredondada e não apresenta flagelo, uma vez que não necessita se movimentar. O cinetoplasto aparece em forma de bastão, localizando-se próximo do núcleo central. Esta forma aparece exclusivamente em hospedeiros

vertebrados, sendo uma das formas reprodutivas do parasita. A reprodução é assexuada e se dá por divisão binária.

Depois de terminada a reprodução, o parasita evade a célula (E), se transformando na forma tripomastigota, podendo infectar uma nova célula ou cair na corrente sanguínea, a fim de que seja transportado para outros órgãos. Neste momento, ocorrem as respostas imunes do hospedeiro, diminuindo a quantidade de parasitas na corrente sanguínea, como tentativa (raramente com sucesso) para evitar que estes cheguem a tecidos periféricos. Uma vez na corrente sanguínea, o parasita é ingerido pelo vetor, quando o indivíduo é novamente picado, e seu sangue é retirado pelo inseto (F).

Dentro do intestino do inseto (G), o *T. cruzi* é transformado em epimastigota, a forma reprodutiva do parasita no triatomíneo. A reprodução novamente é assexuada por divisão binária(H). A forma epimastigota apresenta estrutura em forma de foice, com o cinetoplasto localizado em sua região anterior, próximo ao núcleo.

Após a reprodução do parasita, este é transportado até o reto (I), local em que se transforma na forma tripomastigota metacíclica, sendo eliminado novamente nas fezes do inseto e recomeçando o ciclo (DESPOMMIER, KARAPELOU, 1987; GILLES, 1999).

1.1.5 – Prevenção

A prevenção da doença de Chagas pode ser feita de diversas maneiras: 1) Tratamento das casas com inseticidas a fim de eliminar a presença de insetos triatomídeos; 2) Realização de testes sanguíneos antes de se efetuar transfusões, a fim de observar a presença ou ausência do parasita; 3) Melhorias nas moradias, uma vez que os triatomídeos transmissores fazem seus ninhos em frestas de paredes e telhados de habitações pobres feitas, por exemplo, de barro ou pau-a-pique; 4) Evitar a domesticação e a criação de aves e animais domésticos em locais em que há grande probabilidade de desenvolvimento de triatomídeos, evitando a presença de reservatórios do parasita (SILVEIRA, 2000).

Vale a pena ressaltar que a doença de Chagas não é a única doença “social” existente no mundo, não sendo este tipo de doença exclusiva na

América Latina. A “doença do sono”, por exemplo, transmitida pelo protozoário *T. brucei*, é uma endemia africana, pois esse continente apresenta condições apropriadas para o desenvolvimento do parasita. Ao mesmo tempo, há, também, outras doenças como a tuberculose e a esquistossomose, por exemplo, que se desenvolvem por razões higiênicas, falta de saneamento básico ou de condições básicas de sobrevivência do ser humano (PAREDES *et al.*, 2007).

1.2 – Tratamento

A doença de Chagas pode ser inserida entre as doenças tropicais negligenciadas, ou supernegligenciadas, que atingem quase em sua totalidade países do mundo subdesenvolvido ou em desenvolvimento. Em 2009, a doença de Chagas completou 100 anos de descobrimento, mas, apesar disso, não há sequer um fármaco que se mostre eficaz na fase crônica da parasitose (URBINA, 1999a, COURA, BORGES-PEREIRA, 2010). Há décadas não se introduz um novo medicamento para tratamento desta parasitose.

1.2.1 – Tratamento atual - Quimioterapia

O tratamento da doença de Chagas é realizado, até hoje, por meio da administração de quimioterápicos tripanomicidas, como o nifurtimox e o benznidazol (Figura 4). Estes fármacos têm ação significativa na fase aguda da doença, apresentando ação citotóxica e inibindo série de enzimas necessárias às exigências energéticas do parasita (DOCAMPO, 1985). No Brasil, há, apenas, o benznidazol.

Figura 4 – Estrutura química dos dois quimioterápicos usados atualmente contra a doença de Chagas.

O problema na administração destes fármacos é que a fase aguda nem sempre é diagnosticada e pode passar sem que seja notada. Sendo assim, há necessidade de busca de novos fármacos que possuam eficácia na fase crônica da doença. Nesta fase, os fármacos usados na terapia convencional têm pouca atividade, com 80% dos pacientes não sendo curados (URBINA, DOCAMPO, 2003). Assim, apresentam melhores resultados no início da doença, sendo tão mais efetivos quanto antes esta doença for diagnosticada e a terapia for iniciada.

Outros problemas relacionados à utilização do nifurtimox e do benznidazol são, por exemplo, o grande número de efeitos colaterais apresentados durante a terapia (anorexia, vômitos, alergias) e o fato de que o *T. cruzi* apresenta linhagens diferentes de acordo com a localização geográfica, mostrando, assim, eficácia diferente, além da grande dificuldade na prescrição de uma dose adequada (URBINA, DOCAMPO, 2003; URBINA, 1999b).

1.2.2 – Compostos ou fármacos em experimentação

1.2.2.1- Inibidores da síntese de esteróis

O *T. cruzi* utiliza esteróis específicos (ergosterol e análogos) em todas as etapas de proliferação, sendo estes fundamentais na forma replicativa em vertebrados (amastigota), não conseguindo utilizar o abundante fornecimento de colesterol presente nos hospedeiros (URBINA, 2002; URBINA *et al.*, 2004). Desta forma, a inibição da biossíntese destes esteróis é alvo descrito para reduzir a proliferação do parasita dentro do mamífero, facilitando a

neutralização por parte do sistema imune do mesmo (URBINA, 1999b). O benznidazol é o fármaco que tem mostrado inibição dessa via metabólica.

O itraconazol (Figura 5), fármaco muito usado na terapia antifúngica, atua na síntese do ergosterol, inibindo a enzima esterol 14- α desmetilase (CYP 51), presente no complexo enzimático do citocromo P450 (XIAO *et al.*, 2004; LEPESHEVA *et al.*, 2005; LEPESHEVA *et al.*, 2006). A presença dos anéis imidazólicos (benznidazol) e triazólicos (itraconazol) é de grande importância na interação com o grupo heme da enzima (ZHAO *et al.*, 2007). Dados de literatura mostram que utilizando a dosagem de 6 mg por dia durante 120 dias, há redução significativa dos resultados xenodiagnósticos positivos para doença de Chagas, além de diminuição em anormalidades de testes eletrocardiográficos (APT *et al.*, 2003). No entanto, nenhum dos pacientes tratados com este medicamento obteve resultados sorológicos nulos, apesar de diminuição na reprodução parasitária, sem a existência de efeitos colaterais graves (URBINA, DOCAMPO, 2003).

Muitos inibidores da síntese de esteróis vêm sendo propostos na literatura, dentre os quais destaca-se o posaconazol (Figura 5), potente antifúngico de amplo espectro aprovado pela FDA norte-americana, em 2006, como escolha para recuperação em casos de infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos. As desvantagens deste fármaco incluem seu preço e efeitos colaterais graves, especialmente no trato gastro-intestinal, por ser administrado somente na forma oral (LEPESHEVA *et al.*, 2010; FERRAZ *et al.*, 2007; MOLINA *et al.*, 2000). Um interessante estudo de caso mostrou que tratamento de um paciente chagásico com benznidazol induziu a redução da parasitemia, mas não sua total eliminação. Tratamento subsequente com posaconazol levou ao término na infecção (BUCKER, NAVABI, 2010). Como resultado de estudos em animais e em razão deste caso, o posaconazol está em testes de fase II para doença de Chagas (CLAYTON, 2010).

Figura 5 – Antifúngicos que agem na enzima esterol 14- α desmetilase potenciais para tratamento da doença de Chagas.

Em 2004, URBINA e colaboradores publicaram a síntese de outros dois compostos análogos (E5700 e ER-119884, Figura 6), que apresentavam resultados satisfatórios na inibição da esqualeno sintase, outra enzima responsável pela produção dos esteróis utilizados pelo parasita.

Figura 6 – Fórmula estrutural dos análogos propostos por Urbina e colaboradores (2004).

1.2.2.2– Inibidores da cisteíno-protease

A cruzipaina é a principal cisteíno-protease presente no *T. cruzi*, sendo, assim, um alvo viável na terapêutica (CAZZULO *et al.*, 2002; URBINA, DOCAMPO, 2003). Sua atividade está relacionada ao desenvolvimento do parasita e na diferenciação de vários estágios de seu ciclo biológico, na invasão no hospedeiro e na alteração da resposta imune do hospedeiro (DEL NERY *et al.*, 1997; SAJID, MCKERROW, 2002; MCKERROW *et al.*, 2009). Esta enzima, também denominada cruzaína (EAKIN *et al.*, 1992) faz parte da família das papaínas C1 das cisteíno-proteases com especificidade intermediária entre as catepsinas L e B, sendo expressada em diferentes níveis por diferentes estágios do parasita, sendo codificado por um alto número de genes (CAZZULO *et al.*, 2001).

Os compostos que apresentam atividade contra a cruzipaina são as semicarbazonas e a *N*-metil-piperazina-uréia-Phe-homo-Phe vinil-fenil-sulfona (Figura 7), que agem inibindo as etapas proliferativas do ciclo, forma epimastigota no hospedeiro intermediário e amastigota no hospedeiro definitivo (ENGEL *et al.*, 1998a; DU *et al.*, 2002; URBINA, DOCAMPO, 2003).

Figura 7 – Fórmula estrutural da *N*-metil-piperazina-uréia Phe-homo-Phe-vinil-fenil-sulfona e estrutura geral das semicarbazonas (de cadeia linear e cíclica).

Os inibidores da cruzipaina provocam mudança na localização da enzima dentro do complexo de Golgi, reduzindo em 70% o transporte destas para os lisossomos. Com a diminuição da catálise e digestão desta, há

acúmulo de cruzipaina no interior da célula, diminuindo a mobilidade das membranas do complexo de Golgi e resultando em distensão periférica de suas cisternas. Tais alterações provocariam a morte do parasita (ENGEL *et al.*, 1998b).

1.2.2.3 – Nitroderivados/ Inibidores de tripanotiona redutase

A redução do grupo nitro é considerada como etapa fundamental em uma das etapas de ação antichagásica dos fármacos nitroderivados utilizados para o tratamento da doença de Chagas. A redução de uma molécula de oxigênio promovida por esta oxidação resulta na produção do radical livre superóxido (regenerando o grupo nitro). A ação da enzima superóxido dismutase promove a dismutação do íon superóxido, gerando peróxido de hidrogênio (Figura 8), que é dificilmente neutralizado pelo *T. cruzi*, devido à deficiência na produção da enzima catalase (MORENO, DOCAMPO, 1985; MORENO, 1988). Por esta razão, a neutralização de peróxidos se dá por outra via, a da tripanotiona/tripantion redutase (TURRENS, 2004; STEENKAMP, 2002). Esta enzima, encontrada nesta espécie, é análoga à glutathione peroxidase encontrada nos seres humanos, sendo composta de duas moléculas desta ligadas por ligação amídica a molécula de espermidina (Figura 9).

Figura 8 – Esquema de formação de peróxido de hidrogênio a partir da redução de grupamento nitro (MORENO *et al.*, 1988).

A tripanotiona redutase apresenta mecanismos catalíticos semelhantes aos da glutathione peroxidase. Comparando-se as estruturas cristalográficas destas duas redutases, observa-se diferente seletividade aos seus substratos. A tripanotiona redutase possui um sítio ativo com carga global negativa, acomodando a carga positiva da espermidina, enquanto que a glutathione

peroxidase possui um sítio ativo mais compacto, carregado positivamente (MARTYN *et al.*, 2007). A ausência da tripanotona redutase nos mamíferos e a sensibilidade do parasita ao estresse oxidativo faz desta enzima um alvo interessante na terapia (HOLLOWAY *et al.*, 2007). Outro alvo de interesse pode ser a formação da tripanotona, impedindo a reação de formação de amida.

Figura 9 - Diferença estrutural da tripanotona e da glutathione.

1.2.2.4 – Compostos com outros mecanismos

O *T. cruzi* possui um tipo de organela que não é encontrado nos seres humanos, a acidocalcissoma. Esta organela possui grande quantidade de pirofosfatos (PPi), sendo estes intermediários importantes na formação do esqualeno e do ergosterol no parasita (Figura 10). A relação ATP/PPi nesta organela é da ordem de 1/6, justificando a utilização de pirofosfatos como doadores energéticos para fosfofrutoquinases (URBINA *et al.*, 1999; DOCAMPO, 2001; ROHLOFF *et al.*, 2004). Além disso, foi encontrada capacidade de inibição de uma hexoquinase dependente de ATP, agindo novamente em vias glicolíticas (RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

Figura 10 – Via de produção do esqualeno dependente de pirofosfatos.

(RODRIGUEZ *et al.*, 2007)

A utilização de bisfosfonatos vem sendo largamente estudada, uma vez que estes, por possuírem características estruturais semelhantes aos pirofosfatos, são empregados em seu lugar, impedindo a produção de esteróis. São de 100 a 1.000 vezes mais potentes na inibição das hexoquinases, impedindo a formação de glicose em condições normais. Alguns dos bisfosfonatos utilizados possuem outras funções em seres humanos, tal como o alendronato, usado para pacientes com osteoporose, pois inibe a recaptção de cálcio por osteoclastos.

Por outro lado, a HGPRT (Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase) é uma enzima fundamental na incorporação de purinas a partir do hospedeiro. O alopurinol atua como um análogo de purina, sendo incorporado pela HGPRT e agindo, portanto, na síntese de RNA e de proteínas de forma inibitória.

1.3 – Modificação Molecular no planejamento racional de novos fármacos

A modificação molecular é considerada a técnica mais promissora para a introdução de novos fármacos na terapêutica (KOROLKOVAS, 1988). Apesar das inúmeras técnicas e ferramentas consideradas modernas e utilizadas hoje em dia na descoberta de novos fármacos, a modificação molecular é

responsável por 90% dos fármacos lançados no mercado. Tal processo permite a alteração de ligações, elementos ou grupos químicos, a fim de anular efeitos indesejáveis dos fármacos utilizados, ou introduzir outros que potencializem, ou intensifiquem a atividade biológica, uma vez conhecido o mecanismo de ação do fármaco (WERMUTH, 2008a). Podem, também, aumentar a afinidade por um receptor ou alterar a lipofilicidade da molécula, interferindo, assim, com a farmacocinética do fármaco ou composto potencialmente ativo. Diversos processos de modificação molecular podem ser utilizados, entre eles, o bioisosterismo.

1.3.1 – Bioisosterismo

A palavra isosterismo vem de uma junção de termos oriundos do grego (isos = igual; steros = volume). Compostos isósteros são aqueles que possuem substituições de grupos com configurações estéricas e eletrônicas semelhantes. O termo bioisosterismo veio a partir desta definição, sendo conceituado como substituição de elementos ou grupos, a fim de se obter melhores propriedades biológicas do fármaco protótipo, caracterizando-se, assim, como forma de modificação molecular. Compostos bioisostéricos afetam o mesmo sistema bioquímico como agonistas ou antagonistas, produzindo propriedades biológicas semelhantes, ainda que antagônicas (BURGER, 1991).

Há uma divisão entre Bioisosterismo Clássico e Não-Clássico, sendo que o primeiro atende às características definidas antigamente por Grimm e Erlenmeyer nas primeiras três décadas do século XX, ou seja, os bioisósteros seriam átomos ou grupos que possuíam camadas de valência semelhantes. No Bioisosterismo Não-Clássico não há necessidade de seguir a estas regras em termos de estrutura eletrônica ou de átomos e a substituição busca, principalmente, uma atividade biológica similar (PATANI, LAVOIE, 1996; CIAPETTI, GIETHLEN, 2008; LIMA, BARREIRO, 2005).

O bioisosterismo é uma ferramenta importante na obtenção de fármacos mais ativos e com menores efeitos adversos. É um dos mais explorados processos de modificação molecular. A substituição do cloro, presente no anel aromático do itraconazol por flúor, no posaconazol, por exemplo, permite

melhor interação entre o fármaco com o sítio da enzima CYP51 em *Mycobacterium tuberculosis* (Zhao *et al.*, 2003).

1.4 – Modelagem Molecular

Nas décadas recentes, a Modelagem Molecular (MM) se constitui em ferramenta amplamente utilizada para a descoberta de novos candidatos a agentes terapêuticos (BILLINS, 2002; SILVA, 2002). A MM se insere no método de planejamento racional e compreende a construção e manipulação de modelos químicos ou quimio-biológicos, que, submetidos a cálculos envolvendo parâmetros físico-químicos, fornecem informações teóricas úteis para o estudo da natureza estérica, eletrônica e lipofílica da provável interação do fármaco ou de substâncias propostas como ligante com o receptor, bem como no estabelecimento das relações entre estrutura química e atividade biológica de série de novos compostos. Ambos os modos de pesquisa podem auxiliar na compreensão do mecanismo de ação responsável pelo efeito biológico. Essa metodologia utiliza ferramentas computacionais, tanto para a realização de cálculos, quanto para a visualização de geometria e superfícies eletrônicas, e permite, ainda, o armazenamento e a disponibilidade de banco de compostos. Os procedimentos de cálculos são efetuados por métodos baseados na mecânica clássica ou mecânica quântica.

O planejamento racional auxiliado por MM tem se mostrado como forte tendência na descoberta de novos fármacos, promovendo rápidos avanços em pesquisas e despertando o interesse tanto no meio acadêmico quanto em indústrias farmacêuticas. Isto porque permite ao pesquisador obter informações concretas de fármacos promissores com gastos mínimos, se comparados àqueles observados em estudos de síntese ou de atividade biológica. No entanto, por serem dados apenas teóricos, a associação destes com a síntese e testes *in vitro in vivo* é essencial. Desta forma, pode-se considerar a MM como um dos passos iniciais muito importante no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. (BILLINS, 2002).

1.5 – “Docking”

Este método permite a observação da orientação da molécula em relação a uma segunda (uma proteína, por exemplo), por meio de diversos tipos de forças intermoleculares. A fim de se realizar o *docking*, a primeira exigência se dá em conhecer a estrutura da proteína de interesse. Para isso, a estrutura é definida por técnicas como cristalografia por raios-X ou por espectroscopia RMN. A estrutura da proteína é combinada com série de potenciais ligantes e as interações são observadas. Ligações de hidrogênio e interações entre grupos hidrofóbicos são dois exemplos de tipos de interações que são visualizadas através deste método (LENGUANER, RAREY, 1996).

Assim como a MM, o *docking* é um método teórico, barato e de simples utilização, requerendo cuidados na interpretação dos dados. A mais importante aplicação deste método se dá na procura virtual de novos ligantes a um determinado receptor. Os bancos de dados de moléculas existentes possibilitam rápida e mais segura seleção de ligantes e suas interações com o receptor, reduzindo o número de compostos a ser sintetizado, o que torna, em tese, a pesquisa de novos fármacos mais rápida e racional (ITAL *et al.*, 1996; BREDA *et al.*, 2008).

O modelo faz uma seleção de espaço com as orientações e conformações no local do acoplamento entre o ligante e a proteína, observando todas as possíveis distorções e orientações rotacionais e translacionais. Estas orientações podem ser obtidas através de mecânica molecular, buscando a conformação de menor energia, ou através de uma combinação linear de múltiplas estruturas, determinando a flexibilidade do receptor. Além disso, as conformações geradas a partir de diferentes orientações podem ser obtidas por algoritmo genético, fazendo, assim, a previsão mais precisa das interações intermoleculares (JONES *et al.*, 1997).

As conformações obtidas são avaliadas e classificadas por funções de contagem (*scoring*) a fim de distinguir a configuração experimentalmente determinada das demais que são geradas. Entre as funções de contagem encontram-se os métodos de campo de força, que são utilizados normalmente para gerar previsões com precisão das ligações entre ligante-receptor, fazendo uso da interpolação e extrapolação a partir de modelos moleculares simples.

Nestes métodos, os parâmetros de campo de força são considerados em função de energia potencial. Assim, a geometria da molécula é dada pela soma das interações envolvidas (PIERRI *et al.*, 2010).

1.6 – Dinâmica Molecular

Simulações de dinâmica molecular (DM) vêm sendo cada vez mais utilizadas como ferramenta de escolha entre os Químicos computacionais (NORBERG, NILSON, 2003). Esta metodologia é amplamente aplicada para o estudo de macromoléculas, sendo valiosa para o entendimento do comportamento de proteínas em diferentes escalas de tempo (SNOW *et al.*, 2005). Através desta metodologia, é possível, também, observar o comportamento do composto em questão sob diferentes solventes e a relação entre afinidades de um ligante com a um receptor ou ao solvente no qual este foi colocado. Além de avaliar características da interação ligante/receptor, esta metodologia é largamente utilizada para diversos fins, tais como avaliar características de determinadas membranas através de simulações de DM das proteínas constituintes das mesmas (LINDAHL, SANSOM, 2008) ou, ainda, avaliar a afinidade de molécula de oxigênio à hemoglobina em diferentes ocasiões (YOTENAMI, LABERGE, 2008).

Protocolos simples de *docking* vêm sendo combinados com técnicas de DM, a fim de prever de forma mais fiel as interações ligante-proteína. Por serem processos simples e de baixo custo (em relação a técnicas como a Química Combinatória) estes têm evoluído em paralelo, a fim de resolver os problemas que ainda eventualmente aparecem nos estudos. Os problemas associados ao *docking* relacionam-se à dificuldade de ajustes de flexibilidade na proteína, fato este que *in vivo* é observável. Por outro lado, simulações de DM podem tratar tanto a proteína como o ligante de forma flexível, permitindo encaixe com maior número de variáveis. Além disso, o efeito do solvente pode ser estudado diretamente e, de maneira precisa, as energias livres de ligação podem ser observadas. Entretanto, os problemas principais em simulações de DM estão relacionados com o tempo gasto de computador. Também, em cálculos de análise conformacional na modelagem molecular pode haver o problema de não se chegar ao mínimo global, mas sim, no indesejado mínimo

local. Desta forma, a associação entre *docking* e DM é feita através de rápida análise de um grande número de compostos, por meio do primeiro procedimento, e otimização de energias e cálculo mais preciso de energias e da real afinidade do ligante através do segundo (ALONSO *et al.*, 2006).

Cálculos de Energia livre garantem o sucesso de um processo de *docking* associado à DM, uma vez que mostram a estabilidade de diferentes complexos ligante-receptor, além de diferenciar as conformações apresentadas como resultado dos cálculos. Metodologia que apresenta valores relativos de Energia por custo moderado é a de energia de interação linear (LIE do inglês *linear interaction energy*). Através deste método é possível obter-se um valor de constante de inibição (k_i) teórico através de relações entre uma simulação ligante-proteína e outra de ligante-solvente (AQVIST *et al.*, 1994; AMORIM *et al.*, 2008).

2 – OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas está caracterizada entre as doenças tropicais supernegligenciadas (WHO, 2007). Este fato pode ser comprovado através da existência, no Brasil, de um único medicamento no mercado atualmente, o benznidazol. Recentemente, o nifurtimox foi retirado do mercado do País. Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos que atuem sobre o *T. cruzi* faz-se necessário.

O nitrofural (NF), composto antibacteriano usado há décadas para tratamento de queimaduras, foi destacado por possuir grande atividade sobre a tripanotona redutase, enzima fundamental na neutralização do peróxido de hidrogênio, que é um radical livre dificilmente neutralizado pelo parasita (HENDERSON *et al.*, 1988; BOVERIS, 1980). No entanto, este fármaco apresenta alto grau de toxicidade.

Um pró-fármaco hidroximetiladolado do NF, o hidroximetilnitrofural (NFOH, Figura 11), foi obtido em nosso laboratório como intermediário da síntese de pró-fármacos recíprocos do NF e da primaquina, sob a forma de bases de Mannich. Este intermediário mostrou-se muito promissor, sendo mais ativo e possuindo toxicidade relativamente menor que o nitrofural, do qual deriva (CHUNG *et al.*, 2003).

Figura 11 – Estruturas do nitrofural (NF) e do hidroximetilnitrofural (NFOH).

Face ao exposto e uma vez conhecida a atividade de análogos do itraconazol e do benznidazol (contendo anéis triazólico e imidazólico, respectivamente) contra o *T. cruzi*, o objetivo do trabalho desenvolvido durante o período de mestrado foi o de, por meio do bioisosterismo no anel furânico do NFOH (substituindo-o por anéis imidazólicos e triazólicos), buscar ação contra

a síntese do ergosterol, além de ação do grupo nitro contra a tripanotona redutase.

Bioisosterismo entre o oxigênio e o enxofre é aplicado no grupo carbonila, buscando semelhanças com as semicarbazonas, inibidoras da cruzipaína, e tiosemicarbazonas, na tentativa de inibir esta importante enzima presente no parasita (DU *et al.*, 2002; TROSSINI *et al.*, 2007).

Espera-se, portanto, que os compostos obtidos apresentem ação contra o parasita por três mecanismos diferentes.

Além da tentativa de síntese e análise dos análogos do NFOH propostos (Figura 12), estudos de modelagem molecular foram efetuados a fim de se prever, por meio da distribuição eletrônica dos análogos propostos e da construção e interpretação de modelos tridimensionais dos mesmos, a capacidade de redução do grupamento nitro e, assim, a ação destes protótipos através deste mecanismo de ação.

Avaliação, mediante estudos computacionais teóricos, utilizando-se a metodologia de dinâmica molecular e a interação dos compostos propostos com a cruzipaína foi também realizada.

Figura 12 – Derivados do NFOH propostos para síntese.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 – Reagentes e solventes

- ✓ Ácido 1-*H*-imidazol-4,5-dicarboxílico (Aldrich)
- ✓ 1-*H*-2,4-triazol-3-amino (Aldrich)
- ✓ 4-Carboxialdeído imidazol (Aldrich)
- ✓ 3-Nitro benzaldeído (Aldrich)
- ✓ Acetonitrila (Sigma-Aldrich)
- ✓ Acetato de etila (Merck)
- ✓ Acetato de sódio (Sigma-Aldrich)
- ✓ Ácido clorídrico (Merck)
- ✓ Ácido fórmico (Merck)
- ✓ Ácido sulfúrico (Merck)
- ✓ Ácido nítrico (Merck)
- ✓ Álcool *terc*-butílico (Merck)
- ✓ Alumina básica (Merck)
- ✓ Aminoguanidina (Sigma-Aldrich)
- ✓ Anidrido acético (Merck)
- ✓ Bicarbonato de sódio (Synth)
- ✓ Butanol p.a. (Merck)
- ✓ Carbonato de potássio (Merck)
- ✓ Carvão vegetal
- ✓ Cloreto de tritila (Merck)
- ✓ Clorocromato de piridínio (Sigma-Aldrich)
- ✓ Cloroformato de *n*-propila (Sigma-Aldrich)
- ✓ Clorofórmio p.a. (Merck)
- ✓ Diclorometano p.a. (Merck)
- ✓ Dimetilformamida (Merck)
- ✓ Etanol p.a. (Merck)
- ✓ Etilenoglicol (Synth)
- ✓ Éter etílico p.a. (Merck)

- ✓ Formaldeído p.a. (Merck)
- ✓ Hidreto de lítio e alumínio (LAH, Sigma-Aldrich)
- ✓ Hidróxido de sódio (Merck)
- ✓ Metanol p.a. (Merck)
- ✓ *n*-Butil lítio em hexano (Aldrich)
- ✓ Nitrato de *n*-propila (Aldrich)
- ✓ Nitrato de prata (Aldrich)
- ✓ Pentóxido de difósforo (Sigma-Aldrich)
- ✓ Propanol p.a. (Merck)
- ✓ Semicarbazona (Sigma-Aldrich)
- ✓ Sílica-gel (Merck)
- ✓ Sulfato de cobre (Aldrich)
- ✓ Tetraidrofurano (Merck)
- ✓ Tetracloreto de carbono (Synth)
- ✓ Tiossemicarbazona (Sigma-Aldrich)
- ✓ Trietilamina (Merck)

3.1.2 – Equipamentos

- ✓ Agitadores magnéticos
- ✓ Agitador mecânico
- ✓ Aparelho capilar Büchi e de fusão automática, modelo M-565, para determinação de faixa de fusão
- ✓ Bomba de alto vácuo, modelo E2M5 EDWARDS
- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advance DPX-300
- ✓ Espectrofotômetro de absorção no infravermelho (IV), FTIR-Bomem, modelo MB-120
- ✓ HPLC Shimadzu[®] semipreparativo
- ✓ Lâmpada de radiação ultravioleta Spectroline, modelo ENF-260C.
- ✓ Sintetizador em paralelo Büchi - *Syncore reactor*.

Tais equipamentos encontram-se disponíveis no LAPEN – Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos em

Endemias Tropicais --, na Química Farmacêutica, e, também, no Departamento de Farmácia, da FCF/USP.

3.1.3 – Softwares para Modelagem Molecular

- ✓ AutoDock 4.0 (<http://www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock/>).
- ✓ Hyperchem v.7.5 para Windows, da Hypercube, Inc.
- ✓ Spartan 02' 2002 para Linux, versão 119a da Wavefunction Inc.
- ✓ MOLSIM 3.2 (The chem21 Group, Inc.)
- ✓ GROMACS 4.0 (<http://www.gromacs.org>)

Esses programas encontram-se disponíveis no LAPEN.

3.2 Métodos

3.2.1 – Síntese

3.2.1.1 - Derivados nitroimidazólicos

Três rotas sintéticas foram propostas para a síntese dos derivados imidazólicos pesquisadas ao longo do desenvolvimento do projeto. A primeira rota sintética, por possuir grande número de etapas, dez, e pelo insucesso obtido na análise do produto obtido na segunda etapa, necessitou ser reformulada, reduzindo-se o número de etapas para cinco, através da aquisição de material de partida comercial. Sendo assim, a rota sintética foi reelaborada, partindo-se do 4-carboxialdeído 1,3-imidazol. A terceira rota parte da mesma molécula, porém envolve uma etapa a mais, totalizando seis etapas. As três rotas sintéticas são descritas a seguir.

3.2.1.1.1 – Derivados nitroimidazólicos – Primeira rota proposta

A fim de tornar a síntese dos compostos propostos neste projeto mais barata, nos primeiros meses de desenvolvimento, propôs-se rota sintética baseada em pesquisas bibliográficas, a fim de chegar ao anel nitro-imidazólico com grupo carbonila ligado na posição 4 como produto, permitindo reação com a semicarbazida ou a tiossemicarbazida. As dez etapas são descritas a seguir.

I - Formação de intermediário tricíclico (I1)

Figura 13 – Primeira etapa da síntese do NFOH imidazólico, com formação do intermediário tricíclico.

Suspensão de 20 g (0,128 mol) do reagente em 750 mL de anidrido acético é agitada e refluxada enquanto a solubilização fica próxima de se completar (5 horas). Pequena quantidade de sólido cinza é removida por filtração e o filtrado (cor marrom clara) é evaporado até secagem (DAVIS *et al.*, 1982).

II- Hidrólise com formação de carboxila (I2)

Figura 14 – Reação de formação do imidazol monocarboxilado.

Ao filtrado de cor marrom clara adicionam-se 300 mL de água; a mistura é agitada ao longo da noite e, então, aquecida por uma hora. Em seguida, são adicionados 300 mL de etanol e carvão vegetal a fim de tornar límpida a solução. A mistura é aquecida e evaporada por 30 minutos e filtrada a quente. A solução é refrigerada ao longo da noite e cristais amarelo-claros são coletados e secos. A solução-mãe é concentrada até a secagem, dissolvendo-se o resíduo em 100 mL de etanol aquoso 50% (v/v), e a solução é novamente resfriada ao longo da noite, fornecendo mais produto. Faixa de fusão do produto: 279-281 °C. Este material é satisfatório para a conversão a éster. Em seguida, recristaliza-se de solução de 50% de etanol (DAVIS *et al.*, 1982).

III- Esterificação (I3)

Figura 15 – Reação de esterificação da caboxila.

À suspensão de 25 g (0,22 mol) do imidazol em 450 mL de etanol absoluto adicionam-se 25 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura é agitada e refluxada (em atmosfera de nitrogênio) por 36 horas. A este ponto, a reação deverá terminar, identificando-se a ausência do reagente por cromatografia por camada delgada. A solução é resfriada em banho de gelo e neutralizada até pH 8 com 100 mL de NaOH 5 mol/L. O solvente é removido à pressão reduzida e o resíduo dissolvido em volume mínimo de água fervente (200-300 mL). O éster é separado pelo resfriamento da solução e a solução-mãe é concentrada, a fim de se obter melhor rendimento. Finalmente, a amostra é recristalizada de solução de etanol 80% (v/v). Faixa de fusão do produto: 159-160 °C (DAVIS *et al.*, 1982).

IV- Proteção de ataque ao nitrogênio 1 (I4)

Figura 16 – Reação de proteção de ataque ao nitrogênio 1 imidazólico.

A 200 mL de DMF seco em um frasco equipado com tubo seco adicionam-se, sob agitação magnética, 8,4 g (60 mmol) do éster não-protetido. A mistura é agitada por 10 minutos a fim de que haja dissolução e 17 g (61 mmol) de cloreto de tritila são adicionados. Quando a dissolução se completa, adicionam-se 10 mL (71 mmol) de trietilamina. A mistura é agitada

durante a noite à temperatura ambiente e o solvente é removido sob pressão reduzida. O resíduo sólido é dissolvido em mistura de 100 mL de bicarbonato de sódio saturado e 100 mL de clorofórmio. O sistema aquoso formado é extraído com três porções de 40 mL de clorofórmio. Os extratos são lavados e saturados em solução de carbonato de sódio e secos com sulfato de magnésio. O solvente é evaporado e o resíduo sólido é dissolvido em 95% de álcool em ebulição; 40 mL de água são adicionados e a solução é aquecida até ficar límpida. Ao resfriar a solução aparecem cristais que são coletados e secados. A faixa de fusão do produto está entre 165 °C e 167 °C. Concentração da solução-mãe e cuidadosa diluição em água fornecem mais produto, aumentando o rendimento final (DAVIS *et al.*, 1982).

V – Hidrólise do éster formando álcool (I5)

Figura 17 – Reação de hidrólise, reduzindo o grupo ácido a álcool.

Suspensão de 1,14 g (30 mmol) de LAH em 100 mL de THF seco é resfriada a 0 °C e a solução de 10 g (26,2 mmol) do éster protegido é adicionada por 15 minutos, sob agitação, em 100 mL de THF. A mistura é agitada por 1 hora à temperatura ambiente e depois resfriada novamente a 0 °C. Água (1,14 mL) é adicionada lentamente, seguida de 1,7 mL de 10% de NaOH, e, finalmente, de 2,85 mL adicionais de água. A mistura é agitada por 30 minutos e é filtrada. O material que ficou no filtro é lavado com 3 porções de 30 mL de THF quente e, então, extraído com 3 porções de 150 mL de etanol 95% (v/v) quente. Os extratos combinados de etanol são resfriados a fim de formar, após filtração, cristais incolores. O rendimento pode ser aumentado ao se concentrar a solução. O filtrado original de THF e o utilizado na lavagem do filtrado, combinados, podem ser concentrados a fim de fornecer mais uma alíquota de produto. Faixa de fusão: 237,5-240 °C (DAVIS *et al.*, 1982).

VI – Produção do *n*-PrONO₂ (I6)

Figura 18 – Reação de produção do *n*-PrONO₂, que será utilizado na nitração subsequente.

Em frasco de 200 mL adicionam-se 22,60 g (0,133 mol) de nitrato de prata, 50 mL de acetonitrila e 2,0 mL de piridina. A mistura é agitada até dissolução, resfriando-se a -17 °C e mantendo-se esta temperatura (± 2) enquanto 15 mL (0,133 mol) de cloroformato de *n*-propila em 30 mL de acetonitrila são adicionados em gotas, durante uma hora, deixando em repouso após o final desta adição por 2 horas. A mistura reacional é deixada à temperatura ambiente ao longo da noite, a fim de que haja aumento lento da temperatura (MORTIMER, 1961).

VII – Desproteção no nitrogênio 1 e nitração na posição 2 (I7)

Figura 19 – Reação de retirada do grupo protetor ligado ao nitrogênio 1 e nitração do carbono 2.

A um frasco de 250 mL adicionam-se 4,05 g (9,7 mmol) do reagente e 100 mL de THF seco. A solução agitada é resfriada a 0 °C e 16,2 mL (21 mmol) do reagente *n*-BuLi em hexano se adicionam por 2 minutos. A solução incolor é agitada à temperatura ambiente, por 2 horas. Um sólido branco (sal de lítio) é

precipitado no instante em que a solução assume cor vermelho-escura. À solução, juntam-se 2,2 mL (22 mmol) de nitrato de *n*-propila, em 15 mL de THF seco, por 5 minutos, sob agitação, mantendo-se à temperatura ambiente por 30-60 minutos. A cor vermelha é desfeita, o sólido dissolve-se gradualmente e a solução torna-se marrom-escura. A solução é resfriada a 0 °C e, em seguida, diluída em 100 mL de metanol e 10 mL de ácido clorídrico, sendo agitada por toda a noite à temperatura ambiente, a fim de se retirar o grupo tritila e promover a hidrólise de quaisquer traços restantes do éster nitrado. O solvente é evaporado e o produto triturado com água/etanol (4:1). O sólido passa por refiltração e é evaporado até secagem. A recristalização é feita da mistura acetato de etila/etanol. (DAVIS *et al.*, 1982).

VIII- Oxidação do álcool a aldeído (I8)

Figura 20 – Reação de oxidação da hidroxila a carbonila.

À solução de 430 mg (2 mmol) de clorocromato de piridínio (PCC) em diclorometano (10 mL) adiciona-se solução em quantidades estequiométricas do reagente em diclorometano (2 mL). A mistura é agitada por 22 horas à temperatura ambiente e, em seguida, refluxada por 1 hora. A mistura obtida é filtrada e o resíduo polimérico marrom formado é lavado duas vezes com porções de 10 mL de diclorometano. As soluções combinadas de diclorometano são juntadas e evaporadas sob pressão reduzida. Ao resíduo adiciona-se éter (30 mL) e a mistura é agitada por cerca de 10 minutos. A solução é filtrada e o precipitado é lavado com éter (5 mL). Esta nova solução de éter é lavada com porções de 5 mL de solução 5% de NaHCO₃ até tornar a solução etérea incolor. A solução é, então, secada com sulfato de magnésio e o éter é removido sob baixa pressão, fornecendo o produto (GHANDI, MASHAYEKHI, 2007).

IX- Ligação com semicarbazona (I9)

Figura 21 – Reação de ligação da semicarbazona, com formação de imina.

Utilizando balões de 10 mL, adiciona-se o 1-*H*-imidazol-2-nitro-4-carboxialdeído (10 mmol) à solução de água destilada e etanol, em proporção 2:5. A mistura é aquecida até o refluxo e, então, adiciona-se, sob agitação, a semicarbazona ou a tiossemicarbazona. A adição deve ser lenta, até se chegar à mesma proporção (10 mmol). Os precipitados são filtrados e secados sob pressão reduzida. Em seguida, são armazenados em dessecador de sílica-gel e pentóxido de difósforo (RANDO *et al.*, 2008).

X- Hidroximetilação do nitrogênio terminal da semicarbazona (I10)

Figura 22 – Etapa final da síntese do isómero imidazólico do NFOH.

Esta substituição deve ser realizada em meio alcalino, adicionando-se o produto da primeira etapa ($5 \cdot 10^{-3}$ mol) com K_2CO_3 na proporção 1:1,5 em água (10 mL). Formaldeído (18 mL) é adicionado em 2 etapas, 9 mL no início da reação e 9 mL após 7 horas de reação. O sistema deve ser mantido sob

agitação e sob proteção da luz. O produto é lavado com metanol e recristalizado de metanol/água (6:0,1, v/v) (TROSSINI *et al.*, 2010).

3.2.1.1.2 – Segunda rota proposta

A segunda rota proposta possui menor número de etapas, cinco, e estas se assemelham a algumas etapas da primeira rota. Uma vez adquirido o 4-carboxaldeído imidazol, houve redução no número de etapas, o que, possivelmente, aumenta, também, o rendimento final da reação.

I - Proteção de ataque ao nitrogênio 1 (IN1)

Figura 23 – Reação de proteção de ataque ao nitrogênio 1 imidazólico.

O procedimento a ser seguido é o mesmo anteriormente descrito por DAVIS e colaboradores (1982), correspondendo à etapa IV da primeira rota. A única diferença na reação é a alteração de éster para aldeído ligado ao anel imidazólico.

II - Produção do *n*-PrONO₂ (IN2)

Figura 24 – Síntese do *n*-PrONO₂, para nitração subsequente.

Sob agitação em banho de gelo, 20 mmol de H_2SO_4 são adicionados lentamente à mesma quantidade em mol de HNO_3 . A mistura é agitada por mais 10 minutos. Na sequência, 0,6 g (10 mmol) de 1-propanol em 5 mL de diclorometano é adicionado, lentamente, à mistura em banho de gelo, evitando que a temperatura exceda 5 °C. Após agitar por 3 horas, a reação é finalizada adicionando-se 10 mL de água. A fase orgânica é isolada, lavada com água, secada com sulfato de magnésio e concentrada para fornecer os produtos (FANG *et al.*, 2008).

III – Desproteção no nitrogênio 1 e nitração na posição 2 (IN3)

Figura 25 – Reação de desproteção do nitrogênio 1 e nitração do carbono 2.

Nesta etapa, novamente será seguido o procedimento descrito por DAVIS e colaboradores (1982), que corresponde à etapa VII da primeira rota. A única diferença se dá na presença de carbonila ao invés de hidroximetila ligada ao anel imidazólico.

Por se tratarem exatamente dos mesmos compostos envolvidos, as etapas IV e V desta rota são idênticas às etapas IX e X da primeira rota proposta.

3.2.1.1.3 – Terceira rota proposta

A terceira rota foi elaborada devido a problemas na terceira reação da segunda rota proposta. A fim de que esta etapa fosse efetuada com sucesso, introduziu-se reação de proteção ao carbono carbonílico (Figura 27), que, eventualmente, poderia ter reagido e impedido que houvesse sucesso na nitração no carbono 2 do imidazol.

I- Proteção da carbonila (INN1)

Figura 26 – Reação de proteção de ataque ao nitrogênio 1 imidazólico.

Solução contendo 2 mmol do 4-carboxialdeídoimidazol e 0,05 g de ácido *p*-toluenossulfônico em tolueno (30 mL) é colocada em refluxo utilizando o aparelho de *Dean-Stark*, a fim de remover a água formada e deslocar o equilíbrio no sentido de formação do composto protegido. Adiciona-se, então, etilenoglicol (1,2 mL, 2,2 mmol) e a reação é deixada sob agitação ao longo da noite. O produto é extraído com acetato de etila, seguido de secagem com sulfato de magnésio e evaporação do solvente (BARALDI *et al.*, 1985).

Não há mudança nas demais etapas da síntese dos derivados imidazólicos, uma vez que a metodologia utilizada para proteção do nitrogênio aromático, a desproteção ácida e a nitração seguir-se-ão pela mesma metodologia já descrita.

3.2.1.2 – Derivados nitrotriazólicos

A primeira rota de síntese dos derivados triazólicos (5 etapas) apresentou problemas na oxidação do composto hidroximetilado no nitrogênio 1 do anel triazólico. Sendo assim, outra rota foi proposta, na tentativa de formular diretamente o nitrogênio, reduzindo também o número de etapas, de cinco para quatro.

3.2.1.2.1 – Primeira rota proposta

O 3-amino triazol foi o material de partida escolhido para o desenvolvimento da rota de síntese dos derivados triazólicos por se tratar de um composto de baixo custo e que poderia ser rapidamente oxidado a grupamento nitro.

I - Oxidação de amino a nitrotriazol (T1)

Figura 27 – Reação de oxidação de grupo amina a nitro.

Adicionam-se, lentamente, 20 g (0,24 mol) do aminotriazol à solução de nitrito de sódio (19 g) em ácido sulfúrico concentrado (83 mL) a 0-5 °C. Água (600 mL) é adicionada após 20 minutos (evitando que a temperatura não exceda 5 °C). A mistura é agitada e, então, se adiciona, lentamente, à solução aquosa de 40% de nitrito de sódio (240 g) a 35-40 °C. A mistura é deixada à temperatura ambiente por 12 horas e, então, é extraída por acetato de etila. O solvente é removido por evaporação à pressão reduzida e a recristalização é feita com metanol. Ponto de fusão: 210 °C (RAO *et al.*, 1991).

Figura 28: Reação global da primeira etapa proposta para os derivados triazólicos.

II- Hidroximetilação do nitrogênio aromático (T2)

Figura 29 – Reação de hidroximetilação ao nitrogênio 1.

Solução 37% de formol (0,07 mol) é adicionada à solução (ou suspensão) de 0,05 mol de triazol em 30 mL de água e a mistura é agitada por 5 horas. O produto é extraído com acetato de etila ou removido por filtração. Deve-se evitar que o meio esteja básico, pois desloca reação para composto de partida (PEVZNER *et al.*, 1980).

III- Oxidação do álcool com PCC (T3)

Figura 30 – Reação de oxidação da hidroxila com PCC.

À solução de 430 mg (2 mmol) de PCC em diclorometano (10 mL) adiciona-se solução, em quantidades estequiométricas, do reagente em diclorometano (2 mL). A mistura é agitada por 22 horas à temperatura ambiente e, em seguida, refluxada por 1 hora. A mistura obtida é filtrada e o resíduo polimérico marrom formado é lavado duas vezes, com porções de 10 mL de diclorometano. As soluções combinadas de diclorometano são juntadas e evaporadas sob pressão reduzida. Ao resíduo adiciona-se éter (30 mL) e a mistura é agitada por cerca de 10 minutos. A solução é filtrada e o precipitado é lavado com éter (5 mL). Esta nova solução de éter é lavada com porções de 5 mL de solução 5% de NaHCO_3 até tornar a solução etérea incolor. A solução

é, então, secada com sulfato de magnésio e o éter é removido sob baixa pressão, fornecendo o produto (GHANDI, MASHAYEKHI, 2007).

IV- Ligação com semicarbazona

Figura 31 – Reação de formação da imina triazólica.

Utilizando balões de 10 mL, adiciona-se o triazol-3-nitro-1-carboxialdeído (10 mmol) à solução de água destilada e etanol, em proporção 2:5. A mistura é aquecida até o refluxo e, então, adiciona-se, sob agitação, a semicarbazona ou a tiossemicarbazona. A adição deve ser feita lentamente, até se chegar à mesma proporção (10 mmol). Os precipitados são filtrados e secados à pressão reduzida. Em seguida, são armazenados em dessecador de sílica-gel e pentóxido de difósforo (RANDO *et al.*, 2008)

V- Hidroximetilação do nitrogênio terminal da semicarbazona

Figura 32 – Etapa final da síntese do derivado triazólico.

Esta reação deve ser realizada em meio alcalino, adicionando-se o produto da primeira etapa ($5 \cdot 10^{-3}$ mol) com K_2CO_3 na proporção 1:1,5 em água (10 mL). Formaldeído (18 mL) é adicionado em 2 etapas, 9 mL no início da

reação e 9 mL após 7 horas de reação. O sistema deve ser mantido sob agitação e sob proteção da luz. O produto é lavado com metanol e recristalizado de metanol/água (6:0,1, v/v) (TROSSINI *et al.*, 2010).

3.2.1.2.2 – Segunda rota proposta

A segunda rota proposta para síntese dos derivados nitrotriazólicos envolveu a tentativa de formilação direta ao nitrogênio 1. Desta forma, a primeira etapa (nitração do grupamento amina ligado ao carbono 3) e as demais etapas são previstas para acontecerem da mesma forma. Sendo assim, a formilação substituiria as etapas II e III da primeira rota proposta. Quatro métodos foram planejados a fim de efetuar a reação descrita na Figura 33.

I- Formilação no nitrogênio 1 do 3-nitro triazol

Figura 33 – Reação de formilação.

MÉTODO 1 – Adicionam-se, lentamente, 2 mL de ácido fórmico a 2 mL de anidrido acético. A esta solução, é adicionada solução de 114 mg (1 mmol) do 3-nitro triazol em 2 mL de anidrido acético. A mistura é agitada ao longo da noite e é evaporada sob pressão reduzida. O resíduo sólido é dissolvido em 60 mL de acetato de etila e lavado 3 vezes com 10 mL de solução de bicarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de magnésio, o acetato de etila é evaporado, fornecendo o produto.

MÉTODO 2 – As quantidades e a metodologia são as mesmas do método anterior, exceto na adição do 3-nitro triazol, que é feita com a mesma quantidade de anidrido acético, no entanto, com 0,5 mL de trietilamina, que serve como catalisador, retirando o hidrogênio ligado ao nitrogênio 1. A

lavagem da solução de acetato de etila foi feita somente com água, ao invés de bicarbonato de sódio.

MÉTODO 3 – Dissolvem-se 114 mg (1 mmol) do 3-nitro triazol em 0,5 mL de trietilamina e adicionam-se 5 mL de ácido fórmico. A mistura é agitada ao longo da noite e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo sólido é dissolvido em 60 mL de acetato de etila e lavado 3 vezes com 10 mL de água. Após secagem da fase orgânica com sulfato de magnésio, o acetato de etila é evaporado, fornecendo o produto.

MÉTODO 4 – Solução do 3-nitro triazol (5 mmol), trietilamina (5 mmol), ácido *p*-toluenossulfônico (0,02 g) e 10 mL de metanoato de metila é refluxada por 24 horas e monitorada por cromatografia em camada delgada. Depois de resfriada à temperatura ambiente, a mistura reacional é concentrada. O resíduo é dissolvido em diclorometano (100 mL) e a solução é lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (2 alíquotas de 25 mL), seguida por água (2 alíquotas de 50 mL). A fase orgânica restante é secada com sulfato de magnésio e evaporada sob pressão reduzida (BHAT *et al.*, 2001).

3.2.1.3 – Derivados nitrobenzênicos e imidazólicos do NFOH

Devido à facilidade de síntese e à disponibilidade dos compostos, outros seis análogos do NFOH foram propostos, a fim de aumentar a série de análogos do NFOH. Os compostos a serem sintetizados são moléculas contendo anel imidazólico, porém sem a presença do grupo nitro, além de análogos contendo anel nitrobenzênico. Os primeiros, por não possuírem grupo nitro, não atuarão através do mecanismo de ação de redução do mesmo, mas podem ter ação nos dois outros alvos que os compostos designados para síntese neste projeto são potenciais inibidores. Da mesma forma, os análogos benzênicos não possuem ação sobre a síntese de ergosterol, no entanto são compostos com potencial para agir nos dois outros alvos de interesse. A cadeia lateral varia contendo oxigênio (semicarbazona), enxofre (tiosemicarbazona) ou nitrogênio (aminoguanidina), totalizando 3 bioisósteros para cada um dos compostos, ou seja, seis análogos do NFOH (Figura 34).

Figura 34 – Análogos do NFOH contendo anel imidazólico e nitrobenzênico.

A síntese destes compostos se dá em somente duas etapas, envolvendo as mesmas condições já descritas para as duas etapas finais da síntese dos derivados imidazólicos e triazólicos (Figura 35). As reações, por serem realizadas sob mesmas condições, foram feitas utilizando-se o sintetizador em paralelo disponível no nosso laboratório.

Figura 35 – Síntese dos análogos do NFOH.

Para os análogos nitrobenzênicos, uma outra metodologia, envolvendo síntese em fase sólida (sem gasto de solvente líquido) foi testada para a primeira reação. Esta metodologia apresenta as vantagens de apresentar baixo custo, rapidez e simplicidade de execução, além de rendimentos elevados, de acordo com duas opções de procedimento descritas por KIASAT e colaboradores.

Proposta 1: O composto carbonílico (1 mmol) é misturado junto à semicarbazida (ou análogo, 1,5 mmol), alumina básica (2 g) e poucas gotas de álcool *terc*-butílico em água. A reação é macerada em almofariz por, aproximadamente, 5 minutos. A reação é monitorada por CCD, utilizando-se éter/tetracloroeto de carbono. Ao se completar a reação, a mistura é transferida para um recipiente contendo 20 mL de metanol. O sólido é filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida (KIASAT *et al.*, 2007).

Proposta 2: A um almofariz adiciona-se o composto carbonílico (1 mmol), semicarbazida (ou análogo, 1,5 mmol) e sílica-gel (0,5 g). A mistura reacional é macerada com auxílio de um pistilo por, aproximadamente, 5 minutos. Monitora-se a reação com CCD, utilizando-se éter/tetracloroeto de carbono. Ao se completar a reação, a mistura é transferida para recipiente contendo 20 mL de metanol. O sólido é filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida (KIASAT *et al.*, 2005).

3.2.2 – Análise

3.2.2.1- Faixa de fusão

A determinação da faixa de fusão foi realizada em Aparelho Büchi, capilar, calibrado segundo a Farmacopéia Brasileira IV.

3.2.2.2 - Análise espectrométrica

As análises no infravermelho (IV) foram realizadas no espectrofotômetro FTIR Bomem e as análises de ^1H RMN E DE ^{13}C RMN, em espectrômetro Brücker 300 MHz, na FCF, USP.

3.2.2.3 - Espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas serão realizadas na Central Analítica do Instituto de Química, USP.

3.2.2.4 - Análise cromatográfica por CLAE

As análises por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu, com detecção no UV, disponível no LAPEN, com sistema eluente adequado.

3.2.2.5 - Microanálise

A análise elementar será realizada na Central Analítica do Instituto de Química, USP.

3.2.3 – Modelagem molecular

A Modelagem molecular foi utilizada como ferramenta a fim de verificar, para uma série contendo um total de 22 análogos do hidroximetilnitrofural, a facilidade de redução do grupo nitro. Este processo, conforme já citado, é importante na geração de radicais livres, dificilmente neutralizados pelo *T. cruzi*. Dentre os compostos escolhidos para o estudo, metade contém semicarbazona, enquanto metade contém enxofre no lugar do oxigênio (tiossemicarbazona). As moléculas variavam entre si dentro da série quanto ao anel aromático. Dentre os compostos escolhidos estão os quatro bioisósteros propostos para síntese neste projeto, além dos furanos, tiofenos, benzenos, entre outros (Figura 36).

Figura 36 – Análogos do hidroximetilnitrofural escolhidos.

Testaram-se diferentes metodologias de otimização molecular, além de cálculo de carga de ponto único, com o intuito de verificar qual se mostrou mais eficiente em um intervalo de tempo de processamento computacional viável, padronizando a metodologia a ser desenvolvida para todas as moléculas. As tentativas de cálculo envolveram metodologias semiempíricas (AM1 e PM3), *ab initio* (Hartree-Fock, HF) e de teoria de densidade funcional (DFT). Primeiramente todos os compostos foram desenhados separadamente e, em seguida, passaram pelo processo de minimização de energia por mecânica molecular, seguindo de otimização através do método semiempírico AM1, a fim de se obter confôrmeros com maior estabilidade (menor energia), denominados mínimos locais. O método PM3 também foi testado nesta etapa.

Uma vez otimizadas, as moléculas testadas passaram por cálculos de análise conformacional de Monte Carlo e Sistemática, a fim de observar qual se aproximava de um mínimo global de menor energia. Para esta fase, utilizaram-se somente os métodos semiempíricos, devido ao grande período de tempo que dura um cálculo deste utilizando métodos mais avançados (HF e DFT).

Finalmente, selecionaram-se os confôrmeros de menor energia e para estes foram testados novamente todos os métodos em cálculos de carga de ponto único (*single point*). Depois, superfícies eletrônicas de potencial eletrostático (MEP) foram calculadas considerando-se as condições padrão do programa quanto à isodensidade eletrônica de 0,0032 e/ua³, testando os

diferentes métodos e procurando o que apresentava a relação tempo/qualidade de resultados mais apropriada.

Através da observação dos MEP obtidos, juntamente com os valores de carga sobre os átomos próximos ao grupo nitro dos compostos selecionados, foi possível verificar qual análogo do hidroximetilnitrofural tem maior facilidade de sofrer redução no grupo nitro.

3.2.4 – Docking com dinâmica molecular

A fim de observar, através de um estudo teórico, o comportamento dos quatro bioisósteros do NFOH propostos neste projeto, além deste e outros três bioisósteros já sintetizados pelo nosso grupo (Figura 37) frente à cruzaina, está sendo realizado um estudo de simulação de dinâmica molecular de complexo ligante-receptor, a fim de verificar se o perfil de inibição destes compostos é similar ao de outros compostos descritos na literatura e que contém semi e tiossemicarbazona, e se o modelo de dinâmica molecular confirma os resultados observados em *docking* para o NFOH. Este trabalho foi realizado juntamente com o aluno de doutorado Euzébio G. Barbosa, do Laboratório de Quimiometria Teórica Aplicada, na Unicamp.

Figura 37 – Estrutura do NFOH e dos demais bioisósteros escolhidos para investigação.

A primeira etapa da realização de simulações de dinâmica molecular consistiu em buscar no PDB (*protein data bank*, www.pdb.org) uma estrutura cristalografada da cruzaina com ligante complexado. Para a escolha entre as existentes neste banco de dados, levaram-se em consideração as condições de definição da estrutura e as características do ligante cristalografado

juntamente com o receptor que tivesse características semelhantes às dos compostos propostos neste estudo. Após escolha da melhor estrutura (código PDB **1me4**), efetuou-se atribuição das protonações adequadas aos resíduos de aminoácidos presentes na estrutura da proteína, utilizando o programa PROPKA (BAS *et al.*, 2008), de acordo com o pH fisiológico. O campo de força AMBER para os átomos da proteína foram obtidos pelo *amber port*, acessório incorporado ao GROMACS 4.0.

Paralelamente, selecionou-se um ligante cuja estrutura cristalografada é conhecida (DORIGUETTO *et al.*, 2005) e está presente na série, o NFOH. A estrutura tridimensional do mesmo foi utilizada como padrão para o desenho das demais estruturas utilizando-se o programa HyperChem 7.5. Depois de todas as moléculas desenhadas, as mesmas foram otimizadas, utilizando o mesmo programa, por metodologia semiempírica do tipo AM1 (DEWAR *et al.*, 1985).

A estrutura resultante deste procedimento foi utilizada para fazer estudo inicial de *docking* no modelo de cruzaina. O programa Autodock 4.0 foi utilizado nesta etapa. Cinquenta conformações foram selecionadas, sendo que, destas, nove possuíam a orientação de interesse neste estudo, ou seja, de acordo com o mecanismo de ação já descrito em literatura (AGUIRRE *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2002; DU *et al.*, 2002; TROSSINI *et al.*, 2009), na qual o aminoácido CYS25 com carga formal negativa está disponível para o ataque ao carbono da carbonila (tiocarbonila) da semicarbazona (tiosemicarbazona) (Figura 38). Das nove que se aproximavam do mecanismo de ação proposto, a que apresentou menor energia, sendo assim a de maior estabilidade, foi escolhida como complexo de partida para a simulação de dinâmica molecular.

Figura 38 – Mecanismo de inibição de cruzaina proposto para compostos contendo tiossemicarbazonas (retirado de AGUIRRE *et al.*, 2004).

O ligante selecionado teve sua carga calculada pelo programa *antechamber* no qual se aplicou a metodologia de cargas AM1BCC. Os diedros apresentados na Figura 39 foram varridos separadamente com nível de teoria B3LYP aug-CC-PVDZ. A superfície de energia potencial resultante foi subtraída da energia do campo de força generalizado AMBER (GAFF) e à energia resultante foi ajustada uma função potencial torsional de forma a reproduzir o comportamento quântico.

Figura 39 – Representação dos diedros ajustados para campo de força AMBER.

As simulações foram realizadas com o modelo de solvente água TIP3P (MAHONEY, JORGENSEN, 2000). Optou-se por usar uma caixa cúbica, de dimensões suficientes para que se tivesse, no mínimo, 10 Å de distância do soluto às paredes. As fronteiras obedeceram a condições periódicas de contorno. No tratamento eletrostático, utilizou-se a malha de partículas de Ewald (PME, particle mesh Ewald) e as interações não-ligadas de van der Waals e Coulomb foram truncadas em 11 Å. A pressão foi mantida pelo barostato de Parrinello-Rahman a 1 atm. A temperatura (310 K) utilizada nas simulações foi controlada com o termostato de Berendsen. A integração foi realizada passo a passo, em intervalos de 2 fs.

As posições atômicas foram otimizadas em três passos: primeiro, o algoritmo de descida mais inclinada foi empregado como entrada para algoritmo de gradientes conjugados. O critério de convergência das otimizações foi que a força máxima que agisse sobre os átomos não superasse 50 N. Se esse critério de convergência não fosse atingindo dentro em 40.000 passos, o algoritmo LBFGS era empregado até a convergência. Realizou-se etapa de simulação de posições atômicas restringidas para que o solvente se arranjasse ao redor do complexo. Para a estabilização do volume do sistema empregou-se esquema de aquecimento gradual. Neste, o sistema foi simulado em 4 temperaturas, partindo de 50 K para 100 K, 200 K e 350 K por 20 ps cada. Em seguida, o sistema foi submetido à temperatura 310 K por 6000 ps. A estabilização do desvio médio quadrático das posições dos átomos da cadeia principal da proteína (RMSd, *root mean square deviation*) foi usada como critério para determinar a estabilização do sistema.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Síntese e análise dos protótipos

4.1.1 – Derivados Nitroimidazólicos

4.1.1.1 – *Primeira rota sintética*

4.1.1.1.1 – *Etapas I e II*

Partiu-se de 2 g (0,013 mol), o que equivale a 1/10 do descrito nos métodos, mantendo as proporções dos demais reagentes. O sólido marrom foi produzido após filtragem do sólido cinza (pouca quantidade) e tomando o devido cuidado para que a evaporação do solvente não aconteça em temperaturas acima de 60°C. Houve necessidade de utilização de bomba de alto vácuo para retirada total do solvente. Desta forma, a evaporação aconteceu de maneira bastante lenta. Após produção do sólido marrom, a segunda reação iniciou-se diretamente, seguindo o procedimento descrito anteriormente.

Não houve necessidade de purificação com 50% de etanol e o sólido não se mostrou amarelo-claro, talvez por ter sido utilizada pequena quantidade de carvão vegetal. O rendimento da reação foi considerado baixo (26,3%), no entanto o produto obtido pode ser considerado com alto grau de pureza, conforme o espectro de RMN apresentado na Figura 40.

Figura 40 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) relativo ao produto da reação de formação de I2.

Atribuições: 7,68 ppm (1H, H-2, s); 7,77 ppm (1H, H-5, s); 12,66 ppm (1H, H-6, s).

Com o surgimento da possibilidade de se partir do 4-carboxialdeído imidazol e como o rendimento da reação foi considerado baixo, além do que se tratava da segunda de dez etapas, optou-se pelo desenvolvimento da segunda rota sintética.

4.1.1.2. – Segunda rota sintética

4.1.1.2.1 – Etapa I

Na primeira tentativa de síntese do 4-carboxialdeído-1,3-imidazol protegido por tritila (IN1), adicionaram-se 2,1 g do material de partida e 4,25 g de cloreto de tritila (quantidades estequiométricas). A reação ocorreu de acordo

com o descrito na literatura e houve formação de 1,42 g (67,6%) de produto branco sólido após a última etapa de recristalização. Análise de CCD (Figura 41) utilizando mistura de 4:1 acetona e hexano não mostrou diferença de R_f entre a mancha do cloreto de tritila e a mancha do produto desejado, devido à polaridade ser semelhante entre o reagente cloreto de tritila (MP1, na figura 35) e o produto. No entanto, é possível observar que a mancha relativa ao triazol não aparece mais, indicando que este foi consumido durante a reação.

Figura 41 - Representação da placa de CCD para a reação de produção de IN1. MP1 = Cloreto de tritila (R_f = 1,00). MP2 = 4-carboxialdeído imidazol (R_f = 0,65). P = produto (R_f = 1,00).

Análise de RMN ^1H mostrou (Figura 42) grande concentração de sinais entre 7,60 e 7,00 ppm, em função dos 3 anéis aromáticos, o que dificultou a identificação precisa da formação de produtos. Não foi possível observar o hidrogênio relativo à amina aromática, indicando que a reação de substituição ocorreu, pois este hidrogênio pode não aparecer no espectro, como, a propósito, observado no espectro da reação de produção de IN1. O pequeno sinal em 9,61 ppm (área relativa de 0,16) é, provavelmente, relativo ao hidrogênio ligado ao carbono carbonílico do produto. Pela posição e valor das áreas, há indicações de que os sinais em 7,67 (área relativa 0,19) e 7,54 ppm (área relativa 0,23) estejam relacionados aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 e 5. O multipeto com área relativa de 1,65 (aproximadamente 15 vezes

maior, sendo este o número de hidrogênios da tritila), em 7,35 ppm, indicaria o quanto de tritila foi substituído no nitrogênio imidazólico, o que resultaria em rendimento de reação muito baixo.

Figura 42 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) relativo ao produto da reação de produção de IN1.

Na segunda tentativa de proteção do nitrogênio 1, o procedimento foi repetido, no entanto, foi colocado o dobro (2,5 mL – 18 mmol) de trietilamina, catalisador da reação. Além disso, a evaporação do DMF, solvente da reação, juntamente com o excesso de trietilamina foi feita sob pressão mínima e temperatura de 60 °C, tentando, assim, evitar a possível quebra na ligação realizada em altas temperaturas. Na primeira tentativa, a temperatura de evaporação foi de 90 °C. O sinal que sugere a quebra da ligação está em 6,30 ppm (Figura 42), sendo relativo ao hidrogênio ligado ao carbono alquílico do trifenilmetano. Este sinal tende a desaparecer caso a substituição desejada se realize com sucesso. Após o término da reação, foi feito novo espectro de RMN, que é apresentado na Figura 43. O sinal relativo a este hidrogênio do

trifenilmetano já se apresenta com área de 20% da área do sinal relativo ao hidrogênio ligado à carbonila (área relativa 1,00) e o multiplete parece dividir-se em duas bandas separadas.

Figura 43 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) relativo ao produto da segunda tentativa da reação de produção de IN1.

A fim de buscar melhor pureza do produto, efetuou-se uma tentativa de recristalização, utilizando solução de etanol 95% (v/v), dissolvendo-se todo o produto entre 60 °C e 70 °C e deixando-se resfriar em geladeira por uma noite. Após filtragem do material que recristalizou, realizou-se análise de RMN, novamente, obtendo-se o espectro apresentado na Figura 44. O sinal referente ao trifenilmetano já não se encontra e há divisão entre os sinais relativos aos hidrogênios em meta e em orto/para. Rendimento final: 56%. Faixa de fusão: 182-193 °C (Figura 45).

Figura 44 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) relativo a reação de produção de IN1, após recristalização.

Atribuições: 7,08-7,11 ppm (6H, H-10/H-10', m); 7,35-7,44 ppm (9H, H-9/H-9'/H-11, m); 7,63 ppm (1H, H-2, s); 7,76 ppm (1H, H-5, s); 9,70 ppm (1H, H-6, s).

Figura 45 – Gráfico de faixa de fusão relativo à reação de produção de IN1, após recristalização.

A Figura 46 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C , que confirma o sucesso na realização da reação, ao apresentar sinal em 185,9 ppm, referente ao carbono mais desblindado (ligado à carbonila). Os três sinais entre e 142 e 141 ppm referem-se aos três carbonos do anel imidazólico, enquanto que os presentes entre 129 e 128 ppm referem-se aos aromáticos do grupamento tritila. O carbono em 76,1 ppm refere-se ao único carbono alquílico, 1, deste substituinte.

Figura 46 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) relativo à reação de produção de IN1, após recristalização.

Atribuições: 76,1 ppm (C7); 128,0-130,0 ppm (C8-C11); 141,1 ppm (C2); 141,2 ppm (C4); 142,0 ppm (C5); 185,8 ppm (C6).

Na tentativa de aumentar o rendimento da reação, realizou-se uma terceira tentativa utilizando as mesmas quantidades de reagentes, porém substituindo o solvente de DMF para diclorometano, pela maior facilidade de evaporação, sem a necessidade de aumento de temperatura ou de valores de pressão muito baixos. Após terminada a reação, o espectro de RMN mostrou o mesmo perfil da última reação (Figura 47), apresentando valores de áreas

relativas ainda mais indicativos de maior pureza do produto. O rendimento também foi o melhor entre todas as tentativas, 81,2%, sendo esta a metodologia a ser seguida.

Figura 47 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) relativo à terceira tentativa de produção de IN1.

Atribuições: 7,11-7,15 ppm (6H, H-10/H-10', m); 7,41-7,48 ppm (9H, H-9/H-9'/H-11, m) 7,66 ppm (1H, H-2, s); 7,79 ppm (1H, H-5, s); 9,73 ppm (1H, H-6, s).

4.1.1.2.2 – Etapa II

O nitrato de *n*-propila é produzido através da nitração do 1-propanol, através da formação do cátion nitrônio na reação entre o ácido nítrico e o sulfúrico. Este cátion sofre o ataque do oxigênio do álcool primário, gerando o éster nitrado (Figura 48).

Figura 48 – Mecanismo de reação da formação do nitrato de *n*-propila.

Seguindo o procedimento anteriormente descrito, o PrO-NO₂ (IN2) foi produzido partindo de 0,6 g de 1-propanol e as quantidades equivalentes de ácido sulfúrico e ácido nítrico. O produto foi obtido com sucesso, conforme pode ser observado pelo espectro de RMN ¹H (Figura 49). Os sinais relativos, descritos a seguir, estão de acordo com o observado na literatura. O rendimento não foi calculado, pois o produto não foi isolado de todo o diclorometano, uma vez que o composto é descrito como sendo muito instável, podendo ser utilizado desta forma na reação com o produto da reação IN1.

Atribuições: 0,83 ppm (3H, H-3, t); 1,55 – 1,62 ppm (2H, H-2, m); 4,35 ppm (2H, H-1, t); 5,56 ppm (diclorometano que não foi separado do produto líquido).

A reação foi feita em quantidades estequiométricas para 1 mmol do reagente protegido. Não houve formação do produto de interesse. O espectro do produto antes de ser recristalizado (Figura 50) apresenta diversos sinais em campos altos, podendo se referir a hidrogênios ligados a carbonos alquílicos. Após a recristalização, o RMN apresenta resultado distante do esperado (Figura 51). Novamente aparecem sinais em campos altos, o que poderia sugerir a ligação de grupo *n*-butila. Como o hidrogênio ligado ao carbono carbonílico está mais disponível para ser retirado pelo *n*-BuLi e, dessa forma, o

carbânion não se forma no carbono de interesse (carbono-2 do anel imidazólico), uma nova etapa foi introduzida, originando nova rota sintética, na qual as duas primeiras etapas envolveriam duas proteções (aos hidrogênios ligados ao nitrogênio 1 do anel imidazólico e ao carbono carbonílico).

Figura 50 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo ao produto da tentativa da terceira etapa da síntese dos derivados imidazólicos.

Figura 51 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo ao produto recristalizado da terceira etapa da síntese dos derivados imidazólicos.

4.1.1.3. – Terceira rota sintética

4.1.1.2.3 – Etapa I

A proteção foi elaborada através de formação de cetel, utilizando-se etilenoglicol (Figura 52). Optou-se por fazer a proteção do aldeído antes da proteção ao nitrogênio aromático devido ao fato de o grupo tritila fornecer aumento muito grande em termos de lipofilicidade para a molécula, dificultando a separação do composto de interesse, duplamente protegido.

Figura 52 – Mecanismo da reação de formação do cetal.

Nas diversas tentativas de proteção do hidrogênio ligado ao carbono carbonílico através da reação com etilenoglicol em meio de um ácido fraco de Lewis produzindo um cetal não houve êxito. Uma dificuldade que surgiu nesta reação foi a de isolar o produto, uma vez que o acetato de etila e outros solventes escolhidos, tais como éter etílico, não foram eficientes em extrair o produto sólido da solução de tolueno. Desta forma, o tolueno passou a ser evaporado após o término da reação. O resíduo sólido foi, então, dissolvido em acetato de etila para então ser lavado 3 vezes com pequena quantidade de solução saturada de bicarbonato de sódio.

Tentou-se mudar o ácido de Lewis utilizando I_2 sólido, variando-se o tempo de reação, aumentando-se a quantidade de etilenoglicol colocada, mas em todos os espectros de RMN o sinal em aproximadamente 9,7 ppm foi identificado, indicando que o hidrogênio ainda estava presente. Além disso,

sinais do cetal, que deveriam aparecer em torno de 4 e 5 ppm, não foram observados em qualquer das análises.

4.1.2 – Derivados Nitrotriazólicos

4.1.2.1. – *Primeira rota sintética*

4.1.2.1.1 – *Etapa I*

O mecanismo desta reação (Figura 53) envolve a nitroação através da formação do cátion nitrosônio, na reação de uma molécula de nitrato de sódio com duas de ácido sulfúrico. Este cátion reage com o nitrogênio da amina, e após rearranjo e deslocamento do equilíbrio tautomérico formado, promove a formação do cátion diazônio, que sofre novo rearranjo, com saída de gás nitrogênio e formação do carbocátion que sofre ataque do ânion nitrato proveniente do nitrato de sódio, gerando o composto de interesse de acordo com a reação global descrita na Figura 54.

Figura 53: Mecanismo da reação de oxidação do grupamento amina a nitro. Esquema retirado de: <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/amine2.htm>

Figura 54: Reação global de formação do 3-nitrotriazol.

A fim de testar e verificar os problemas e vantagens da reação I (nitrosação do grupo amina), a primeira tentativa desta foi efetuada utilizando-se 10% da massa descrita, ou seja, 2 g, mantendo as proporções para os demais reagentes. Alguns problemas foram observados durante o desenvolvimento da reação. O aumento de temperatura durante a adição de água foi muito grande, sendo, portanto, difícil controlar a variação para máximo de 5 °C. Esta ultrapassou, em alguns momentos, este valor, mesmo com adição muito lenta de água.

Depois de obtido o sólido branco, suposto produto da reação de formação de T1, realizou-se teste de faixa de fusão, obtendo-se valor coerente com o da literatura (210 °C), ficando entre 204-211°C (Figura 55, direita). Desenvolveu-se placa de CCD, a fim de comparar o tempo de corrida do material de partida (amina) e do produto (nitro) e foi possível observar diferenças nas manchas obtidas (Figura 55, esquerda). A fase móvel que apresentou resultado mais satisfatório foi a de 4 volumes de metanol para 1 de diclorometano.

Assim, realizou-se análise de RMN ^1H , utilizando como solvente DMSO- d_6 e caracterizando-se o produto de interesse (Figura 56). O sinal relativo ao hidrogênio ligado ao carbono 5 pode ser observado em 8,80 ppm (área=1,14), enquanto que o hidrogênio ligado ao nitrogênio 1 é observado em 15,25 ppm (área=1,00). As áreas dos sinais estão muito próximas, indicando a obtenção do produto desejado.

Figura 55 – À esquerda: representação da placa de CCD para a reação de formação de T1. MP= 3-Amino triazol. P= 3-Nitro triazol (T1). À direita: gráfico de faixa de fusão relativo à reação de produção de T1.

Recristalizou-se o produto de metanol e a massa obtida foi de 1,84 ($\pm 0,01$)g, o que corresponde a rendimento de aproximadamente 56,8%.

Figura 56 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo ao produto T1.

Atribuições: 15,26 ppm (1H, H-1, s); 8,89 ppm (1H, H-5, s).

4.1.2.1.2 – Etapa II

Na primeira tentativa, de hidroximetilação no nitrogênio 1 do 3-nitro-1,2,4-triazol, seguiu-se o método da literatura apresentado anteriormente (PEVZNER *et al.*, 1980), porém partindo-se de 1,14 g de T1, utilizando proporção estequiométrica dos demais reagentes. Observou-se que o reagente não se solubilizou inicialmente, em água, porém aumentou sua dissolução ao colocar o formaldeído, dissolvendo-se completamente 15 minutos após agitação. Após 5 horas, e a cada hora seguinte, desenvolveram-se placas de CCD, a fim de verificar os produtos presentes, permitindo observar o término da reação. A fase móvel que apresentou melhor resultado foi a de hexano e acetona, 1:1. A Figura 57 apresenta a placa após 5 horas somente, uma vez que as outras quatro apresentaram o mesmo perfil, o que

indica que após este tempo a reação entrou em equilíbrio e há duas manchas, uma delas diferente do material de partida. Ao final da evaporação, obteve-se solução de cor amarela, que, provavelmente, se tratava de mistura de acetato de etila (solvente usado na extração final) e formol (usado na reação). Deixando-se o sistema ligeiramente aberto durante alguns dias, o mesmo adquiriu caráter sólido, porém com massa muito maior do que poderia ser obtida em caso de 100% de rendimento da reação, provavelmente, por ser material higroscópico, ou por ainda haver quantidade pequena de solvente.

Figura 57 – Representação da placa de CCD obtida para a reação de produção de T2. MP= Material de partida (T1); P = produto (T2).

Na segunda tentativa, adicionaram-se 2,3 g (0,02 mol) do triazol e formaldeído em excesso (0,1 mol), a fim de tentar deslocar a reação no sentido de formação de maior quantidade de produto. Deixou-se a reação por cinco horas, tempo no qual a anterior mostrou estar em equilíbrio. A reação foi descartada pelo fato de que se observou, posteriormente, contaminação no formol utilizado.

Efetuuou-se a terceira tentativa, partindo-se de 1,75 g do nitrotriazol, 9,2 mL de água (proporção de acordo com o procedimento) e 6 mL (0,06 mol) de formaldeído, adicionados em duas etapas, conforme o procedimento da literatura descreve, ou seja, 4 mL no início da reação e 2 mL após 3 horas e meia de agitação, na tentativa de deslocar com mais eficiência o equilíbrio no sentido de formação do produto hidroximetilado. Após 5 horas, o material foi

extraído com acetato de etila e rotaevaporado. Formou-se líquido amarelo, semelhante ao obtido na segunda tentativa, que, após alguns dias, solidificou-se. A massa do produto obtido foi de 1,93 g, correspondente a rendimento de, aproximadamente, 94%. No entanto, por se tratar de reação em equilíbrio, necessitava de recristalização, conforme podemos observar no espectro (Figura 58), no qual se observa grande quantidade de produtos de possíveis reações laterais.

Figura 58 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo à reação de produção de T2.

Recristalizaram-se 1,8 g do produto, necessitando de 45 mL de 1,2-dicloroetano, aquecido até 70 °C. A solução continuou com corpo de fundo de cor amarelo-clara, que foi filtrado e analisado por RMN ^1H . Quando resfriada, constatou-se depósito de cristais incolores na solução, que foram analisados por RMN ^1H . Como se obtiveram resultados análogos e espectros praticamente iguais (Figuras 59 e 60), ambos representando o produto

hidroximetilado de interesse, pode-se concluir que tratam-se de polimorfos, e não há necessidade de total solubilização durante a recristalização, o que inclusive interferirá no rendimento final do processo.

Os espectros mostram um duplete em 5,60 ppm, relativo aos dois hidrogênios ligados ao carbono 6 (área relativa 2,19), um triplete em 7,50 ppm, relativo ao hidrogênio da hidroxila (área relativa 1,06) e um singlete em 8,96 ppm (área relativa 1,00), correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono 5 (localização semelhante à encontrada em T1). Além disso, determinou-se a faixa de fusão para ambos os sólidos, chegando a valores iguais (72,1 °C - 75,3 °C).

Figura 59 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo ao sólido filtrado durante a recristalização do produto T2.

Atribuições: 8,96 ppm (1H, H-5, s); 7,52 ppm (1H, H-7, t, $J = 7,95$ Hz), 5,60 ppm (2H, H-6, d, $J = 7,95$ Hz).

Figura 60 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo ao produto recristalizado de T2.

Atribuições: 8,96 ppm (1H, H-5, s); 7,52 ppm (1H, H-7, t, J = 7,74 Hz), 5,60 ppm (2H, H-6, d, J = 6,66 Hz).

A soma das massas dos recristalizados foi de 1,34 g, o que corresponde a rendimento de, aproximadamente, 63,4%.

4.1.2.1.3 – Etapa III

A reação de oxidação utilizando-se o PCC é uma reação de oxidorredução na qual se observa a mudança de cor do composto cromado, quando este sofre redução, reduzindo número de oxidação do cromo de +6, cor laranja para +4, cor verde. Os dois elétrons que promovem esta redução são originados do carbono que sofre oxidação, de zero até +2 (Figura 61).

Figura 61 – Reação global da oxidação utilizando PCC.

A primeira tentativa de oxidação do grupo hidroxila a carbonila foi realizada conforme o procedimento descrito na seção 3.2.1.2. Alguns problemas foram observados nesta reação de produção de T3. O reagente (278 mg, 2 mmol) pouco se dissolveu em diclorometano (2 mL), enquanto que 10 mL foram suficientes para solubilizar os 2 mmol de PCC. No entanto, a reação foi descartada, pois houve suspeita de oxidação total dos produtos após refluxo de uma hora, devido ao aparecimento de um sólido preto e totalmente insolúvel em diclorometano.

O procedimento que foi seguido e retirado da literatura (GHANDI, MASHAYEKHI, 2007) para esta reação é um dos padrões para reações de oxidação utilizando PCC. Por essa razão, ajustes a estes procedimentos deverão ser feitos. Para a segunda tentativa, aumentou-se a quantidade de diclorometano, de 2 mL para 15 mL, a fim de melhor dissolver o reagente hidroximetilado. No restante, a reação foi realizada da mesma maneira. Após duas horas de agitação, o sistema já começou a adquirir novamente cor escura, se intensificando após 22 horas de agitação e uma hora de refluxo. Com o produto desta reação desenvolveu-se placa de CCD, comparando com o material de partida (Figura 62). Três manchas distintas foram observadas, uma na mesma altura do material de partida, uma que não foi arrastada pela fase móvel (composta de 4 volumes de acetona para cada 1 de hexano) e a última que foi arrastada mais rapidamente do que as duas anteriores. Como a mistura mostrou-se muito solúvel em solventes polares, esta foi lavada com metanol e evaporada, gerando quantidade muito pequena de sólido verde-escuro (indicando redução do íon cromato), posteriormente analisado por RMN ^1H .

Figura 62 – Representação da placa de CCD obtida para a produção de T3.
MP= Material de partida (T2). P= Mistura obtida após 22 horas de reação.

O espectro apresentado para esta reação (Figura 63) apresenta três sinais relativos somente à piridina (hidrogênios ligados a carbonos 2 e 6 em 8,73 ppm; ligados a carbonos 3 e 5 em 8,03 ppm e ligado a carbono 4 em 8,57 ppm), o que indica que não se conseguiu isolar o composto, nem sequer observar a ocorrência de reação, provavelmente pelo fato de o metanol, em temperatura ambiente, dissolver pouco os produtos de interesse. Sendo assim, efetuou-se tentativa de lavagem do resíduo escuro que sobrou utilizando-se éter etílico. Após evaporação do solvente, não houve aparecimento de sólido. Nova pesquisa bibliográfica se fez necessária a fim de procurar nova metodologia para esta reação.

Figura 63 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, D_2O , δ , ppm) relativo à reação de produção de T3 (piridina como produto indesejável).

Atribuições: 8,02 ppm (2H, H-1, s); 8,57 ppm (1H, H-2, s), 8,73 ppm (2H, H-3, s).

Após procura por nova metodologia, foi diminuído o tempo de reação para 5 horas, uma vez que esta oxidação é descrita na maioria dos casos como reação rápida (GARCÍA-GÓMEZ, MORETO, 2001; TRETYAKOV *et al.*, 2001), e que não precisa de refluxo para acontecer. Tentou-se adicionar sulfato de magnésio (ZAMPONI *et al.*, 2003), uma vez que este sal impede a formação de sólido de difícil extração. Sendo assim, tentou-se novamente esta reação, adicionando-se a menor quantidade possível de diclorometano seco que dissolvesse 0,01 mol de PCC utilizado e o triazol hidroximetilado (0,008 mol), desta vez, adicionando MgSO_4 (0,0025 mol). Após deixar a reação sob agitação por 5 horas, o solvente foi filtrado e o sólido escuro resultante foi lavado com dois solventes diferentes, éter etílico e acetato de etila, a fim de observar a eficácia destes na extração dos produtos. O acetato de etila

mostrou-se eficaz na extração e nova CCD foi realizada, observando-se resultado semelhante ao da reação na segunda tentativa (Figura 54). No entanto, observou-se que a mancha inferior migrou pouco e apresentou-se espalhada na região inferior da placa. A fim de tentar separar estas manchas, juntou-se o extraído por acetato de etila e o filtrado (em diclorometano) para fazer uma coluna. Ao separar a mancha superior e intermediária, realizou-se espectro de RMN do sólido correspondente à mancha superior, que é apresentado na Figura 64.

Figura 64 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 , δ , ppm) relativo a reação de produção de T3.

Este espectro ainda mostrou-se distante do que deveria ser observado para o produto desejado, sendo assim a reação foi realizada novamente a fim de se observar se o mesmo comportamento se repetiria. Utilizou-se, para esta quarta tentativa, o dobro dos reagentes, exceto para o sulfato de magnésio, que foi empregado na mesma quantidade. Após 5 horas de agitação, a solução foi filtrada e o produto foi lavado com 4 porções de 50 mL de acetato de etila,

evaporando-se os solventes. O espectro observado (Figura 65) é muito semelhante ao da reação anterior.

Figura 65 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo a reação de produção de T3.

Neste espectro observa-se, novamente, presença de piridina e por essa razão, procedeu-se à lavagem com solução de sulfato de cobre II, a fim de complexá-la com este sal e retirá-lo da fase orgânica (a mistura de sólidos foi dissolvida novamente em acetato de etila). A mudança de cor da solução para verde indica redução do cromo. Outro espectro apresenta o desaparecimento dos sinais relativos à piridina (Figura 66).

Figura 66 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo a reação de produção de T3.

A observação destes espectros permite-nos dizer que há possibilidade de se tratar de mistura do produto desejado e do álcool de partida. A fim de tentar separá-los, efetuou-se recristalização com etanol. Após esta recristalização, o espectro (Figura 67) mostrou que a reação desejada não ocorreu, pois há um sinal (que aparece na figura anterior, porém não é identificado) em 15,25 ppm, que se refere ao nitrogênio 1 do 3-nitro-1,2,4-triazol, material de partida da segunda reação (T1). O sinal em 8,86 ppm refere-se ao hidrogênio ligado ao carbono 5 do triazol.

Figura 67 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo ao produto T3 após recristalização, indicando formação de produto indesejado.

A possibilidade de quebra da ligação carbono-nitrogênio fica mais bem evidenciada ao se observar os espectros de carbono para o 3-nitro-1,2,4-triazol juntamente com o produto da segunda e da terceira reação (Figura 68, tabela I). O que se observa no final da tentativa de oxidação do álcool são os compostos presentes em equilíbrio na reação de hidroximetilação do 3-nitro-1,2,4-triazol. O único sinal que não se encontra nos espectros dos produtos das primeiras reações aparece em 62,59 ppm. O sinal do carbono 3 do composto hidroximetilado (T2, Figura 68) não foi identificado pelo fato de a concentração da amostra não ser suficiente, considerando-se que se trata de um carbono quaternário.

Figura 68 – Espectros de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativos às reações T1 (superior, esquerda), T2 (superior, direita) e ao produto da quarta tentativa da reação T3 (abaixo).

Tabela I - Atribuições de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) para os compostos T1, T2 e T3

	C3 (ppm)	C5 (ppm)	C6 (ppm)
T1	162,85	145,97	
T2		146,81	73,80
T3	162,87	146,12 (T2) e 145,99 (T1)	73,19

Outras tentativas de síntese utilizando PCC também foram testadas e são relacionadas como segue:

- 1- Reação com adição de PCC em 5 etapas (1/5 da massa total a cada duas horas), seguindo a metodologia descrita anteriormente (com adição de sulfato de magnésio e refluxo a fim de melhor solubilizar o reagente em diclorometano), deixando a reação por mais 12 horas.
- 2- Reação em fase sólida, utilizando-se almofariz e pistilo, macerando a mistura de 1 mmol do triazol hidroximetilado, 1,5 mmol de PCC, 1,5 mol de acetato de sódio, 10 mL de diclorometano e 0,5 g de sílica-gel. À mistura, adicionaram-se 100 mL acetato de etila, filtrou-se e lavou-se com 3 porções de 10 mL de água.
- 3- Reação em fase sólida, da mesma forma que na tentativa anterior, porém colocando por 2 minutos em microondas convencional.
- 4- Reação *in situ*, adicionando-se ao sistema reacional de oxidação por PCC a tiossemicarbazida e semicarbazida, na tentativa de solucionar problemas de possível instabilidade da amida que se formaria e poderia ser degradada durante o *workup* da reação. Desta forma, se houvesse esta formação, o carbono contendo a carbonila já seria atacado pela semi ou tiossemicarbazida, efetuando-se a reação que estava prevista para a próxima etapa.

Em nenhum dos quatro métodos citados houve a formação do composto de interesse. Nas três primeiras metodologias, obtiveram-se produtos dentro do mesmo padrão mostrado na Figura 57 e na tabela I, ou seja, parte das moléculas retornou ao produto obtido na primeira etapa e a outra parte não reagiu. A última metodologia não forneceu o produto de interesse. O espectro obtido mostrou a presença no grupo hidroxila do reagente, indicando que não houve reação. O resultado da placa de CCD após 20 horas de reação, sem mudanças com relação à placa feita nos primeiros minutos de reação, comprova que não houve reação (Figura 69).

Figura 69 – Representação da placa de CCD obtida para a tentativa de reação *in situ*, utilizando PCC. T= Material de partida (T2). TS= Tiossemicarbazida. M= Mistura obtida após 20 horas de reação.

Com base nos resultados obtidos, a impossibilidade de formação do grupamento amida pode ser explicada pela instabilidade inerente a este composto. Quase todas as tentativas de procedimento possíveis utilizando PCC foram esgotadas. Outras possibilidades, tais como a descrita por NODE e colaboradores (1990), correspondente à formação de uma amida cíclica utilizando o PCC e $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ poderiam trazer sucesso a esta etapa do projeto. Outros métodos de oxidação ainda podem ser efetivos nesta fase, tais como a oxidação de Swern (CHACUN-LEFÈVRE *et al.*, 2001) ou utilização de compostos com iodo hipervalente (TOHMA, KITA, 2004).

4.1.2.2. – Segunda rota sintética

Dos quatro métodos propostos para formilação direta ao nitrogênio 1 do 3-nitro triazol, três foram executados, com uma tentativa para cada. O quarto método não foi aplicado pois não foi possível adquirir o metanoato de metila a tempo. Os resultados obtidos para os outros métodos são apresentados a seguir:

MÉTODO 1: Depois de evaporado o acetato de etila, o produto foi levado para RMN, que mostrou como resultado o 3-nitrotriazol (Figura 70), ou seja, não se formou o produto de interesse.

Figura 70 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo à tentativa de formilação de T1 pelo método 1.

MÉTODO 2: A adição de trietilamina à solução do 3-nitrotriazol em anidrido acético provocou mudança quase instantânea de cor da solução, de amarelo claro para escuro, e, após 1 minuto de agitação, para vermelho. Esta solução foi adicionada à mistura de anidrido acético e ácido fórmico. No entanto, o produto obtido, de cor também vermelha, sugere que a reação possa ter acontecido antes da adição à mistura entre o ácido fórmico e o anidrido acético, e que a formilação de interesse não tenha acontecido.

O espectro de RMN (Figura 71) apresenta o sinal referente ao hidrogênio ligado ao carbono 5 em 8,88 ppm. Além disso, apresenta, em 6,29 ppm, um sinal de área três vezes maior que o citado anteriormente.

Supondo que a reação tenha acontecido entre o anidrido acético e o 3-nitrotriazol, catalisada por trietilamina, pode-se sugerir que ocorreu acetilação no nitrogênio 1 e este sinal seria relativo aos três hidrogênios ligados ao carbono 7 (Figura 60). Outras análises se fazem necessárias para confirmar esta hipótese.

Supondo que a hipótese levantada seja comprovada, propos-se o terceiro método, sugerindo que seria possível a reação direta entre o ácido fórmico e o 3-nitrotriazol, catalisado por etilamina.

Figura 71 - Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm) relativo à tentativa de formilação de T1 pelo método 2.

Atribuições: 8,88 ppm (1H, H-5, s); 6,29 ppm (1H, H-3, s).

MÉTODO 3: Analogamente ao método 1, não houve sucesso na formilação, conforme é mostrado na figura 72, em que se identifica, novamente, o material de partida. Este resultado pode indicar a necessidade da reação de um anidrido na formilação.

Figura 72 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo à tentativa de formação de T1 pelo método 3.

Para a próxima tentativa - juntamente com a de formação pelo método 4 - a fim de otimizar o método 2, seria interessante a utilização de excesso de ácido fórmico na primeira mistura com anidrido acético, a fim de que realmente se formasse o anidrido fórmico acético com maior rendimento possível. Além disso, seria importante que a adição fosse feita com o nitrotriazol em solução de trietilamina e ácido fórmico (substituindo o anidrido acético), ou somente com o catalisador (o material de partida é solúvel em trietilamina), impedindo que ocorra a reação indesejada observada com o método 2.

4.1.3 – Derivados nitrobenzênicos e imidazólicos

A primeira etapa de síntese dos análogos nitrobenzênicos e imidazólicos foi efetuada com sucesso, utilizando o sintetizador em paralelo e as condições anteriormente descritas. Os rendimentos, códigos das amostras e faixas de fusão encontram-se na tabela II, enquanto os espectros de RMN entre as figuras 73 e 84.

Tabela II – Rendimentos das reações de formação dos análogos nitrobenzênicos e imidazólicos do NFOH

Anel aromático	Cadeia Lateral	Código	Rendimento teórico (%)	Faixa de fusão (°C)
3-nitrobenzeno	Semicarbazida	BZO	81,2	227,3 – 233,5
Imidazol	Semicarbazida	ISNO	33,1	212,0 – 231,5
3-nitrobenzeno	Tiossemicarbazida	BZS	75,2	186,5 – 205,9
Imidazol	Tiossemicarbazida	ISNS	69,8	236,0 – 240,8
3-nitrobenzeno	Aminoguanidina	BZN	62,0	259,5 – 264,3
Imidazol	Aminoguanidina	ISNN	51,2	271,3 – 280,0

Na reação de formação do BZO, observa-se excesso de semicarbazida, conforme mostra o espectro de ^1H (sinais em 9,78, 8,18 e 6,54 ppm, sendo que o segundo, um tripleto no caso do reagente, está sobreposto a um dos sinais do produto de interesse, Figura 73) e o de ^{13}C (sinal em 157,02 ppm, Figura 74). Tal fato diminuirá, certamente, o rendimento total do processo.

Figura 73 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo à reação de formação do BZO.

Atribuições: 6,64 ppm (2H, H-11, s); 7,67 ppm (1H, H-5, t, $J = 7,32$); 7,96 ppm (1H, H-7, s); 8,18 ppm (1H, H-6, s); 8,55 ppm (1H, H-4, d, $J = 1,47$); 8,69 ppm (1H, H-2, s) 10,47 ppm (1H, H-9, s).

Figura 74 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) relativo à reação de formação do BZO.

Atribuições: 121,14 ppm (C2); 123,65 ppm (C4); 130,52 ppm (C7); 133,18 ppm (C1); 137,27 ppm (C6); 137,46 ppm (C5); 148,85 ppm (C3); 158,27 ppm (C10).

Na formação do INSO, há também, porém com áreas menores, sinais referentes à semicarbazida, o que provocará diminuição no rendimento teórico calculado. Por isso, os sinais referentes a este reagente em excesso aparecem somente no espectro de hidrogênio (6,53, 6,61 e 8,78 ppm, Figura 75).

Figura 75 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo à reação de formação do INSO.

Atribuições: 6,77 ppm (2H, H-10, s); 7,85 ppm (1H, H-2, s); 7,80 ppm (1H, H-4, s); 9,19 ppm (1H, H-6, s); 10,62 ppm (1H, H-8, s).

Figura 76 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) relativo à reação de formação do ISNO.

Atribuições: 118,15 ppm (C2); 125,51 ppm (C5); 129,48 ppm (C6); 135,34 ppm (C4); 156,51 ppm (C9).

O excesso de tiosemicarbazida na reação BZS é provavelmente maior do que a metade do produto, de acordo com as áreas obtidas no espectro de hidrogênio. Os sinais referentes ao produto em excesso aparecem tanto no RMN ^1H (4,49, 7,20 e 8,20 ppm, sendo que o último está localizado na região de um sinal do produto, Figura 77) quanto no ^{13}C (181,66 ppm, Figura 78). Não é possível definir, através da observação do espectro, a multiplicidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado ao carbono 6.

Figura 77 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo à reação de formação do BZS.

Atribuições: 7,52 ppm (2H, H-11, s); 7,69 ppm (1H, H-5, não identificado); 8,22 ppm (1H, H-6, não identificado); 8,15 ppm (1H, H-7, s) 8,61 ppm (1H, H-2, s); 8,65 ppm (1H, H-4, s); 11,59 ppm (1H, H-9, s).

Figura 78 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) relativo a reação de formação do BZS.

Atribuições: 121,81 ppm (C2); 124,41 ppm (C4); 130,60 ppm (C7); 133,97 ppm (C1); 136,60 ppm (C6); 140,49 ppm (C5); 148,85 ppm (C3); 178,82 ppm (C10).

Os espectros de ^1H e ^{13}C relativos ao ISNS não mostram sinal relativo a outro reagente. Desta forma, o rendimento teórico está bem próximo do real.

Figura 79 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo à reação de formação do ISNS.

Atribuições: 7,98 ppm (2H, H-10, s); 8,34 ppm (1H, H-4, s); 8,41 ppm (1H, H-2, s); 9,23 ppm (1H, H-6, s); 11,77 ppm (1H, H-8, s); 14,91 ppm (1H, H-1, s).

Figura 80 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) relativo à reação de formação do ISNS.

Atribuições: 120,45 ppm (C2); 128,44 ppm (C5); 129,84 ppm (C6); 135,95 ppm (C4); 179,15 ppm (C9).

O compostos BZN e ISNN não apresentam características de presença de material de partida (aminoguanidina) nos espectros de ^1H e ^{13}C . Característica interessante é a sobreposição entre dois sinais nos espectros de ^1H . No caso do BZN há sobreposição entre o sinal do hidrogênio ligado ao carbono 7 e os dois ligados ao nitrogênio terminal. No caso do ISNN, os sinais dos mesmos hidrogênios ligados ao nitrogênio terminal coincidem com o sinal do hidrogênio ligado ao carbono 4. Não há possibilidade de definir, pelo espectro, a multiplicidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado ao carbono 6.

Figura 81 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo à reação de formação do BZN.

Atribuições: 7,92 ppm (2H, H-11, s); 7,75 ppm (1H, H-5, dd, $J=1,47$); 8,29 ppm (1H, H-6, não identificado); 7,92 ppm (1H, H-7, s) 8,76 ppm (1H, H-4, d, $J=1,56$); 8,33 ppm (1H, H-2, s); 12,19 ppm (1H, H-9, s).

Figura 82 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) relativo à reação de formação do BZN.

Atribuições: 122,21 ppm (C2); 125,05 ppm (C4); 130,66 ppm (C7); 134,29 ppm (C1); 135,82 ppm (C6); 145,13 ppm (C5); 148,39 ppm (C3); 156,13 ppm (C10).

Figura 83 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) relativo à reação de formação do BZN.

Atribuições: 7,99 ppm (2H, H-10, s); 7,99 ppm (1H, H-4, s); 8,22 ppm (1H, H-2, s); 9,20 ppm (1H, H-6, s); 12,37 ppm (1H, H-8, s).

Figura 84 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) relativo à reação de formação do ISNN.

Atribuições: 121,18 ppm (C2); 128,94 ppm (C5); 133,86 ppm (C6); 136,57 ppm (C4); 156,09 ppm (C9).

A etapa final de síntese dos derivados nitrobenzênicos não foi realizada a tempo. De qualquer forma, os compostos já sintetizados podem ser ensaiados e comparados com os análogos do NF e do NFOH, já sintetizados no nosso laboratório e testados frente à cruzaina (dados não publicados).

A síntese destes seis novos compostos, somados aos seis hidroximetilados, adiciona doze análogos do NFOH aos seis já sintetizados, contendo semicarbazona, tiosemicarbazona e aminoguanidina ligados aos anéis furânicos e tiofênicos. Depois de testados quanto à atividade tripanomicida, serão obtidos 24 análogos do NFOH e NF, o que permite a realização de estudos de QSAR 2-D (clássico e HQSAR). Outrossim, permitirá análise inicial dos parâmetros calculados e/ou características necessárias para que um composto da série seja considerado promissor contra doença de Chagas. Além disso, o desenvolvimento de um modelo de grupo farmacofórico poderá ser estabelecido.

4.2- Modelagem molecular

A fim de otimizar as moléculas, partiu-se de modelos semiempíricos (mais simples) chegando a modelos mais complexos. Assim, após desenhar as moléculas e minimizá-las por mecânica molecular (MMFF94), estas foram otimizadas por AM1 e, em seguida, submetidas a análise conformacional pelo mesmo método para depois serem novamente otimizadas utilizando metodologia mais sofisticada, que forneceria resultados em menor intervalo de tempo.

Entre os métodos semiempíricos disponíveis, o AM1 foi escolhido por ser realizado em período menor de tempo e fornecer estruturas mais próximas daquelas obtidas por meio de bases de cálculo mais elevadas, corroborando os dados publicados por VILLAR e colaboradores em 2005, para uma série de moléculas pequenas. O método PM3 mostrou-se menos preciso, além de demandar mais tempo para fornecer os resultados. Entre os métodos de análise conformacional, o sistemático foi escolhido, por produzir valores de energia mínima global pouco inferiores, quando comparado ao Monte Carlo. Além disso, o método sistemático calcula número maior de confôrmeros, sem que haja notória diferença de tempo entre os dois métodos.

Após obtenção do mínimo global por AM1, as moléculas passaram por nova otimização, a fim de buscar um melhor mínimo local através do uso de modelos *ab initio*. Com o intuito de escolher o método que apresentaria melhor relação entre estrutura espacial e tempo de cálculo, realizaram-se testes para seis das vinte e duas moléculas da série, comparando-se os valores de raiz dos mínimos quadrados (RMS), índice que faz a previsão de quanto uma estrutura molecular se sobrepõe à outra, através da média de distâncias entre os átomos. Para esta comparação utilizou-se o programa Hyperchem 7.5, da Hypercube. Seis metodologias foram escolhidas e comparadas entre si. A correlação entre os valores obtidos são apresentados na Tabela III. A otimização por HF/3-21G* apresentou valor médio de RMS muito baixo ($5,3 \cdot 10^{-2}$ Å), comparativamente ao método mais robusto utilizando teoria de densidade funcional (DFT/ B3LYP/6-31G**), consumindo-se, relativamente, pouco tempo de máquina para efetuar o cálculo (42 minutos).

Tabela III - Valores de RMS ($\text{\AA}$) médios calculados por diferentes modelos através de otimização molecular e respectivo tempo de cálculo.

Método de otimização	Tempo de cálculo (minutos)	Metodologia de otimização - RMS($\text{\AA}$)					
		AM1	PM3	HF STO-3G	HF 3-21G*	DFT/local	DFT/B3LYP/6-31G**
AM1	< 1	-	0,37	0,27	0,18	0,22	1,1
PM3	< 1	0,37	-	0,28	0,36	0,39	1,9
HF STO-3G	28	0,27	0,28	-	0,26	0,28	$3,1 \times 10^{-1}$
HF 3-21G*	42	0,18	0,36	0,26	-	$7,0 \times 10^{-2}$	$5,3 \times 10^{-2}$
DFT/local	242	0,22	0,39	0,28	$7,0 \times 10^{-2}$	-	$9,7 \times 10^{-2}$
DFT/B3LYP/6-31G**	468	1,1	1,9	$3,1 \times 10^{-1}$	$5,3 \times 10^{-2}$	$9,7 \times 10^{-2}$	-

Com base nestes dados, a metodologia geral definida para cálculo dos 22 análogos foi na seguinte ordem: otimização por mecânica molecular (MMFF94), otimização e análise conformacional por AM1, seguido de nova otimização por HF/3-21G*.

O cálculo de carga de ponto único foi efetuado pelo método DFT B3LYP/6-31G**. A escolha foi com base no tempo, que seria viável para realização dos cálculos, além de que este modelo leva em consideração maior número de variáveis, fornecendo resultado mais confiável.

Os mapas de distribuição de LUMO (*Lowest unoccupied molecular orbital*), bem como os MEP, para todas as moléculas estudadas são apresentados, respectivamente, nas Figuras 85 e 86. Os valores de cargas eletrostáticas atômicas parciais (Chelpg) e de Energia de LUMO (E_{LUMO}) são apresentados na Tabela IV. Através da observação dos valores de carga na região do grupo nitro, e comparando estes valores com os de E_{LUMO} , procurou-se correlação entre os valores obtidos.

A Figura 85 mostra que há maior densidade eletrônica de LUMO na região dos anéis aromáticos e, principalmente, grupo nitro para todos os compostos. Para as moléculas contendo anel de cinco membros, há pequeno deslocamento da distribuição também para as ligações entre os átomos α e β da cadeia lateral ligada aos anéis aromáticos. Para as moléculas contendo anéis de seis membros, esta distribuição está mais localizada na própria cadeia ressonante.

Figura 85 – Representação gráfica dos coeficientes de LUMO. As moléculas estão identificadas abaixo de suas estruturas, sendo que à esquerda estão as moléculas contendo semicarbazona e à direita contendo tiossemicarbazona.

Concordando com o fato de que a distribuição orbitalar de LUMO se assemelha para todos os compostos, pode-se sugerir que os compostos que apresentarem menor E_{LUMO} (Tabela IV) provavelmente serão mais capazes de receber elétron para que aconteça redução do grupo nitro. Uma vez que a concentração da E_{LUMO} para todos os compostos ficou, de forma geral, na região do anel aromático, procurou-se estabelecer correlação entre os valores de E_{LUMO} e os valores de cargas eletrostáticas na região, o que nos permitiria avaliar a capacidade de redução através dos valores de E_{LUMO} e dos MEPs.

Observando-se a tabela IV, o fator de correlação (R) não é alto quando os átomos são considerados separadamente. No entanto, quando a média das cargas parciais na região do grupo nitro foi considerada (equações 1 e 2), encontrou-se boa correlação para os 22 compostos ($R \cong -0,74$). O sinal negativo indica que os valores são inversamente proporcionais, ou seja, quanto mais alto o valor das cargas positivas no grupo nitro e no anel ao qual o grupo nitro está ligado, menor será o valor de E_{LUMO} , o que é consistente, pois valores

mais positivos na região do grupo nitro significam maior propensão para atração de elétron e consequente redução.

$$X_1 = n \cdot R_{\text{med}} + N + O \quad (1)$$

$$X_2 = n \cdot R_{\text{med}} + N + 2 \cdot O \quad (2)$$

n = número de átomos no anel aromático.

$R_{\text{med.}}$ = média das cargas atômicas no anel aromático.

N = carga do nitrogênio do grupo nitro.

O = média das cargas dos átomos de oxigênio do grupo nitro.

Tabela IV - Valores de E_{LUMO} (kcal/mol) e das cargas eletrostáticas atômicas encontradas para a série de compostos definida. A coluna O/S representa a presença de oxigênio ou enxofre na semicarbazona.

Composto	O/S	E_{LUMO} (kcal/mol)	n	R_{med}	N	O	X_1	X_2
Benzeno	O	-54,19	6	-0,067	0,680	-0,405	-0,53	-0,125
Benzeno	S	-56,73	6	-0,050	0,660	-0,415	-0,42	-0,005
Furano	O	-58,34	5	-0,012	0,620	-0,380	-0,20	0,180
Furano	S	-72,87	5	-0,116	0,640	-0,405	-0,75	-0,345
Imidazol1	O	-64,80	5	-0,016	0,610	-0,375	-0,22	0,155
Imidazol1	S	-78,17	5	-0,014	0,600	-0,380	-0,23	0,150
Imidazol2	O	-49,58	5	-0,003	0,610	-0,385	-0,18	0,205
Imidazol2	S	-53,50	5	-0,043	0,610	-0,395	-0,44	-0,045
Isotiazol	O	-67,80	5	-0,010	0,570	-0,380	-0,25	0,130
Isotiazol	S	-71,26	5	-0,050	0,680	-0,405	-0,38	0,025
Isoxazol	O	-65,95	5	-0,016	0,620	-0,390	-0,24	0,150

Isoxazol	S	-70,10	5	-0,065	0,680	-0,405	-0,52	-0,115
Pirazina	O	-64,34	6	-0,046	0,660	-0,405	-0,38	0,025
Pirazina	S	-67,10	6	-0,004	0,590	-0,370	-0,13	0,240
Piridina	O	-56,04	6	-0,106	0,650	-0,410	-0,70	-0,290
Piridina	S	-58,57	6	-0,018	0,650	-0,385	-0,21	0,175
Pirimidina	O	-57,19	6	-0,016	0,610	-0,380	-0,23	0,150
Pirimidina	S	-60,42	6	-0,005	0,630	-0,390	-0,18	0,210
Tiofeno	O	-61,11	5	-0,042	0,610	-0,390	-0,42	-0,030
Tiofeno	S	-65,03	5	-0,007	0,570	-0,380	-0,23	0,150
Triazol	O	-58,57	5	-0,052	0,690	-0,405	-0,38	0,025
Triazol	S	-62,03	5	-0,016	0,620	-0,390	-0,24	0,150
			R	-0,665	0,178	-0,553	-0,737	-0,739

Todos os compostos com enxofre na cadeia lateral apresentaram menores valores de E_{LUMO} , indicando maior propensão a recebimento de elétron e consequente redução. O imidazol1 (2-nitro), que é o isômero presente no projeto, apresentou o menor valor de E_{LUMO} , sendo, provavelmente, o composto com maior potencial de redução e atividade do grupo nitro.

Outros compostos que apresentaram valores de E_{LUMO} abaixo dos demais foram os derivados furânicos, do isotiazol e do isoxazol. O triazol, apesar de não possuir valores comparáveis a estes, é o único da série que possui três nitrogênios, elementos muito eletronegativos, que fazem com que a carga média no anel tenha valor altamente positivo (0,090) em relação aos demais.

O imidazol1 apresenta menores valores de LUMO e maiores valores de carga positiva média (0,093 e 0,102, respectivamente, para semicarbazona e tiossemicarbazona). O imidazol2 (4-nitro) apresenta situação inversa, com maiores valores de LUMO e menores valores de carga positiva média (0,010 e 0,020).

Os compostos que apresentaram maiores valores de LUMO foram os derivados benzênicos, além do imidazol2, piridina, pirimidina e tiofeno.

Sabendo que este mecanismo de redução e geração de radicais livres pode ser considerado também um mecanismo de toxicidade dos candidatos a fármacos, a dificuldade de atração de elétrons pode ser considerada uma vantagem, em caso de fármacos com mecanismo duplo ou triplo. Testes de toxicidade, relacionando com estes tipos de dados, se fazem necessários para confirmar esta afirmação.

Analisando os MEP (Figura 86), confirmam-se os valores dos potenciais de LUMO, através da observação de cor azul mais intensa na região do nitrogênio ligado ao grupo nitro, ao carbono ligado a este e vizinhanças. A cor azul representa baixa densidade eletrônica, com consequente aparecimento de carga positiva, favorecendo atração eletrônica, enquanto que a cor vermelha representa local de alta densidade eletrônica (conforme mostra a legenda). Os compostos contendo enxofre na região da semicarbazona (abaixo do nome, na figura) mostram cor azul mais intensa na região do nitro, quando comparados aos seus isósteros contendo oxigênio (acima do nome na figura) e mesmo anel aromático. Ao mesmo tempo, a cor azul é mais intensa para os análogos do imidazol1 (2-nitro), também se destacando os compostos com anel furânico e com isoxazol. Não se observa cor azul para os derivados benzênicos, imidazol2 (4-nitro) e tiofeno.

Figura 86 - Representação das superfícies dos mapas de potencial eletrostático molecular (MEP) (na faixa de -40 a 30 kcal/mol, de acordo com a legenda) dos compostos de menor energia mínima. Acima do nome encontram-se os análogos contendo semicarbazona e abaixo, aqueles contendo tiossemicarbazona. Para cálculos de carga de ponto único empregou-se o método de DFT B3LYP/6-31G** e isodensidade eletrônica de 0,032 e/ua³.

A fim de observar a validade dos resultados de modelagem molecular obtidos neste projeto, é interessante que sejam sintetizados compostos que apresentem grande e pequena capacidade de redução do grupo nitro. Estes resultados podem ser validados através de cálculo de correlação entre os valores obtidos na modelagem molecular e em experimentos utilizando a eletroquímica. Há publicações do nosso grupo de pesquisa envolvendo o NFOH e fármacos, levando em consideração os aspectos eletroquímicos de redução do mesmo grupo nitro (LA-SCALEA *et al.*, 2009). Para que esta correlação seja efetuada gerando valores interessantes, faz-se necessária a síntese de número razoável de compostos, com diferentes comportamentos perante a redução do grupo nitro.

4.3- Docking com dinâmica molecular

Após a estabilização do sistema, transcorridos 3 ns, observou-se divergência do mecanismo de ação proposto. A CYS25 não se manteve adequadamente alinhada com a carbonila da semicarbazida. Por outro lado, um sistema de ligações de hidrogênio foi estabelecido e a molécula apresentou bom ancoramento no sítio de ligação, o que leva a crer que o mecanismo de interação está se aproximando da realidade (Figura 87).

Figura 87 - (Esquerda, acima) Ilustração mostrando o afastamento da CYS25 em relação a carbonila. Rede de ligações de hidrogênio intrincada pode ser evidenciada com histidina e serina proximais (ambas).

O afastamento da CYS25 pode ajudar a elucidar outras formas de interação a serem testadas. Possível estado neutro da CYS25 e a interação com ligante podem, também, proporcionar a inibição da enzima. Outra possibilidade é a formação de uma ligação covalente por meio de reação de

adição à carbonila. Ambas as possibilidades podem ser estudadas por dinâmica molecular, contudo a formação de ligação covalente não tem suporte experimental.

Baseado nestes resultados, outras simulações serão realizadas com os demais ligantes propostos nesse projeto. A estimativa da afinidade de ligação pode ser apreciada com a utilização da metodologia de energia livre de interação linear (AQVIST, MARELIUS, 2001). Os modelos de complexos serão, também, úteis para a proposição de novas estruturas bioativas.

5 - CONCLUSÕES

5.1 Os bioisósteros nitroimidazólicos do NFOH não foram sintetizados com sucesso, pois não se conseguiu chegar ao composto com a carbonila protegida na posição 4 utilizando-se etilenoglicol com um ácido fraco de Lewis. Desta forma, a nitração na posição 2 não foi possível.

5.2 O PCC não foi efetivo em fazer a oxidação do triazol hidroximetilado e, desta forma, não se obteve a amida, que reagiria com a cadeia lateral para formar os derivados do NFOH planejados. Tentativas de formilação direta ao nitrogênio 1 também não foram efetuadas com sucesso, apesar de que os resultados apresentados mostram que esta via parece mais promissora na síntese dos bioisósteros triazólicos do NFOH.

5.3 Derivados nitrobenzênicos e imidazólicos (sem grupo nitro) foram sintetizados com sucesso. Incluindo os bioisósteros contendo aminoguanidina, tiossemicarbazona e semicarbazona, totalizam-se seis novas moléculas, que poderão ser testadas quanto à atividade frente ao *T. cruzi*.

5.4 A Modelagem Molecular mostrou-se ferramenta útil para fornecer parâmetros (cargas eletrostáticas, energia de LUMO) e características de natureza eletrônica dos compostos, o que permitiu a realização das análises. As modificações moleculares reportadas neste estudo interferem na capacidade de atração de elétrons por parte do grupo nitro. Os resultados apresentados são relevantes para o planejamento racional de nitroderivados, levando em consideração a atividade e a toxicidade destes.

5.5 De acordo com a metodologia aplicada de *docking* com dinâmica molecular de complexos, observou-se que houve divergência do mecanismo observado para compostos com semicarbazona e tiossemicarbazona reportados em literatura, uma vez que a carbonila do NFOH se distanciou um pouco da CYS25 da cruzaina. Simulações para os demais compostos propostos no projeto poderão ser efetuadas, a fim de verificar se este mesmo tipo de padrão é observado. Este trabalho permitiu uma primeira previsão do comportamento dos protótipos que estão

sendo sintetizados e terão suas atividades testadas contra o *T. cruzi*, prevendo resultados contra um dos três mecanismos – inibição da cruzafina - pelos quais se pretende que estes fármacos manifestem sua ação.

6- PERSPECTIVAS

Para continuação do presente trabalho, algumas perspectivas podem ser apresentadas, face ao potencial que as moléculas planejadas possuem para serem excelentes protótipos para o tratamento da doença de Chagas:

- ✓ Tentativa de proteção na carbonila do 4-carboxialdeído imidazol utilizando-se outro método, que envolve reagente diverso.
- ✓ Utilização do método de oxidação de Swern ou iodo hipervalente para oxidação do triazol hidroximetilado a amida.
- ✓ Novas tentativas de formilação direta no 3-nitrotriazol utilizando o anidrido fórmico e anidrido acético e aplicação do método de formilação de aminas usando metanoato de metila.
- ✓ Término da síntese, através da hidroximetilação dos derivados nitrobenzênicos e do imidazólicos do NF já sintetizados.
- ✓ Realização de ensaios tripanomicidas e de inibição frente à cruzaina para os análogos nitrobenzênicos e imidazólicos do NF e do NFOH, a fim de comparar estes com os compostos já sintetizados pelo nosso grupo. Tais estudos poderão trazer mais informações em termos de relação estrutura-atividade dos compostos já sintetizados pelo grupo, permitindo verificar previamente a importância do grupo nitro na atividade biológica, uma vez que não está presente nos derivados imidazólicos sintetizados neste trabalho.
- ✓ Otimização da metodologia de síntese em fase sólida para as reações de formação de imina.
- ✓ Continuação dos estudos de dinâmica molecular a fim de se verificar o tipo de padrão de inibição dos compostos propostos à cruzaina.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A.A.; GREASY, J.E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev.*, v. 26, p. 531-568, 2006.
- AMATO NETO, V. A vida e a obra de Carlos Chagas. *Imprensa Med.*, n. 442, p. 82-91, 1950.
- APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.; SANCHEZ, G.; VARGAS, S.L.; RODRIGUEZ J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 97, p.23-29, 2003.
- AQVIST, J.; MARELIUS, J. The linear interaction energy method for predicting ligand binding free energies. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, v. 4, p. 613-626, 2001.
- AQVIST, J.; MEDINA, C.; SAMUELSSON, J.E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng.*, v. 7, p. 385–391, 1994.
- BAS, C. B.; ROGERS, D.M.; JENSEN, J.H. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins*, v. 73, p. 765-783, 2008.
- BHAT, L.; STEINIG, A. G.; APPELBE, R.; MEIJERE, A. Convenient synthesis of heterobicycles by domino Heck-Diels-Alder reactions. *Eur. J. Org. Chem.*, v. 1, p. 1673-1680, 2001.
- BILLINS, E. Molecular modeling and drug design. In: WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. Eds. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 5.ed., Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p.68-85.
- BITTENCOURT A.L. Transmissão vertical de doença de Chagas In: BRENER. Z.; ANDRADE. Z.; BARRAL-NETO. M., Eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.16-20.
- BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E.E.; DOCAMPO, E.; TURRENS, J.F.; STOPPANI, ANDRÉS, O.M. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biochem.*, v. 188, p. 643-48, 1980.
- BREDA, A.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S.; de Azevedo Jr. Virtual screening of drugs: score functions, docking and drug design. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* v. 4 p. 8-18, 2008.
- BUCKNER, F.S., NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Curr Opin Infect Dis.* em impressão, 2010
- BURGER, A. Isosterism and bioisosterism in drug design. *Prog. Drug Res.*, v. 37, p. 287-371, 1991.

- CAZZULO, J.J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.*, v. 7 p. 1143-1156, 2001.
- CAZZULO, J.J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem.*, v. 2, p. 1261-1271, 2002.
- CHACUN-LEFÈVRE, L.; JOSEPH, B.; MÉROUR, J. Intramolecular heck coupling of alkenyl 3-iodoindole-2-carboxamide derivatives. *Synlett*, v. 6, p. 848-850, 2001.
- 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.; 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.
- CIAPETTI, P.; GIETHLEN, B. Molecular variations based on isosteric replacements. *In: WERMUTH, C.G. Ed. The practice of medicinal chemistry*. 3ª edição. London: Academic Press, 2008, p. 290-334.
- CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature*, v. 465, p. S12-S15, 2010.
- COURA, J.R.; DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.104, p. 31-40, 2009.
- COURA, J.R; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica* v. 115, p. 5-13, 2010.
- DAVIS, P.D.; KIRK, K.L.; COHEN, L.A. New synthesis of 2-nitroimidazoles. *J. Heter. Chem.*, v.19, p. 253-256, 1982.
- DE AMORIM, H.L.; CACERES, R.A.; NETZ, P.A. Linear interaction energy (LIE) method in lead discovery and optimization. *Curr. Drug Targets*, v. 9, p. 1100-1105, 2008.
- DE MARCHI, C.R.; AMARO NETO, V.; ALMEIDA, I.C. Comportamento do método quimioluminescente-ELISA em relação a resultados considerados discordantes por meio de três técnicas convencionais para diagnóstico da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 40, p. 68-70, 2007.

- 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.
- DESPOMMIER, D.D.; KARAPELOU, J.W. *Parasite life cycles*. 1 ed, New York: Springer Verlag, 1987. p. 6-7.
- DEWAR, M.J.S., ZOEBISCH, E.G., HEALY, E.F.; STEWART, J.J.P. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, v.107, p.3902-3909, 1985.
- DIAS, J.C.P. Cecílio Romãna, Romãna's sign and Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 30, p. 407-413, 1997.
- DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER. Z.; ANDRADE. Z.; BARRAL-NETO. M., Eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2^a edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.48-63.
- DIAS, J.C.P.; SILVEIRA A.C.; SCHOFIELD C.J. The impact of Chagas control in Latin América: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 603-12, 2002.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. The acidocalcisome. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 33, p. 151-159, 2001.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites *Curr. Drug Targets*, v. 1, p. 51-61, 2001
- 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.
- DORIGUETTO, A.C.; SILVA, C.H.T.P.; ELLENA, J.; TROSSINI, G.H.G.; MAN CHIN, C.; FERREIRA, E.I. 5-Nitro-2-furaldehyde *N*-(hydroxymethyl)-semicarbazone. *Acta Cryst.*, v.61, p. o2099-2101, 2005.
- DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P.S. ; CAFFREY, C.R. ; HOLLER, T.P.; MCKERROW, J.H.; COHEN, F.E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.*, v.45, p. 2695-2707, 2002.
- EAKIN, A.E.; MILLS, A.A.; HARTHN, G.; MCKERROW, J.H.; CRAIK, C.S. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* v. 267 (11), p. 7411-7420, 1992.
- ENGEL, J.C.; DOYLE, P.S.; PALMER, J.; HSIEH, I.; MCKERROW, J.H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.*, v. 88, p. 725-734, 1998b.

- ENGEL, J.C.; DOYLE, P.S.; PALMER, J.; HSIEH, I.; BAINTON, D.F. MCKERROW, J.H. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.*, v. 111, p. 597-606, 1998b.
- FANG, L.; APPENROTH, D.; DECKER, M.; KIEHNTOPF, K.; LUPP, A.; PENG, S.; FLECK, C.; ZHANG, Y.; LEHMANN, J. NO-Donating tacrine hybrid compounds improve scopolamine-induced cognition impairment and show less hepatotoxicity. *J. Med. Chem.*, v. 51, p. 7666–7669, 2008.
- FERRAZ, M.L.; GAZZINELLI, R.T.; ALVES, R.O.; URBINA, J.A.; ROMANHA, A.J. The anti-*Trypanosoma cruzi* scivity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, p. 1359-1364, 2007.
- FRANÇA, F. F. A. C. ANDREJUS KOROLKOVAS. *Dicionário terapêutico Guanabara*, Ed.2010/2011, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- GARCÍA-GÓMEZ, G.; MORETO, J. M.; Intramolecular Ni-mediated cyclizations with α,ω -dienals. *Eur.J.Org.Chem.*, v. 7, p. 1359-1369, 2001.
- GHANDI, M.; MASHAYEKHI, G. A simple and efficient approach to the synthesis of *endo* and *exo* bicyclo[6.1.0]nona-3,5-diene-9-carboxaldehyde. *Molecules*, v.12, p.2427-2433, 2007.
- GILLES, M.M. *Protozoal diseases*. 1 ed, New York: Arnold Publishers, 1999. p. 313-317.
- GUILLÉN, M.C.S.; COLOMBO, A.L.; TOQUERO, G.O.; ALBINO, I.G.; JIMENEZ, J.R.; RASGADO, E.T.; ROSAS, H.S.; DÍAZ, M.R.; PÉREZ, P.P.; FUENTES, R.P. Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 733-739, 2006.
- HOLLOWAY, G.A.; BAELL, J.B.; FAIRLAMB, A.H.; NOVELLO, P.M.; PARISOT, J.P.; RICHARDSON, J.; WATSON, K.G.; STREET, I.P. Discovery of 2-iminobenzimidazoles as a new class of trypanothione reductase inhibitor by high-throughput screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.17, p. 1422-1427, 2007.
- HOTEZ, P.J. Neglected infections of poverty in the United States of America. *PLoS Negl Trop Dis*. v. 2, p. 1-11, 2008.
- ITAI, A.; MIZUTANI, M.Y.; NISHIBATA, Y.; TOMIOKA, N. Computer-assisted new lead design. In: COHEN, N.C., Ed. *Guidebook on molecular modelling drug design*, San Diego: Academic Press, 1996. p.100-101.
- JONES, G., P. WILLET, R. C. GLEN, A. R. LEACH, AND R. TAYLOR. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.*, v.267, p.727–748, 1997.

- KIASAT, A.R.; KAZEMI, F.; MEHRJARDI, M.F. Synthesis of semicarbazones from carbonyl compounds under solvent free conditions. *Asian J. Chem.*, v. 17, p. 2830-2832, 2005.
- KIASAT, A.R.; KAZEMI, F.; MEHRJARDI, M.F. Basic alumina as an efficient catalyst for preparation of semicarbazones in solvent free conditions. *J. Chinese Chem. Soc.*, v. 54, p. 1337-1339, 2007.
- KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*, 2 ed, New York: Wiley-Interscience, 1988. p. 579-670.
- LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.6 , p. 402–406, 1996.
- LEPESHEVA, G.I.; ZAITSEVA, N.G.; NES, W.D.; ZHOU, W.; ARASE, M.; LIU, J.; HILL, G.C.; WATERMAN, M.R. CYP51 from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, v. 281, p. 3577-3585, 2006.
- LEPESHEVA, G.I.; HARGROVE, T.Y.; ANDERSON, S.; KLESHCHENKO, Y.; FURTAK, V.; WAWRZAK, Z.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M.R. Structural insights into inhibition of Sterol 14 α -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, v. 285, p. 25582-25590, 2010.
- LIMA, L.M.; BARREIRO, J.E. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. *Curr. Med. Chem.*, v. 12, p. 23-49, 2005.
- LINDAHL, E.; SANSOM, M.S. Membrane proteins: molecular dynamics simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 18 p. 425-31, 2008.
- MAEGAWA, F.A.B; DAMERAU, E.F., BELTRAME, I.T., LOPES, A., MACHADO, P.E.; STEINDEL, M; GRISARD, E.C. Autochthonous Chagas' disease in Santa Catarina, Brazil: report of the first case of digestive tract involvement. *Rev.Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, p. 609-612, 2003.
- MAHONEY, M.W.; JORGENSEN, W.L. A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. *J. Chem. Phys.*, v. 112, p. 8910-8922, 2000.
- MARTYN, D.C.; JONES, D.C.; FAIRLAMB, A.H.; CLARDY, J. High-throughput screening affords novel and selective trypanothione reductase inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.17, p. 1280-1283, 2007.
- MCKERROW, J.H.; DOYLE, P.S.; ENGEL, J.C.; PODUST, L.M.; ROBERTSON, S.A.; FERREIRA, R.; SAXTON, T.; ARKIN, M.; KERR, I.D.; BRINEN, L.S; CRAIK, C.S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem, Inst ,Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 263-269, 2009.

- MOLINA, J.; MARTINS-FOLHO, O.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; LOEBENNERG, D.; URBINA, J.A. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 44, p. 150-155, 2000.
- MORENO, S.N.J. The reductive metabolism of nifurtimox and benznidazole in *Crithidia fasciculata* is similar to that in *Trypanosoma cruzi* *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 81, p. 321-325, 1988.
- MORENO, S.J.N.; DOCAMPO, R. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of Trichomoniasis. *Environ. Health Perspec.*, v. 64, p. 199-208, 1985.
- MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. *Química Orgânica*, 13^a edição, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1992, p. 278-280.
- MORTIMER, G.A. A study of alkyl nitratocarbonates. An improved synthesis of nitrate esters. *J. Org. Chem.*, v.27, p. 1876-1878, 1961.
- NODE, M.; NAGASAWA, H.; FUJI, K. Chiral total synthesis of indole alkaloids of the *Aspidosperma* and *Hunteria* types. *J. Org. Chem.*, v.55, p. 517-521, 1990.
- NORBERG, J.; NILSSON, L. Advances in biomolecular simulations: Methodology and recent applications. *Quart. Rev. Biophys.*, v. 36, p. 257–306, 2003.
- PAREDES, C.F.; JONES, D.; MORALES, A.J.R.; PRECIADO, J.I.S. Commentary: improving the health of neglected populations in Latin America. *BMC Public Health*, v. 1 p. 7-11, 2007.
- PATANI, G.A.; LAVOIE, E.J. Bioisosterism: a rational approach in drug design. *Chem. Rev.*, v. 96, p. 3147-3176, 1996.
- PEVZNER, M.S.; IVANOV, P.A.; GLADKOVA, N.V.; SUSHCHENKO, O.N.; TVERDOKHLEBOV, V.P.; MYASNIKOVA, Z.S. Heterocyclic nitro compounds. 25. 1-Hydroxymethyl-3-nitro 1,2,4 triazoles and their derivatives. *Khim. Geterotskl. Soedin.*, v.2, p. 189-199, 1980.
- PICKA, M.C.M; MEIRA, D.A.; CARVALHO, T.B.; PERESI, E.; MACHADO, J.M. Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas disease. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 11, p. 226-233, 2007.
- PIERRI, C.L.; PARISI, G.; PORCELLI, V. Computational approaches for protein function prediction: a combined strategy from multiple sequence alignment to molecular docking-based virtual screening. *Biochim Biophys Acta*. v. 1804, p. 1695-1712, 2010.

- PNIEWSKA, B.; JANUCHOWSKI, M. Structural Investigation of nifuroxazide, p-hydroxy-N-(5-nitrofurfurylidene) benzhydrazide *Pol. J. Chem.*, v. 72, p. 2629-2634, 1998.
- RANDO, D.G.; AVERY, M.A.; TEKWANI, B.L.; KHAN, S.I.; FERREIRA, E.I. Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzylidene hydrazides. *Bioorg. Med. Chem.* v. 16, p. 6724-6731, 2008.
- RAO, K.E. KROWICKI, K.; BURCKHARDT, G.; ZIMMER, C.; LOWN, J.W. Molecular Recognition between Oligopeptides and Nucleic Acids: DNA Binding Selectivity of a Series of 1,2,4-Triazole-Containing Lexitropsins. *Chem. Res. Toxicol.*, v.4, p. 241-252, 1991.
- ROHLOFF, P.; MONTALVETTI, A.; DOCAMPO, R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 52270-52287, 2004.
- SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 120, p.1-21, 2002.
- SANZ-RODRIGUEZ, C.E.; CONCEPCION, J.L.; PEKERAR, S.; OLDFIELD, E.; URBINA, J.A. Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase. *J. Biol. Chem.*, v. 282, p. 12377-12387, 2007.
- SILVA, T.H.A. Modelagem molecular com auxílio de computador. In: PRADO, M.A.F.; BARREIRO, E.J., Eds. *Práticas de química farmacêutica y medicinal*, Pamplona: CYTED-Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 2002. p. 67-85.
- SILVEIRA, A.C. Profilaxia In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M., Eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.48-63.
- SNOW, C.D.; SORIN, E.J.; RHEE, Y.M.; PANDE, V.S. How well can simulation predict protein folding kinetics and thermodynamics? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 34, p. 43–69, 2005.
- STEEENKAMP, D.J. Thiol metabolism of the trypanosomatids as potential drug targets. *IUBMB Life*, v. 53, p.243-248, 2002.
- TOHMA, H.; KITA, Y. Hypervalent iodine reagents for the oxidation of alcohols and their application to complex molecule synthesis. *Adv. Synth. Catal.*, v. 346, p. 111-124, 2004.
- TROSSINI, G.H.G. *Antichagásicos potenciais: busca racional de compostos com ação seletiva pela cruzaina*. São Paulo, 2010, 289p. [Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo]

- TROSSINI, G.H.G.; MALVEZZI, A.; DO AMARAL, A.T.; YAGUI, C.R.O.; IZIDORO, M.A.; CEZARI, M.H.S.; JULIANO, L.; MENEZES, C.A.S.; CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. Cruzain inhibitory activity and preliminary molecular modeling study of hydroxymethylnitrofurazone, a nitrofurazone derivative. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, v.25, p.62-67, 2010.
- TRETYAKOV, E.V.; TKACHEV, A.V.; RYBALOVA, T.V.; GATILOV, Y.V.; KNIGHT, D.W.; VASILEVSKY, S.F. Reaction of arylpropargyl aldehydes with 2,3-bis-hydroxylamino-2,3-dimethylbutane: synthesis of 2-(1-hydroxy-4,4,5,5-tetramethylimidazolidin-2-ylidene)-1-arylethanones. *Tetrahedron*, v.6 p. 10075-10080, 2000.
- TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects Med.*, v.25, p. 211-220, 2004.
- URBINA, J.A.; BENJAMIN MORENO, B.; VIERKOTTER, S.; OLDFIELD, E.; PAVARES, G.; SANOJA, C.; BAILEY, B.N.; YAN, W.; SCOTT, D.A.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth *in vitro* and *in vivo* is blocked by pyrophosphate analogs. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 33609-33615, 1999.
- URBINA, J.A. Parasitological cure of Chagas disease: Is it possible? Is it relevant? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 349-355, 1999a.
- URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J. Mol. Med.*, v. 77 p. 332-338, 1999b.
- URBINA, J.A.; CONCEPCUION, J.L.; CALDERA, A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; OTOMO, T.; HIYOSHI, H. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.*, v. 8, p. 278-295, 2002.
- URBINA, J.A.; DOCAMPO, R; Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.*, v. 19, p. 495-501, 2003.
- URBINA, J.A.; CONCEPCION, J.L.; CALDERA, A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; OTOMO, T.; HIYOSHI, H. In Vitro and in Vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antim. Agents . Chemother.*, v. 48, p. 2379-2387, 2004.
- VILLAR, R.; GIL, M.J.; GARCÍA, J.I.; MARTÍNEZ-MERINO, V. Are AM1 ligand-protein binding enthalpies good enough for use in the rational design of new drugs? *J. Comput. Chem.*, v.26 p.1347-1358, 2005.
- WERMUTH, C.G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses. In: WERMUTH, C.G., Ed. *The practice of medicinal chemistry*. 3.ed. London: Academic Press, 2008a. p. 126-129.
- WHO, in: http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/report-enfermedad-chagas/pdf/swg_chagas.pdf, 2007.

- XIAO, L.; MADISON, V.; CHAU, A.S.; LOEBENBERG, D.; PALERMO, R.E. ; MCNICHOLAS, P.M. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14- α sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antim. Agents Chemother.*, v. 48, p. 568-574, 2004.
- YONETAMI, T.; LABERGE, M. Protein dynamics explain the allosteric behaviours of hemoglobin. *Biochim. Biophys Acta*, v. 1784 p. 1146-1158, 2008.
- ZAMPONI, G.W.; STOTZ, S.C.; STAPLES, R.J.; ANDRO, T.M.; NELSON, J.K.; HULUBEI, V.; BLUMENFELD, A.; NATALE, N.R. Unique structure-activity relationship for 4-isoxazolyl-1,4-dihydropyridines *J. Med. Chem.*, v. 46, p.87-96, 2003.
- ZHAO, Q.J.; HU, H.G.; LI, Y.W.; SONG, Y.; CAI, L.Z.; WU, Q.Y.; JIANG, Y.Y. Design, synthesis and antifungal activities of novel 1H-triazole derivatives based on the structure of the active site of fungal lanosterol 14 α -demethylase (CYP51). *Chem. Biodiversity*, v. 4, p. 1472-79, 2007.