

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

**Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos derivados da
oxamniquina**

ROBERTO PARISE FILHO

**Tese para obtenção de grau de
DOUTOR**

**Orientadora:
Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira**

**São Paulo
2003**

17770

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

**Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos derivados da
oxamniquina**

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

ROBERTO PARISE FILHO

**Tese para obtenção de grau de
DOUTOR**

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira

São Paulo
2003

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005756

Ficha Catalográfica

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

Parise Filho, Roberto

P232p Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos derivados da oxamniquina / Roberto Parise Filho. -- São Paulo, 2003.

294p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Silveira, Maria Amélia Barata da

1. Latenciação : Química farmacêutica 2. Oxamniquina
3. Polímeros : Química farmacêutica I. T. II. Silveira, Maria Amélia Barata da, orientador.

615.19 CDD

ROBERTO PARISE FILHO

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos derivados da oxamniquina

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira
Presidente e Orientadora

Seizi Oga

Magali Benjamim de Araújo

Liliana Marzorati

Chung Man Chin

São Paulo, 18 de dezembro de 2003.

DEDICATÓRIA

**“SE CONSEGUI ENXERGAR MAIS LONGE QUE OUTROS SERES
HUMANOS É PORQUE SUBI NOS OMBROS DE GIGANTES”**

Isaac Newton

Esta citação demonstra a gratidão de um dos maiores cientistas da história da humanidade a seus mestres. Reflete, através de respeito e admiração, uma boa orientação e estímulo constante para o aproveitamento do potencial de um indivíduo. Esta frase foi escolhida com o intuito de prestar uma homenagem aos pesquisadores que sempre me estimularam e me desafiaram a alcançar patamares mais altos na minha formação:

Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo
Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira
Prof. Dr. Carlos Alberto Brandt
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

*Aos meus queridos pais, Silvia e Roberto,
Pela confiança e apoio
Pela educação segura e carinhosa,
Por me guiarem na vida com humildade, paciência, dedicação e amor
irrestritos.
Por serem o alicerce desta conquista.*

*À minha querida irmã, Patricia
Que em todos os momentos
Soube confiar e compreender as dificuldades,
Com amizade, carinho e respeito.*

AMO VOCÊS!!!!!!

Ao amor da minha vida,

Michelle Carneiro Polli

*Obrigado por todo seu apoio, paciência, incentivo e carinho,
Especialmente nos momentos difíceis,
Por estar sempre ao meu lado, com seu ombro amigo.
Saiba que você é e sempre será parte da minha vida*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, que nos concede a cada dia nova página de vida no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela, corre por nossa conta.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela acolhida e oportunidade de realização deste trabalho.

À FAPESP, por acreditar nas possibilidades de crescimento pessoal e profissional, fomentando todas as nossas iniciativas.

Meu reconhecimento vai especialmente para os amigos valiosos, Maria Amélia Barata da Silveira e Carlos Alberto Brandt, orientadores deste trabalho, que colocaram toda sua presteza, eficiência e simplicidade ao meu favor; indicaram-me atalhos para encurtar caminhos e criticaram com competência minhas idéias e conclusões, proporcionando crescimento no caminho do conhecimento científico e pessoal, tornando melhor o que produzi. Muito Obrigadolll

À Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo (EFOA) por acreditar na minha capacidade e direcionar-me rumo à vida científica; minha eterna gratidão e minha profunda admiração.

À Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira pelo amor à pesquisa e à vida acadêmica, determinantes de sua competência e capacidade; minha sincera admiração.

À pesquisadora e Profa. Dra. Carla Maria de Souza Menezes pelo exemplo de profissionalismo e amizade. Por ter introduzido conceitos importantes de modelagem molecular que enriqueceram muito todo o trabalho. Obrigadoll

À Profa. Dra. Veni Felli Nakasone pelo apelo "irrestrito", pela humildade e por acreditar na capacidade de cada um.

Ao Professor Jivaldo Mattos e ao amigo Adriano Antunes pela amizade sincera e pela introdução dos conceitos e práticas em análises térmica, as quais resultaram num trabalho de grande valor pessoal.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz S. Pinto pela amizade e pela parceria nos ensaios biológicos. Ao bolsista Gustavo e à técnica Ivete, minha eterna gratidão.

À professora Maria Inês Almeida Gonçalves pela amizade e pelos espectros de ressonância magnética nuclear

Ao amigo Diogo Teixeira Carvalho pelos ótimos momentos gastronômicos vividos, pelo apoio e, acima de tudo, pela amizade conquistada.

Ao valioso amigo Eliseu de Oliveira Ortega (Taytoo), pelo exemplo de vida, dedicação, amizade e amor à família. Pelo estímulo em buscar soluções e respostas, nem que seja por caminhos tortuosos. Pelo espírito empreendedor. "Hugo"

À guriazinha Kerly Paesqualoto pela esotérica e sincera amizade que fez com que os "anjinhos" nos protegessem e iluminassem nossos caminhos.

À nossa técnica e futura doutora, Kátia "Bee" pela ajuda irrestrita e sempre fundamental.

Às "cucarachas" Michelle Ortiz e Maria Mercedes pelo ótimo convívio e pela eterna amizade.

À amiga Andréa Peraro, pela amizade desde os tempos de graduação e por ter me acolhido em São Paulo, logo no início da pós-graduação.

Aos amigos boêmios Gustavo, Guilherme e Hélio; " às suas qualidades que são muitas mas poucos reconhecem" e que compartilharam das infindáveis "missas" realizadas nos bares de São Paulo. Obrigado pelo companheirismo.

Aos amigos pós-graduandos: Ana Cláudia, Camila, Daniela Rando, Kátia Solange, Malté, Mauro Júnior, pelo companheirismo, amizade e conselhos oportunos. Pelos momentos felizes passados e pelo apoio que cada um soube dar em todas as horas difíceis.

Às amigas Eunice e Kyung (BIOFAR) pelo exemplo de dedicação ao trabalho e por confiarem na minha capacidade. Obrigado pela amizade sincera.

Ao técnico e amigo Charles, por sua cordialidade, presteza e por sempre conseguir que o pessoal da manutenção aparecesse no momento desejado.

À secretária Elizabete C. Souza Paiva, pela disposição e auxílio valiosos.

Aos secretários Jorge e Elaine pela atenção, competência e eterna simpatia.

À amiga Dona Regina Del Monte, que me acolheu na vinda para São Paulo. Minha eterna gratidão. A todos os seus filhos: Renata, Carolina e em especial, o grande e verdadeiro AMIGO Adrian.

Aos familiares da Michelle: Sr. Raul, Sra. Maria Ignês, Many e Raulzinho pelos ótimos momentos vividos e também por acreditarem e confiarem em minha capacidade.

A tantas pessoas que se fizeram presentes no decorrer deste trabalho e seria impossível citar todas. De qualquer forma, MUITO OBRIGADO!!!!

"...Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito.....Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos...."

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO I – APRESENTAÇÃO	01
1.1 INTRODUÇÃO	02
1.2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	06
CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA	08
2.1 ESQUISTOSSOMÍASE	09
2.1.1 Generalidades	09
2.1.2 Epidemiologia	10
2.1.3 Medidas de controle	14
2.1.4 Ciclo evolutivo e patogenia	16
2.1.5 Diagnóstico	20
2.1.6 Quimioterapia: Fármacos esquistossomicidas	22
2.1.6.1 Histórico	22
2.1.6.2 Oxamniquina	29
2.1.6.2.1 Histórico	29
2.1.6.2.2 Relações entre estrutura química e atividade biológica	30
2.1.6.2.3 Farmacocinética	31
2.1.6.2.4 Farmacodinâmica	32
2.1.6.2.5 Usos terapêuticos	34
2.1.7 Busca por vacinas eficazes	34
2.1.8 Perspectivas	38
2.2 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	41
2.2.1 Latenciação	41
2.2.2 Pró-fármacos poliméricos	44
2.2.3 Planejamento sintético	52
CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1.1 Material	61
3.1.1.1 Produto farmacêutico	61

3.1.1.2 Reagentes, solventes e outros	61
3.1.1.3 Equipamentos	62
3.1.2 Métodos	63
3.1.2.1 Síntese dos monômeros	64
3.1.2.1.1 Monômeros ligados diretamente ao fármaco	64
3.1.2.1.1A Esterificação com cloretos de ácido	64
3.1.2.1.1B Esterificação direta com ácidos	72
3.1.2.1.1C Reações por transferência de fase	75
3.1.2.1.2 Monômeros ligados ao fármaco através de espaçantes	76
MÉTODO A	76
PRIMEIRA ETAPA	77
SEGUNDA ETAPA	78
TERCEIRA ETAPA	82
MÉTODO B	90
PRIMEIRA ETAPA	90
SEGUNDA ETAPA	95
3.1.2.2 Polimerização	107
3.1.2.3 Métodos analíticos	112
3.1.2.3.1 Cromatografia em camada delgada	112
3.1.2.3.2 Cromatografia em coluna	112
3.1.2.3.3 Ponto de fusão	112
3.1.2.3.4 Análise Elementar	112
3.1.2.3.5 Espectrofotometria no infravermelho (IV)	113
3.1.2.3.6 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)	113
3.1.2.3.7 Análise Térmica	113
3.1.2.3.8 Determinação do grau de substituição do copolímero	113
3.1.2.3.9 Difração de Raios-X	114
3.1.2.4 Métodos biológicos	114
3.1.2.5 Ensaios de liberação	117
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
4.1 RESULTADOS	119
4.1.1 Produtos farmacêuticos e principais reagentes	119
4.1.2 Síntese dos monômeros	126
4.1.2.1 Monômeros diretamente ligados ao fármaco	126
4.1.2.1.1A Esterificação com cloretos de ácido	126

4.1.2.1.1B <i>Esterificação direta com ácidos</i>	136
4.1.2.1.1C <i>Reações por transferência de fases</i>	144
4.2.1.2 Monômeros ligados ao fármaco através de espaçantes	151
MÉTODO A	151
PRIMEIRA ETAPA	151
SEGUNDA ETAPA	154
TERCEIRA ETAPA	158
MÉTODO B	161
PRIMEIRA ETAPA	161
SEGUNDA ETAPA	171
4.1.3 Polimerização	182
4.1.4 Ensaios biológicos	193
4.2 DISCUSSÃO	206
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	243
5.1 CONCLUSÕES	244
6.1 PERSPECTIVAS	245
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	247
APÊNDICE	279
MODELAGEM MOLECULAR	280

RESUMO

A esquistossomíase constitui grave problema de ordem sócio-econômica e de saúde pública, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Estima-se a existência de 200 milhões de pessoas infectadas, estando 600 milhões em risco de contrair a doença. É causada por trematódeos do gênero Schistosoma, sendo a espécie S. mansoni a única encontrada no Brasil. Fatores como o aparecimento de cepas resistentes e efeitos adversos causados por fármacos são relevantes para agravar o controle da doença. A oxamniquina é agente esquistossomicida bastante utilizado na terapêutica brasileira contra S. mansoni. Embora seja relativamente bem tolerada, alguns efeitos adversos ao nível de sistema nervoso central, como convulsões e alucinações, têm sido relatados. Propõe-se o método de latenciação da oxamniquina, utilizando-se poliacriloil e polimetacriloil derivados como transportadores e aminoácidos (ácido aminocapróico, ácido gama-aminobutírico e glicina) como unidades espaçantes, com o intuito de se obterem pró-fármacos poliméricos, permitindo prolongamento de ação e redução dos efeitos adversos. Resultados mostram a formação dos monômeros acrílico e metacrílico, sendo que ambos foram amplamente caracterizados. O copolímero, ácido poli(metacrílico-co-metacrilato de oxamniquina), foi caracterizado por espectrofotometria no infravermelho e análise térmica e difração por raios-X. O polímero e copolímero, derivados do monômero acrílico, não foram obtidos. Os derivados acrilóilamídicos e metacriloilamídicos dos aminoácidos foram obtidos com grau de pureza satisfatório, mas os derivados ligados à oxamniquina não foram obtidos até o momento. A modelagem molecular elucidou os problemas relativos à oxamniquina e obtenção de derivados. Um derivado cíclico da oxamniquina foi obtido por mecanismo inédito e que ainda está sob estudo. O grau de substituição do polímero foi determinado a fim de se verificar a dose efetiva. A atividade biológica dos derivados acrílico, metacrílico e copolimérico foi avaliada pelo método do oograma quantitativo e pela perfusão de veias mesentéricas. Resultados mostraram atividade para os monômeros acrílico e metacrílico quando se utilizou metade da dose usual de oxamniquina. O copolímero não apresentou atividade no período avaliado provavelmente em virtude de problemas relacionados à liberação do fármaco a partir da matriz polimérica.

ABSTRACT

Schistosomiasis, a tropical disease that affects humans for millions of years, is among the parasitic great incidence illness in subdeveloped countries. Even after all advances gotten in the treatment and prevention, the disease still has significative numbers of prevalence and morbity. The disease is directly associated with low acquisitive power, the lack of information and bad sanitary and habitat conditions. The trematodes of Schistosoma gender are considered the disease causing agents, and the most important species that affect humans are S. mansoni, S. mekongi e S. japonicum, S. haematobium e S. intercalatum; others species affect human less frequently. Oxamniquine is an schistosomicide agent widely used in brazilian therapeutics against S. mansoni, due to low cost and good efficacy. Although the drug is relatively well tolerated, some adverse effects in the central nervous system, as convulsions and alucinations have been described. The latention method was proposed with the aim to achieve polymeric prodrugs, allowing prolonged action and reduction of adverse effects. Polyacryloil and polymethacryloil derivatives were choosed to be the carriers and aminoacids (aminocaproic acid, gama-aminobutyric acid and glycine) were used as spacer groups. The acrylic and methacrylic prodrugs were obtained and a complete characterization was performed. The copolymer, poly (methacrylic-co-oxamniquine methacrylate) acid, was characterized by infrared spectrometry, thermal analysis and X-ray difratometry. The polymer and copolymer of the acrylic prodrug were not obtained. Although the oxamniquine prodrugs were not obtained yet, the acrylamidics and methacrylamidc derivatives of aminoacids were achieved with high punity degree. The molecular modeling solved some problems related to the oxamniquine's spacial structure and the obtention of its derivatives. An oxamniquine's cyclic derivative was achived by an unpublished reaction and still remains under research. The substitution degree of the copolymer was determined to determine the efective dose. The biological activity of the acrylic, methacrylic prodrugs and copolymer was evaluated by the quantitative oogram method and mesenteric blood vessels perfusion. Results show activity for the prodrugs, but not for the polymeric prodrug.

CAPÍTULO I
APRESENTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

De acordo com as estatísticas da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003), parasitas são a maior causa de morte humana em relação a qualquer outra doença, perdendo apenas para AIDS e tuberculose (que infectam um terço da população mundial, sendo responsáveis pela taxa de 2-3 milhões de mortes anualmente). Estimativas revelam que, pelo menos 10% da população mundial sofrem de alguma helmintíase, com as maiores infecções causadas por aproximadamente 25 das 342 espécies de helmintos sabidamente associados aos seres humanos (Hirst, Stapley, 2000). A maioria das pessoas afetadas é de baixo poder aquisitivo, sobretudo crianças, onde a morte associada às helmintíases é esperada antes que elas completem o quinto ano de vida (Crompton, 1999).

A esquistossomíase* (Kassai *et al.*, 1988), mal que aflige o homem há milhares de anos, está entre as doenças parasitárias mais importantes do mundo subdesenvolvido. Mesmo depois de todo o avanço conseguido no tratamento e prevenção, ela ainda amarga números significativos de prevalência e morbidade (WHO, 2003). É doença comportamental, na qual pessoas se expõem à infecção por cercárias, fundamentada pela falta de escolha e disponibilidade de suprimentos de água seguros para propósitos recreativos e domésticos, além da falta de condições sanitárias e de moradia (Menezes *et al.*, 1993; Hagan, 1998).

A doença é causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, cujas espécies mais importantes que infestam humanos são *S. mansoni*, *S. mekongi* e *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. intercalatum*; outras espécies afetam humanos menos freqüentemente (Fritsche, Smith, 1999). A doença ataca primeiramente os sistemas intestinal ou urinário, dependendo das espécies envolvidas, e é causa da alta morbidade em países da América do

* Denominação oficial adotada pela Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária.

Sul, Ásia e principalmente a África (James, Colley, 1995; Chitsulo *et al.*, 2000).

Esta parasitose é caracterizada por perfil de intensidade fortemente relacionada à idade, com infecções graves acometendo adolescentes e, geralmente, infecções brandas em adultos (Yazdanbakhsh, Deelder, 1998). Estima-se que cerca de 500.000 mortes sejam anualmente associadas à esquistossomíase. Esta mortalidade é devida, em sua maior parte, ao câncer de bexiga ou insuficiência renal, relacionados à esquistossomíase urinária e à fibrose do fígado e hipertensão portal, relacionadas à esquistossomíase intestinal (WHO, 2003).

No mundo, estima-se a existência de 200 milhões de pessoas infectadas, estando 600 milhões em risco de contrair a doença (WHO, 1998b; Sparg *et al.*, 2000). A esquistossomíase é endêmica em mais de 74 países (Butterworth, Davidson, 1999) e territórios, distribuídos nas Américas Central e do Sul, África, Filipinas, Tailândia, Índia e leste do Mediterrâneo, onde atinge as regiões do delta do Nilo, além dos países Egito e Sudão (WHO, 1998b). No Brasil, é considerada endemia em franca expansão, abrangendo 19 estados, que vão desde o Maranhão até Minas Gerais, com certa penetração no Espírito Santo, além de casos isolados no restante do país. Em 1990, aproximadamente 30 milhões de pessoas estavam sob o risco de adquirir a doença. Apesar de subestimada, a taxa de mortalidade por esquistossomíase no Brasil tem apresentado um declínio, passando de 0,67 em 1977, para 0,35 em 1995 (Guia de vigilância, 1998; Doenças infecciosas e parasitárias, 1998).

As atividades de controle, embora aparentemente bem elaboradas, parecem ser geralmente ineficazes pela multiplicidade de fatores envolvidos e por não oferecerem promessa realista de controle sustentável e definitivo (Ferreira, Coutinho, 1999). Estes fatores deslocam para a quimioterapia a

importante e crucial responsabilidade de prevenção, contenção e tratamento da doença (Coura, 1995; Cioli, 1998; WHO, 1998a).

Embora o Brasil tenha esquema de tratamento para a esquistossomíase mansônica (única espécie encontrada no país) representada pela oxamniquina e o praziquantel, estes estão tomando-se cada vez mais inadequados para o objetivo almejado. Suas ações são freqüentemente limitadas pelo surgimento de resistência (Bruce *et al.*, 1987; Cioli *et al.*, 1989; Cioli *et al.*, 1992; Fallon, Doenhoff, 1994; Cioli *et al.*, 1995; Coelho *et al.*, 1997), embora ainda não suficientemente detectada para o praziquantel (Coura, 1995; Cioli, 1998; Ismail *et al.*, 1999; Kusel, Hagan, 1999) e seus usos, devido aos efeitos adversos provocados no organismo (Shekar, 1991; Cioli *et al.*, 1995; WHO, 1998a).

Atualmente, existem pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de vacinas para doenças helmínticas e protozoárias como a malária, leishmaníase e a própria esquistossomíase, mas apesar de os avanços durante a última década, ainda não se têm resultados satisfatórios para a produção em larga escala (Cook, 1991; WHO, 2003).

Sob estas circunstâncias, fármacos alternativos, que possuam bom espectro, boa tolerabilidade e que não sejam tóxicos, devem ser desenvolvidos para alcançar-se a cura definitiva (Shekar, 1991). Uma solução seria o planejamento racional de novos fármacos, mas este constitui método oneroso e que dispense longo tempo para avaliar a segurança do novo medicamento. Em doenças como a esquistossomíase, que acometem pessoas de baixo poder aquisitivo e de terceiro mundo, a inviabilidade na produção de novo medicamento torna-se ainda maior, pois não é processo economicamente atrativo para as indústrias farmacêuticas. Assim, segue-se uma das recomendações da OMS em proceder-se alterações nos fármacos já existentes com a finalidade de obter-se melhorias nas propriedades, na

atividade e no desempenho do fármaco no organismo (Yevich, 1996; WHO, 1998b).

A latenciação é método promissor que consiste na transformação química de fármacos ativos em derivados inativos (pró-fármacos) que convertem-se ao fármaco protótipo dentro do organismo (Bundgaard, 1985; Friis, Bundgaard, 1996; Chung, Ferreira 1999). Uma maneira de se obter tais pró-fármacos é ligar um fármaco a uma estrutura polimérica ou oligomérica por meio de ligação lábil (Ringsdorf, 1975; Ouchi, Ohya, 1995; Patel *et al.*, 1997). A meta deste procedimento é melhorar o tratamento terapêutico. Agentes farmacológicos são principalmente compostos de baixa massa molecular que rapidamente penetram em vários tipos de células e são excretados rapidamente do corpo. Doses maiores e repetidas devem ser dadas com o intuito de manter o efeito terapêutico e isto, conseqüentemente, aumenta os efeitos adversos (Kalcic *et al.*, 1996). O uso de pró-fármacos poliméricos nos quais fármacos são covalentemente ligados à matriz polimérica garantem liberação controlada do fármaco, reduzindo a dose requerida e, por melhorar a localização do fármaco, diminui os efeitos tóxicos (Ouchi, Ohya, 1995; Wermuth, 1996; Yura *et al.*, 1998).

1.2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A oxamniquina, além dos efeitos adversos mais comuns como tonturas, cefaléia, náuseas e sonolência, pode provocar, em pacientes sensíveis, alucinações e até mesmo convulsões. Estes efeitos adversos, bem como o aparecimento de resistência, podem ser prevenidos pela obtenção de pró-fármacos.

De acordo com os argumentos anteriormente expostos, propõe-se o método de latenciação da oxamniquina, utilizando polímeros como transportadores, para obtenção de pró-fármaco que atue no organismo com melhor tolerabilidade, menores efeitos adversos e biodisponibilidade ótima.

Na obtenção destes pró-fármacos, serão utilizados polímeros bioestáveis como transportadores. Entre eles, podem-se citar os derivados do ácido acrílico e metacrílico que são biocompatíveis, não tóxicos, não carcinogênicos e os produtos de eliminação são solúveis nos fluidos biológicos, ocasionando fácil eliminação pelos rins.

Pretende-se utilizar espaçantes entre o fármaco e o polímero com o intuito de aumentar a flexibilidade e mobilidade da molécula e minimizar o impedimento estérico dos grupos vizinhos, facilitando a clivagem enzimática e a ação farmacológica.

Os espaçantes selecionados para este estudo (ácido aminocapróico-ACA, ácido amibutírico-GABA e a glicina-Gly) são aminoácidos e apresentam, em sua estrutura, números variáveis de carbonos, com apenas dois grupos funcionais: um amino e outro ácido. Dois critérios foram utilizados para a seleção dos aminoácidos: o tamanho da cadeia carbônica (ACA com 6 carbonos, GABA com 4 carbonos e Gly com 2 carbonos) e a disponibilidade de grupos funcionais para ligação do fármaco ao polímero. Destaca-se a utilização do espaçante GABA por suas possíveis

propriedades inibitórias no sistema nervoso central. É conhecido que a oxamniquina pode provocar convulsões em indivíduos pré-dispostos. A administração simultânea de um neurotransmissor inibitório, pode favorecer a reversão deste quadro.

Espera-se que a partir da introdução do espaçante na síntese dos derivados, compostos com propriedades diferentes entre si sejam obtidos. Com os monômeros formados, várias combinações copoliméricas serão planejadas a fim de se obter derivados poliméricos com propriedades físico-químicas distintas, que possam ser avaliadas.

Planeja-se o uso de outros monômeros vínilicos para ligação à oxamniquina, com posterior polimerização e copolimerização. Estudos recentes têm relatado a utilização da hidroxipropilmetacrilamida (HPMA) como transportador de fármacos. Pretende-se, então, a incorporação da oxamniquina neste tipo de matriz polimérica.

Pretende-se, ainda, modular a solubilidade do copolímero ácido poli(metacrílico-co-metacrilato de oxamniquina (derivado polimérico obtido anteriormente), por meio da introdução de unidades vinilpirrolidonas, que fornecem controle excelente na solubilidade destes materiais poliméricos (Elvira *et al.*, 2000; Gallardo *et al.*, 2001).

Em suma, o objetivo final é a obtenção de pró-fármacos poliméricos da oxamniquina utilizando ácidos poliacrílico e polimetacrílico como transportadores e aminoácidos como espaçantes.

CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESQUISTOSSOMÍASE

2.1.1 GENERALIDADES

A esquistossomíase é doença existente desde muitos séculos atrás. É, pelo menos, tão antiga quanto a própria civilização egípcia. Existem referências à doença em papiros e múmias egípcias, além de inscrições babilônicas datadas do século X. De fato, relatos indicam que a esquistossomíase era comum por volta de 2000 a.C. (FIGURA 1) (Jordan, 2000).



FIGURA 1 – Hieroglifo egípcio proveniente do Papiro de Ebers (1500 a.C.), representando a doença *aaa* – atualmente interpretado como hematúria (Fonte: Jordan, 2000).

Foi o alemão Theodor Bilharz, em 1852, quem descreveu pela primeira vez o agente etiológico da esquistossomíase, ao qual, primeiramente deu o nome de *Distoma haematobia* (Shekar, 1991). Posteriormente, Weinland denominou o mesmo helminto de *Schistosoma*, uma vez que o macho apresenta o corpo fendido (*schisto* = fenda; *soma* = corpo), sendo este gênero aceito até hoje (Neves, 1988).

A esquistossomíase originou-se primeiramente na África. As espécies do gênero *Schistosoma* chegaram às Américas durante o tráfico de escravos e com os imigrantes orientais e asiáticos (nos quais foram detectados numerosos indivíduos parasitados pelo *S. japonicum* e *S. haematobium*). Entretanto apenas o *S. mansoni* aqui se fixou, seguramente pelo encontro de bons hospedeiros intermediários e condições ambientais semelhantes às da região de origem (Loureiro, 1989).

No Brasil, a doença é popularmente conhecida como "xistose", "barriga-d'água" ou "mal do caramujo", atingindo milhões de pessoas, numa das maiores regiões endêmicas dessa doença em todo o globo terrestre (Neves, 1988). Várias espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria sp* servem como hospedeiros intermediários. Na África, por exemplo, o *S. mansoni* é transmitido pelo *B. alexandrina*, *B. pfeifferi*, *B. camerunensis* e outras espécies pouco conhecidas. O hospedeiro intermediário mais importante nas Américas é *B. glabrata*, com *B. tenagophila* e *B. straminea* representando papel mais restrito na transmissão (Basch, 1976; Knight *et al.*, 2000).

Por ser doença crônica, é raramente diagnosticada em estágios recentes e torna-se problema ao desenvolvimento de homens e mulheres durante os anos mais produtivos de suas vidas. Está particularmente associada aos esquemas de desenvolvimento agrícola e hídrico. Doença típica de populações de baixo poder aquisitivo que não têm acesso às medidas de prevenção efetiva e vivem em condições que favorecem a transmissão (Engels *et al.*, 2002).

2.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Embora esforços tenham sido feitos para se avaliar o número de pessoas infectadas e sob risco de infecção, fatores como a natureza da transmissão e a falta de questionário sistemático tornam os dados de prevalência difíceis de serem obtidos. Estimativas precisas tornam-se ainda mais problemáticas quando se trata do número de pessoas efetivamente afetadas (Hagan, 1998). No entanto, calcula-se a existência de cerca de 200 a 300 milhões de pessoas infectadas por todas as espécies de *Schistosoma*, estando cerca de 652 milhões sob risco de contrair a doença e 500.000 mortes por ano são relatadas (Gibbons, 1992; WHO, 2003). Baseados nestas estimativas, 85% do número de pessoas infectadas estão no continente africano (Chitsulo *et al.*, 2000, Engels *et al.*, 2002).

As principais formas da esquistossomíase humana são causadas por 5 espécies de vermes, denominados esquistossomas. Esquistossomíase intestinal, devida à espécie *S. mansoni*, é prevalente em 54 países e territórios da África, Caribe, Mediterrâneo e América do sul (Southgate, 1997). O *S. intercalatum*, que também provoca problemas intestinais, é encontrado em 10 países africanos. As formas asiáticas da esquistossomíase intestinal são causadas pelo *S. japonicum* e *S. mekongi*, e são encontradas em vários países da Ásia (Chitsulo *et al.*, 2000). Esquistossomíase urinária, devida ao *S. haematobium*, afeta 53 países na África, Oeste do Mediterrâneo e Índia (Almeda *et al.*, 1994; Agrawal, 1997; Butterworth, Davidson, 1999).

A distribuição global da esquistossomíase (FIGURA 2) mudou significativamente nos últimos 50 anos devido ao sucesso alcançado nos programas de controle na Ásia, Américas, norte da África e Mediterrâneo (Magnussen, 2003). A esquistossomíase foi erradicada do Japão e de algumas ilhas das Antilhas. A transmissão cessou na Tunísia, e é muito baixa em Marrocos, nas Filipinas (Leonardo *et al.*, 2002), Arábia Saudita e Venezuela (Engels *et al.*, 2002; WHO, 2003).

A FIGURA 2 ilustra a distribuição geográfica mundial das principais esquistossomíases.

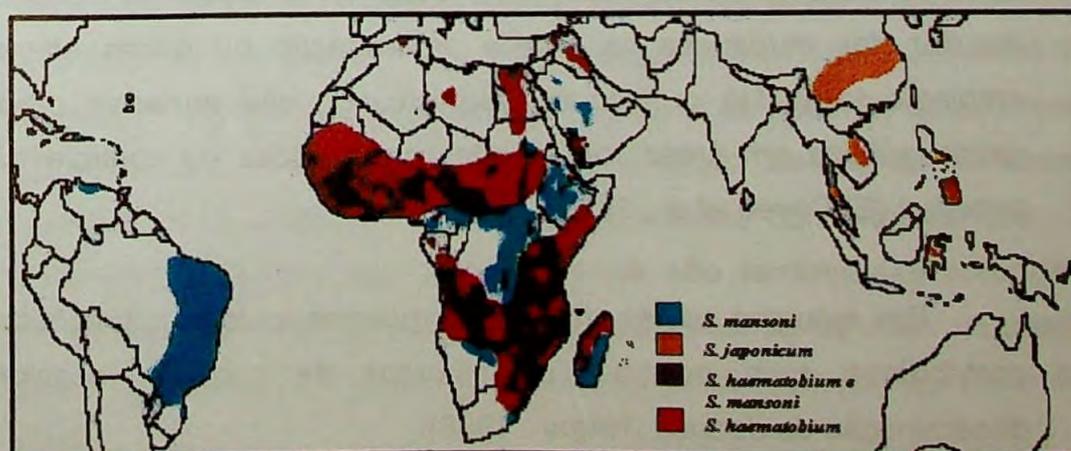


FIGURA 2 – Distribuição mundial da esquistossomíase (Fonte: WHO, 2003).

Enquanto existem argumentos para que o otimismo seja cauteloso, quanto à situação global, muitas dificuldades ainda restam. Apesar de as atividades de controle resultarem em declínio do número de casos de esquistossomíase, mudanças ambientais ligadas ao desenvolvimento de recursos hídricos, ao aumento da população e aos movimentos populacionais têm levado à disseminação da doença em regiões de baixa ou nenhuma endemicidade, particularmente na África sub-Saara (Engels *et al.*, 2002). Exemplo disso é que, após a construção da barragem do Diama na bacia do Rio Senegal nos anos 80, houve disseminação dramática da esquistossomíase intestinal nas regiões de Mauritânia e Senegal, que ainda não foi controlada (Ernould, Sellin, 1999). Entre 1950 e 1990, o número mundial de barragens cresceu de 5.000 para mais de 36.000, com o conseqüente aumento da esquistossomíase. Refúgios e migrações populacionais na África também introduziram esquistossomíase intestinal na Somália e recentemente em Djibout (Southgate, 1997; WHO, 2003; Magnussen, 2003).

Estudos conduzidos no Egito, em 1992, estimaram a prevalência da infecção de *S. mansoni* e *S. haematobium*, em áreas recuperadas destinadas à agricultura. Quando comparado com estudo prévio conduzido em 1985, a prevalência da infecção de *S. mansoni* em áreas recuperadas no Egito, cresceu de 21,7% para 42,1% nos últimos sete anos, enquanto que o *S. haematobium* diminuiu de 7,8% para 1,7%. Estas tendências podem resultar das mudanças na prática de irrigação ou outras alterações no ambiente local. Há o risco da esquistossomíase tornar-se problema de saúde pública em áreas recuperadas se medidas de controle não forem tomadas (El-Sayed *et al.*, 1995).

Em algumas partes do mundo, guerras civis e migrações forçadas contribuíram para derrubar os esforços de controle, ocasionando a disseminação da doença (Hagan, 1998).

No Brasil, o rápido crescimento das cidades e também a falta de recursos impedem que as atividades sanitárias, como suprimentos seguros de água e rede de esgoto adequada, cheguem às áreas peri-urbanas. Se toda a população tivesse acesso a infra-estrutura adequada, a esquistossomíase estaria erradicada. Entretanto, as grandes obras, que ficam escondidas, não têm interesse político. Em compensação, programas baseados na quimioterapia têm contribuído para o declínio de casos graves da doença, apesar de estimar-se que quase 8 milhões de pessoas ainda estejam infectadas (Hagan, 1998). A mortalidade devido à esquistossomíase reduziu em 56% entre 1979 e 1997. Em crianças de 0-14 anos, o decréscimo foi de quase 87%. Entre 1984 e 1997, hospitalizações devido à esquistossomíase diminuíram cerca de 43% em todas as faixas etárias (WHO, 2003).

É conhecido que mudanças ambientais e climáticas podem influenciar fortemente na endemecidade de doenças ocasionadas por caramujos (Van Jaarsveld, Chown, 2001). Conforme mencionado anteriormente, a construção de barragens e represas, especialmente no continente africano, sem dúvida nenhuma, gerou grande deslocamento na epidemiologia da esquistossomíase. Atualmente, a tendência mundial é a elaboração de "mapas de risco". Estes mapas são modelos de transmissão que cruzam dados epidemiológicos e biológicos do vetor com informações ambientais através de sistemas de informações geográficas (SIG) e levantamentos por satélites (Malone *et al.*, 2001). Algumas regiões do mundo, incluindo o Brasil, já estão montando seus mapas de avaliação de risco da esquistossomíase (Bavia *et al.*, 2001). No entanto, outras áreas de grande endemecidade, como a África, possuem poucos estudos neste contexto (Brooker, 2002). Cientistas enfatizam que estas técnicas são ferramentas potenciais para programas de controle do parasita e podem tornar-se úteis na predição de epidemias relacionadas às variáveis ambientais (Bergquist, 2001; Brooker, 2002).

2.1.3 MEDIDAS DE CONTROLE

As estratégias de controle da esquistossomíase devem ser planejadas observando as particularidades de cada país endêmico, de acordo com seus objetivos, recursos e capacidade gerencial do Ministério da Saúde, respeitando diferenças ao nível local, regional e nacional, visando reduzir morbidade e controlar a transmissão (WHO, 1993). Programas de controle nacional têm sido instituídos em vários países e muitos deles têm tido sucesso na redução do impacto geral das doenças em suas áreas endêmicas (Giboda, Bergquist, 1999; Zhang, Wong, 2003; Magnussen, 2003). Entretanto, os custos destes programas são bastante altos, o que não os tornam acessíveis a todos os governos ou mesmo comunidades (Guyatt, 2003).

O organograma do controle da esquistossomíase está representado de maneira geral na FIGURA 3. Segundo Katz (1999), dois aspectos são essenciais no controle da doença: morbidade e transmissão. Para o controle da morbidade, que visa diminuir o aparecimento de casos da forma grave, o diagnóstico e tratamento são suficientes. Já para o controle da transmissão, que visa interromper o ciclo evolutivo do parasita, apenas o tratamento é insuficiente. São necessárias obras de infra-estrutura sanitária, possibilitando suprimentos adequados de água, obras que modifiquem o meio ambiente e a correta eliminação de dejetos, impedindo que os mesmos contaminem os recursos hídricos. Outra medida importante é a educação sanitária, fazendo com que a população se conscientize do problema e também modifique seu comportamento.



FIGURA 3 – Organograma do controle da esquistossomíase.

No Brasil, após mais de 20 anos de programa de controle de esquistossomíase, a quimioterapia tem se mostrado ferramenta muito importante no controle da morbidade e no decréscimo da prevalência e na incidência em áreas endêmicas (Disch *et al.*, 2002). No entanto, a médio e longo prazo, saneamento, controle químico do caramujo, suprimentos seguros de água, captação de esgoto e educação sanitária parecem ser as verdadeiras ferramentas quando o objetivo é o controle persistente e definitivo da esquistossomíase (Katz, 1999; Chitsulo *et al.*, 2000; Coulter, 2002).

Argumentos *economicistas* dizem que nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento os recursos financeiros são escassos, o que torna inviável a aplicação em saneamento básico. Embora o investimento inicial seja grande, o retorno em benefícios para a população seria muito melhor. Além da economia alcançada, evitando novos gastos com diagnóstico e tratamento, as obras sanitárias previnem não só a esquistossomíase, mas também outras doenças (Katz, 1999).

Como o controle da esquistossomíase é necessidade de saúde pública, todos os governantes de áreas endêmicas devem ser encorajados a intervir em seu controle. Enquanto isto, autoridades locais devem criar condições para o controle da doença; organizações externas poderiam fomentar, com recursos, estas intervenções. Agências financiadoras, especialmente o Banco Mundial, têm sustentado todas as principais iniciativas para o controle da esquistossomíase durante as duas décadas passadas (Zhang, Wong, 2003). O grande problema é que em vários países, estes créditos não estão disponíveis, seja por desinformação ou mesmo por condições burocráticas (Guyatt, 2003). Condições para o acesso a estes créditos deveriam ser largamente publicadas e tornarem-se mais flexíveis. A maioria das regiões endêmicas está entre as menos desenvolvidas, cujo sistema de saúde depara com condições graves para fornecer cuidados básicos em primeiro nível (Chitsulo *et al.*, 2000).

O controle da esquistossomíase é viável. E isto pode se tornar realidade num futuro próximo, basta que governantes e instituições financiadoras conscientizem-se do problema e firmem um compromisso com a saúde da população. Hagan (1998) em seu artigo afirma que " ... Intervenções em saúde custam dinheiro, mas a falta de intervenção pode custar ainda mais...".

2.1.4 CICLO EVOLUTIVO E PATOGENIA

Pessoas se infectam pelo contato com águas contaminadas durante suas atividades diárias para propósitos pessoais ou domésticos, como higiene e recreação, ou atividades profissionais, como pesca, agricultura e irrigação (WHO, 2003).

Devido a falta de informação ou atenção insuficiente à higiene, indivíduos infectados contaminam seu ambiente. Os ovos de *Schistosoma* nas fezes de uma pessoa infectada entram em contato com a água e liberam

a larva, o miracídeo. Para sobreviver, a larva precisa encontrar um caramujo. Encontrado, o miracídeo divide-se neste hospedeiro em vários ciclos, para eventualmente produzir milhares de novos parasitas (cercárias). Estas novas entidades são liberadas do caramujo para ambientes hídricos e com bastante luminosidade. As cercárias, pelo emprego de uma enzima proteolítica, denominada elastase cercariana (McKerrow, Salter, 2002), penetram em questão de minutos (7-10) na pele de humanos e outros mamíferos, transformando-se em esquistossômulos. Após três dias atingem a corrente sangüínea e são levados aos pulmões pela pequena circulação. A partir do oitavo dia de infecção, os vermes adultos, macho e fêmea, deslocam-se para o sistema porta-hepático. Em torno do vigésimo quinto dia, os vermes amadurecem, acasalam-se e migram para as veias mesentéricas inferiores, onde as fêmeas iniciam a oviposição (200 a 2000 ovos). Os primeiros ovos são vistos nas fezes após o quadragésimo dia de infecção. O processo de migração e maturação pode levar de 4 a 6 semanas, dependendo do hospedeiro e parasita envolvidos. Durante este tempo, várias mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas ocorrem no parasita, permitindo adaptação frente aos vários tecidos do hospedeiro. Muitos ovos passam através da parede intestinal ou da bexiga e são descartados nas fezes ou urina. O ciclo biológico é completado quando os ovos eclodem e liberam os miracídios que por sua vez, reinfectam outros caramujos de água fresca. Por outro lado, ao invés de serem excretados pelo hospedeiro, alguns ovos podem alojar-se nos tecidos pelos quais passam. Mais do que o parasita por si, é a presença destes ovos retidos e, em particular, a resposta inflamatória aos ovos alojados no fígado, bexiga ou ureteres, que são responsáveis por grande parte da patogenia associada à esquistossomíase (Neves, 1988; McManus, 1999).

Nas suas localizações preferenciais no organismo, os vermes causam pouca ou nenhuma resposta inflamatória. Os ovos são depositados nas menores vênulas que consigam acomodar um verme fêmea, onde originam forte resposta granulomatosa que resulta na extrusão dos ovos para o lúmen

intestinal ou para bexiga. A patologia está principalmente relacionada com os locais de oviposição, número de ovos depositados e a reação do hospedeiro aos seus antígenos. Os sintomas da esquistossomíase resultam primariamente da penetração da cercária (dermatite cercariana), início da postura de ovos (esquistossomíase aguda ou febre de Katayama) e como complicações de estágios posteriores de proliferação tecidual e reparo (esquistossomíase crônica) (Fritsche, Smith, 1999).

A doença é diagnosticada tanto pela presença de sangue na urina (esquistossomíase urinária), levando eventualmente ao câncer de bexiga ou problemas renais ou, no caso da esquistossomíase intestinal, por sintomas atípicos iniciais como diarreia (sangüinolenta) intermitente, que pode levar a graves complicações hepáticas e esplênicas. Pessoas tornam-se profundamente debilitadas pela doença. Estes fatores, portanto, causam sérias conseqüências no desenvolvimento sócio-econômico de regiões tropicais e subtropicais (Hagan, 1998; WHO, 2003).

No caso da esquistossomíase intestinal, os vermes residem nos vasos mesentéricos inferiores do intestino. Na esquistossomíase urinária, eles vivem nos vasos sangüíneos da bexiga. Apenas cerca da metade dos ovos são excretados nas fezes (esquistossomíase intestinal) ou na urina (esquistossomíase urinária). O restante é encontrado nos tecidos corpóreos onde formam o chamado granuloma, que consiste na substituição gradual do tecido de origem (seja do intestino, bexiga ou qualquer outro tecido) por colágeno, resultando em fibrose e cicatrização (Fritsche, Smith, 1999).

Entretanto, existem vários relatos de localizações ectópicas, representadas pela infestação por parasitas no fluido broncoalveolar (Abdulla *et al.*, 1999), neuroesquistossomíase, (Fowler, 1999; Lambertucci *et al.*, 2000; Junker *et al.*, 2001; Mosunjac *et al.*, 2002) e esquistossomíase do trato genital masculino e feminino (Soans, Abel, 1999; Poggensee *et al.*, 1999; Mosunjac *et al.*, 2002).

2.1.4.1 Esquistossomíase e AIDS

Existem apenas alguns estudos sobre a interação entre HIV e esquistossomíase (Karanja *et al.*, 1997; Arya, Hart, 1998; Lambertucci, 1998; Fontanet *et al.*, 2000; Yoder *et al.*, 2000; Karanja *et al.*, 2002; Coulter, 2002; Mosunjac *et al.*, 2002). Esquistossomíase é mais comum em áreas rurais e novas deflagrações são freqüentemente associadas com desenvolvimento agrícola e projetos de irrigação. Em contraste, a epidemia da AIDS foi, até recentemente, problema predominante em áreas urbanas (Mertens *et al.*, 1994). Entretanto, com a extensão da epidemia do HIV para as áreas rurais de alguns países tropicais (especialmente a África) durante a última década, pode ocorrer que em algumas regiões onde a esquistossomíase é endêmica passem a ser também endêmicas para infecções por HIV.

Estudos realizados no Quênia observaram a co-infecção entre esquistossomíase e AIDS. Segundo estes estudos, acredita-se que em pessoas co-infectadas com *S. mansoni* e HIV, a excreção de ovos de *Schistosoma* é significativamente menor que em pessoas infectadas por *Schistosoma* e HIV-negativos (Karanja *et al.*, 1997; Yoder *et al.*, 2000; Fontanet *et al.*, 2000). Uma das explicações para isso é que o transporte dos ovos através da parede intestinal é dependente essencialmente de células T CD4⁺. Em pacientes HIV-positivos, a quantidade dessa linhagem de células está bastante reduzida. É, então, evidente a necessidade de um sistema imune intacto para a excreção de ovos (Karanja *et al.*, 1997; Yazdanbakhsh, Deelder, 1998). Assim, é importante atentar para o aumento do risco de resultados falso negativos no diagnóstico da esquistossomíase, pelo exame de fezes (direto), em indivíduos HIV-positivos (Fontanet *et al.*, 2000). Urge, portanto, que se detecte, com certeza, a possibilidade de infecção oportunística entre AIDS e a esquistossomíase, à semelhança do que ocorre com a tuberculose.

Estudos têm sido realizados com o intuito de se verificar a existência de sensibilização do feto frente aos antígenos e anticorpos helmínticos durante a gestação. Aliados a estes estudos, existem outros onde pretende-se avaliar quais implicações ocorreriam ao sistema imune de crianças frente a doenças como a AIDS e a tuberculose. É conhecido que a memória imunológica adquirida durante uma gestação acometida por helmintos, parece levar à diminuição da imunidade do tipo 1, aquela induzida por vacina. Mas ainda não se sabe o que poderia ocasionar esta baixa imunidade em relação a outras doenças infecciosas. Investigações imunológicas devem ser realizadas para obter-se maiores informações (Markus, Fincham, 2000; Markus, Fincham, 2001).

2.1.5 DIAGNÓSTICO DA PATOLOGIA

O diagnóstico da esquistossomíase, aos níveis de estudos individual e epidemiológico, é realizado através de técnicas parasitológicas (método direto), como a demonstração de ovos nas fezes (Eberl *et al.*, 2002) e, por testes sorológicos (método indireto) que incluem a detecção de anticorpos específicos ou doseamento de antígenos circulantes (Yazdanbakhsh, Deelder, 1998; Fritsche, Smith, 1999). No caso de infecções graves, onde existe alta descarga de vermes, acompanhada pela alta excreção de ovos, o diagnóstico por técnicas parasitológicas é relativamente fácil. Mas, quando as infecções são relativamente brandas, a demonstração de ovos nas fezes pode ser muito difícil. A baixa sensibilidade do método, o requerimento de técnicas de concentração como filtração e sedimentação, e a necessidade de exames repetitivos tornam o exame direto demorado e dispendioso, inviabilizando a utilização do método para estes casos (Van Lieshout *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2002).

Assim, os testes sorológicos ou indiretos podem ser úteis para avaliar pessoas que são suspeitas por terem viajado para áreas endêmicas ou provenientes das mesmas, aquelas nas quais os exames de fezes ou de

urina apresentam-se negativos, embora em risco de infecção e também para a monitorização da resposta ao tratamento. Ou seja, infecções leves e recentes podem ser identificadas facilmente por estes métodos, tendo em vista sua alta sensibilidade (Fritsche, Smith, 1999). Nestes casos são usados dois métodos para o diagnóstico: o ELISA (Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima), que demonstra anticorpos IgG direcionados contra os antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni*; e o IFA (Ensaio de Imunofluorescência), que é usado para demonstração de anticorpos IgM, direcionados contra antígenos encontrados no estômago do verme, o que torna este método sensível inclusive para estágios iniciais. A detecção de anticorpos é provavelmente o método mais valioso para determinação de resposta imune do hospedeiro em estudos epidemiológicos. Apesar da alta sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos, uma desvantagem importante é o fato de os níveis de anticorpos geralmente não informarem nada sobre a intensidade de infecção e níveis elevados de anticorpos serem ainda detectáveis muitos anos após o tratamento (Yazdanbakhsh, Deelder, 1998; Van Lieshout *et al.*, 2000).

Outro método sorológico é a detecção de antígenos circulantes. Parasitas vivos excretam vários antígenos diferentes na circulação do hospedeiro. Estes antígenos podem ser classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasita: antígenos cercarianos, antígenos dos ovos e antígenos do verme adulto, sendo estes últimos, os principais. A maioria das pesquisas têm se concentrado em dois glico-conjugados: Antígeno Circulante Anódico (CAA) e Antígeno Circulante Catódico (CCA) (Deelder *et al.*, 1994). São antígenos produzidos pelo epitélio estomacal do verme adulto e encontrados na urina, soro, leite (somente CCA), fígado, rins e baço (Van Lieshout *et al.*, 2000) do hospedeiro. Estes antígenos são detectáveis aproximadamente de 3 a 5 semanas após infecção, dependendo de sua intensidade. Após tratamento, os níveis de antígenos decrescem rapidamente. Além disso, vários estudos demonstram correlação significativa entre o nível de antígeno e o número de vermes adultos.

Além de CAA e CCA, vários outros antígenos circulantes, associados a diferentes estágios do ciclo de vida do parasita, têm sido estudados para sua aplicação em diagnóstico. Apesar de estes estudos, nenhum outro antígeno além do CAA e CCA têm sido avaliado para o diagnóstico de infecções recentes ou leves em populações humanas. (Van Lieshout *et al.*, 2000).

Atualmente existem métodos eficazes para diagnosticar patologias (anormalidades hepatoesplênicas e urinárias) relacionadas à esquistossomíase, bem como avaliar sua evolução após o tratamento e/ou pela interrupção da exposição aos vermes de *Schistosoma*. A fibrose hepática representa grave complicação de infecções por *Schistosoma*. Até algum tempo, a avaliação da extensão da fibrose hepática era feita por biópsia. Hoje, existem marcadores da fibrose hepática de baixo custo e não-invasivos, denominados produtos de síntese e degradação do colágeno. A quantificação destes marcadores pode ser útil na monitorização da fibrose após intervenções terapêuticas (Stone, 2000). A ultrassonografia é outro método bastante recente que permite obter informações confiáveis sobre a evolução da doença, especialmente no que diz respeito à influência da esquistossomíase na gravidez (Richter, 2000).

2.1.6 QUIMIOTERAPIA: FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS

2.1.6.1 Histórico

A esquistossomíase é doença que existe há milhares de anos, fato este comprovado por escritos sobre ovos calcificados de esquistossoma em rins de múmias egípcias. Desde aqueles tempos, já era indicado o uso de substâncias antimoniais no tratamento da hematúria, provavelmente causada pelo *S. hematobium*. Acredita-se que a quimioterapia moderna contra esquistossomíase tenha começado quando Christophersson (1918) relatou o tratamento bem sucedido da doença com tartarato de antimônio.

Compostos antimoniais de vários tipos foram, certamente, os medicamentos disponíveis mais usados até a Segunda Guerra Mundial (Brindley, 1994), quando então a lucantona foi introduzida na prática clínica. Na verdade, o uso dos antimoniais foi descontinuado devido ao baixíssimo índice terapêutico, perfil que está sendo melhorado pelo uso do composto encapsulado em lipossomas (Melo *et al.*, 2003).

Um período de progresso intenso começou nos anos 60, com a introdução do niridazol, hincantona, oxamniquina e metrifonato. Nos anos 70, houve grandes avanços na área da esquistossomíase com a descoberta do amoscanato, do oltipraz e o mais importante, do praziquantel. Algumas pesquisas empregaram o método da latenciação para aprimorar a atividade terapêutica da oxamniquina e diminuir seus efeitos adversos mediante uso de resinas de troca iônica (Korolkovas & Silveira, 1972) e de alguns tipos de polímeros (Silveira & Korolkovas, 1981). Desde então, nenhum outro avanço terapêutico foi alcançado, provavelmente por dois fatores: a disponibilidade de um fármaco relativamente efetivo e seguro; e a falta de investimentos no desenvolvimento de novos fármacos, provavelmente relacionado ao tipo de população afetada (Cioli *et al.*, 1995).

Estudos recentes demonstram atividade esquistossomicida promissora do imunossupressor ciclosporina A. A característica interessante do efeito esquistossomicida é que o fármaco parece ter propriedades profiláticas que duram por muito tempo (mais de 100 dias), o que pode fornecer oportunidade única para sobrepor a necessidade de tratamentos repetitivos (Bout *et al.*, 1984). Embora seu alto custo exclua o uso difundido, investigações estão sendo realizadas com o intuito de se elucidar o mecanismo de ação e possíveis efeitos adversos (Cioli, 1998; Doenhoff *et al.*, 2000)

Outros fármacos reconhecidos por suas propriedades antimaláricas, como as lactonas sesquiterpênicas (ginghaosu, artemeter, artesunato e

arteter) têm sido também testados contra esquistossomas *in vitro*, em animais e em pacientes. (Shuhua, Catto, 1989; Shuhua *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Shuhua, Chollet *et al.*, 2000). Estes compostos mostraram boa atividade profilática, especialmente contra esquistossomas imaturos (esquistossômulos) de *S. japonicum* e *S. mansoni* (Shuhua, Utzinger *et al.*, 2000). Apresentaram também efeitos esquistossomicidas contra outras espécies de *Schistosoma* (Yuanqing *et al.*, 2001; Shuhua, Binggui *et al.*, 2002) e ocasionaram efeitos adversos leves nos ensaios clínicos. Pelo fato de que estes fármacos são utilizados no tratamento da malária, o uso contra esquistossomíase deve ser avaliado frente ao risco de promover cepas resistentes de *Plasmodium sp* (Shuhua, Booth *et al.*, 2000; Shuhua, Utzinger *et al.*, 2001; Shuhua, Tanner, *et al.*, 2002).

O uso de plantas com fins terapêuticos é conhecido desde muitos anos. Estudo recente, realizado na África, revelou propriedades esquistossomicidas de várias plantas africanas. Entre elas podem citar-se *Berkheya speciosa*, *Euclea natalensis* e *Trichilia emetica* que mostraram-se letais aos esquistossômulos de *S. haematobium* (Sparg *et al.*, 2000). Algumas plantas do cerrado brasileiro também apresentaram atividade, desta vez moluscocida, contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Bezerra *et al.*, 2002).

O uso de compostos que interferem com a síntese de certos tipos de esteróides representa método potencialmente interessante na pesquisa de fármacos esquistossomicidas. Alguns testes preliminares *in vitro* produziram resultados promissores. Embora a síntese e a função destes esteróides em esquistossomas ainda não estejam estabelecidas, parecem ser alvo bastante atrativo, principalmente por não se encontrarem no hospedeiro (Foster, 1996; Cioli, 1998).

Estudos mostraram que o hormônio neuropeptídico somatostatina, usado para tratamento de varizes esofagianas e redução da pressão portal,

pode impedir a progressão de doenças hepáticas ao estado de fibrose. Segundo Chatterjee *et al.*, 2002, a somatostatina pode ter atividade terapêutica potencial contra esquistossomíase, com base nas observações recentes de que os sintomas de morbidade grave são associados a baixos níveis do hormônio em pacientes infestados por *Schistosoma mansoni*. A administração de doses exógenas deste neuropeptídeo poderia, portanto, atenuar a patologia causada pela esquistossomíase (Chatterjee *et al.*, 2002).

A FIGURA 4 ilustra os fármacos utilizados na terapia da esquistossomíase desde os seus primórdios.

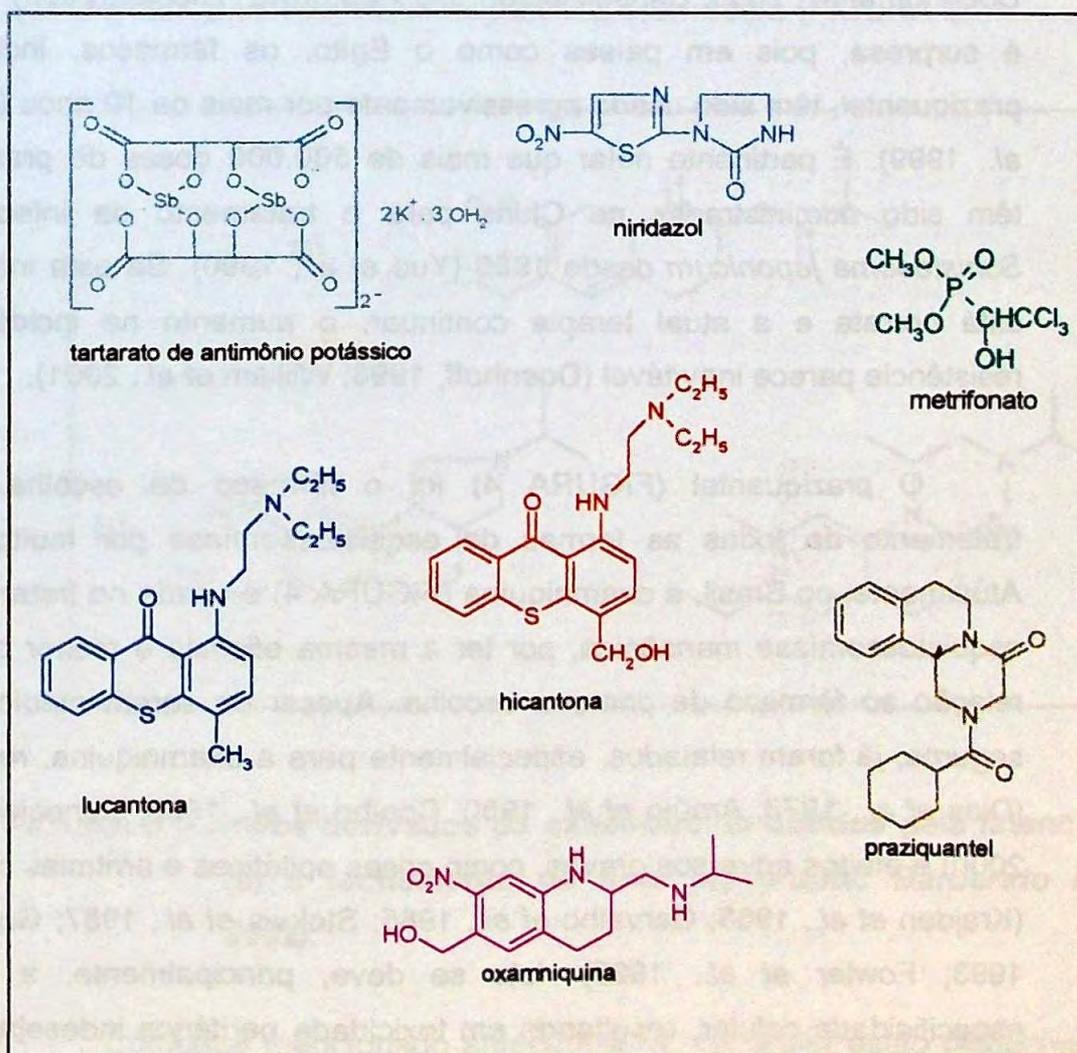


FIGURA 4 – Estrutura química dos principais fármacos esquistossomicidas.

A quimioterapia da esquistossomíase pode estar agora num ponto crucial. Poucos fármacos estão disponíveis para o tratamento da esquistossomíase (Silveira, 1981). Apenas os fármacos oxamniquina (Parise Filho *et al.*, 2001) e praziquantel (Utzinger *et al.*, 2002) estão em uso e com os recentes reajustes nos preços, é possível que apenas o segundo esteja destinado a permanecer no mercado mundial (Cioli *et al.*, 1995). Contar com apenas um fármaco é, certamente, situação perigosa, especialmente no que diz respeito à resistência. É preocupante que cepas de *S. mansoni*, em algumas áreas, parecem estar mostrando certo grau de resistência ao fármaco mais amplamente empregado, o praziquantel (Doenhoff, 1998; Doenhoff *et al.*, 2000; Danso-Appiah, De Vlas, 2002; Richter, 2003). Isto não é surpresa, pois em países como o Egito, os fármacos, incluindo o praziquantel, têm sido usado agressivamente por mais de 10 anos (Ismail *et al.*, 1999). É pertinente notar que mais de 500.000 doses de praziquantel têm sido administradas na China para o tratamento da infecção por *Schistosoma japonicum* desde 1980 (Yue *et al.*, 1990). Se esta informação está correta e a atual terapia continuar, o aumento na incidência de resistência parece inevitável (Doenhoff, 1998; William *et al.*, 2001).

O praziquantel (FIGURA 4) foi o fármaco de escolha para o tratamento de todas as formas de esquistossomíase por muito tempo. Atualmente, no Brasil, a oxamniquina (FIGURA 4) é usada no tratamento da esquistossomíase mansônica, por ter a mesma eficácia e menor custo em relação ao fármaco de primeira escolha. Apesar de serem medicamentos seguros, já foram relatados, especialmente para a oxamniquina, resistência (Dias *et al.*, 1978; Araújo *et al.*, 1980; Coelho *et al.*, 1988; Conceição *et al.*, 2000) e efeitos adversos graves, como crises epiléticas e arritmias cardíacas (Krajden *et al.*, 1983; Carvalho *et al.*, 1985; Stokvis *et al.*, 1987; Guitti *et al.*, 1993; Fowler *et al.*, 1999). Isto se deve, principalmente, a falta de especificidade celular, resultando em toxicidade periférica indesejada. Para tentar solucionar estes problemas, variedades sintéticas que sejam capazes de liberar o fármaco efetivamente no sítio alvo, que prolonguem a ação

terapêutica ou que atinjam níveis plásmaticos não tóxicos estão sendo desenvolvidos. Pró-fármacos poliméricos constituem possibilidade interessante (Soyez *et al.*, 1996).

A necessidade de novos fármacos é evidente. O custo do desenvolvimento de compostos seguros e efetivos é extremamente alto, chegando-se ao desânimo quanto ao sucesso na introdução de novo esquistossomicida no futuro (Silveira & Korolkovas, 1981; Cioli *et al.*, 1995). Recentemente, Barberato Filho (2002), obteve três novos derivados da oxamniquina, dois mediante fechamento de anel e um através da latenciação que exibiram atividade esquistossomicida promissora (FIGURA 5).

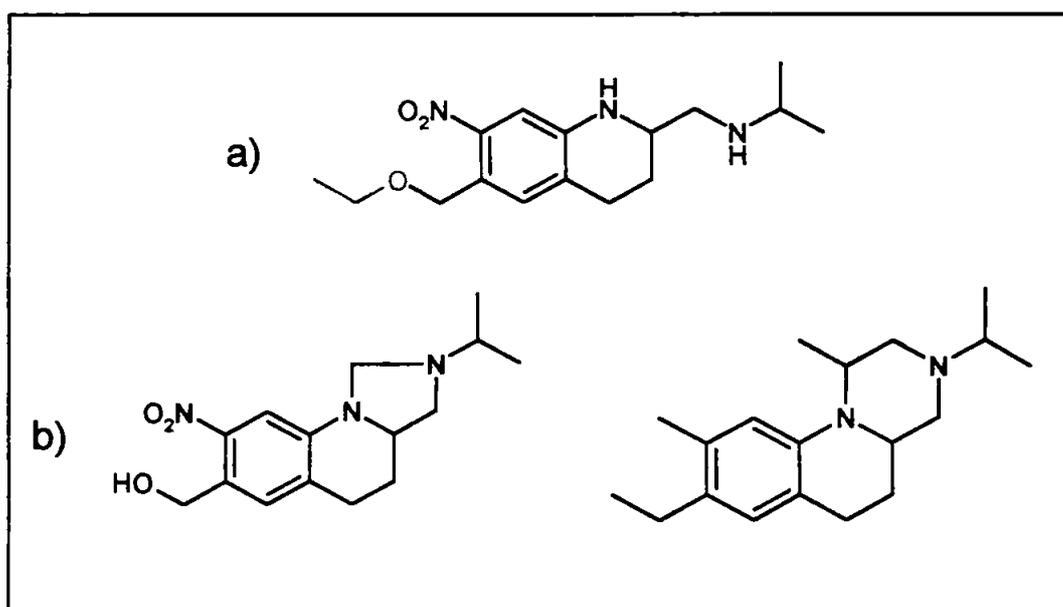


FIGURA 5 – Novos derivados da oxamniquina obtidos pela latenciação (a) e fechamento de anel (b) (Fonte: Barberato Filho, 2002).

Conforme mencionado anteriormente, no Brasil estão disponíveis no mercado apenas dois fármacos para o tratamento de infecções causadas

por *Schistosoma mansoni*: a oxamniquina e o praziquantel (TABELA I) (Korolkovas, 2000).

TABELA I – Características dos fármacos comumente usados no Brasil.

TERAPIA	FÁRMACOS	
	Oxamniquina	Praziquantel
Especialidades farmacêuticas	Mansil® cápsulas 250 mg Mansil® suspensão 50 mg/mL (Pfizer)	Cisticid® comprimidos 500 mg (Merck)
Posologia	Via oral, adultos e crianças acima de 30 kg, 15 mg/kg, em dose única (máxima, 1,25 g); crianças abaixo de 30 kg, 20 mg/kg, em duas doses de 10 mg/kg em um único dia, com intervalo de 3 a 8 horas entre as doses.	Adultos e crianças: via oral, 20 mg/kg, três vezes, em um dia de tratamento; o intervalo entre as doses deve ser de 4 a 6 horas.
Indicações	Tratamento das formas intestinal e hepatoesplênica da esquistossomíase mansônica.	Indicado como segunda escolha no tratamento da esquistossomíase mansônica e como primeira escolha no tratamento da infecção causada pelas demais espécies de <i>Schistosoma</i> .
Contra-indicações	Gravidez; lactação; insuficiência hepática, renal e cardíaca descompensada; antecedentes convulsivos.	Hipersensibilidade ao praziquantel; gravidez; lactação; menores de 4 anos.
Reações adversas	- Tontura, sonolência, cefaléia; - Convulsões epileptiformes (raras); - Náuseas, vômito, dor abdominal, anorexia; - Urticária; - Alterações do eletroencefalograma; - Elevação das transaminases.	- Mal-estar, cefaléia, tontura, elevação da temperatura; - Desconforto abdominal, náusea; - Urticária.

2.1.6.2 Oxamniquina

2.1.6.2.1 Histórico

Interesse na série mirasano (FIGURA 6) foi revivido nos laboratórios Pfizer (Sandwich, Inglaterra) num projeto de esquistossomíase que foi estabelecido em torno dos anos 60 (Richards, Foster, 1969). Após inúmeras tentativas de substituições de vários anéis e cadeias laterais, maiores desenvolvimentos foram concentrados no designado UK-3883 (FIGURA 6). Este composto foi ativo oralmente e cerca de 3 vezes mais potente que o mirasano. Experiências anteriores na série da lucantona sugeriu que o 6-hidroximentil derivado do UK-3883 poderia ser o metabólito ativo. Este derivado foi encontrado na urina de animais tratados e provou possuir alta potência em cobaias. Era produzido por oxidação microbiana do UK-3883 pelo *Aspergillus sclerotiorum*, com a designação inicial de UK-4271 e o nome subsequente de oxamniquina (Baxter, Richards, 1971).

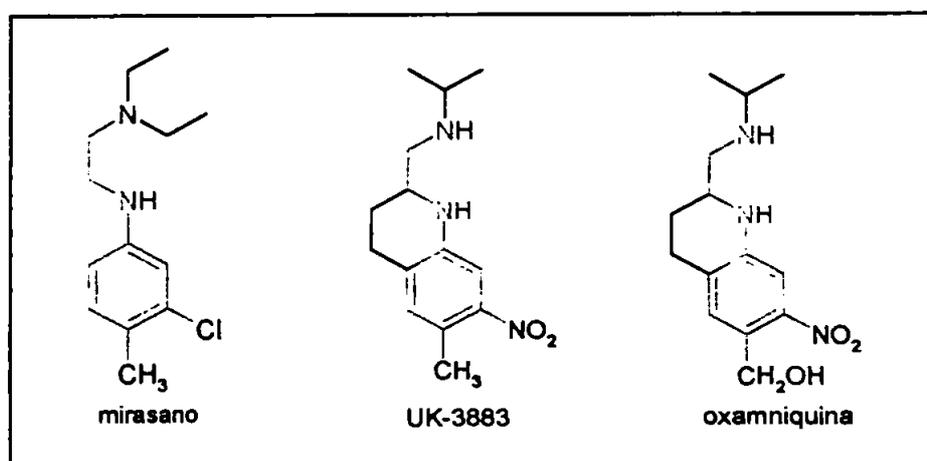


FIGURA 6 – Oxamniquina e precursores.

2.1.6.2.2 Relações entre estrutura química e atividade biológica

Vários exemplos são conhecidos em que modificações estruturais de compostos biologicamente ativos resultam na obtenção de análogos também ativos. Além disso, o estudo de tais compostos podem fornecer informações úteis no que diz respeito à relação estrutura-atividade (REA) (Baxter, Richards, 1971). Aproveitando-se dos conhecimentos adquiridos durante o desenvolvimento e síntese da oxamniquina (FIGURA 7), pode-se chegar a possíveis conclusões no âmbito de sua REA (Patrick, 1994):

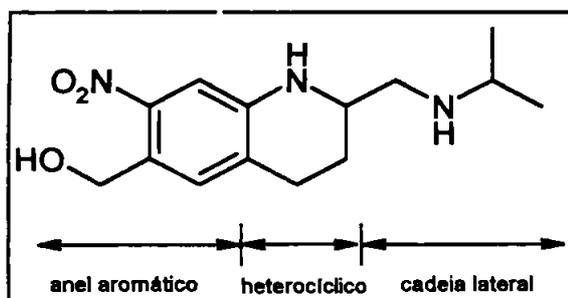


FIGURA 7 – Desenho esquemático da oxamniquina.

- O padrão de substituição no anel aromático não pode ser alterado e é essencial para atividade;
- O grupo nitro é essencial para atividade. Além de ser grupo parasitóforo é altamente eletronegativo, o que leva a diminuição da basicidade do nitrogênio do heterocíclico. Assim, o fármaco, *in vivo*, permanece menos ionizado e é capaz de passar através das membranas mais facilmente. Substituição por grupos menos eletronegativos diminuem a atividade;
- A atividade é máxima quando o grupo amino da cadeia lateral é secundário. Amina primária ou terciária reduzem a atividade;
- O grupo isopropil do nitrogênio da cadeia lateral pode ser substituído por grupo alquílico com até quatro carbonos, com correspondente aumento de atividade. Maior número de carbonos levam à redução da atividade;

- Grupos acila substituindo o grupo isopropila no nitrogênio da cadeia lateral eliminam a atividade;
- Ramificações no grupo alquílico, ligado ao nitrogênio da cadeia lateral, aumentam a atividade;
- Aumento da distância entre o nitrogênio da cadeia lateral e o anel heterocíclico com apenas um grupo metileno, elimina a atividade;
- O grupo 6-hidroximetil é essencial para a atividade.

A FIGURA 8 representa um receptor hipotético para a oxamniquina e as possíveis interações entre fármaco e receptor.

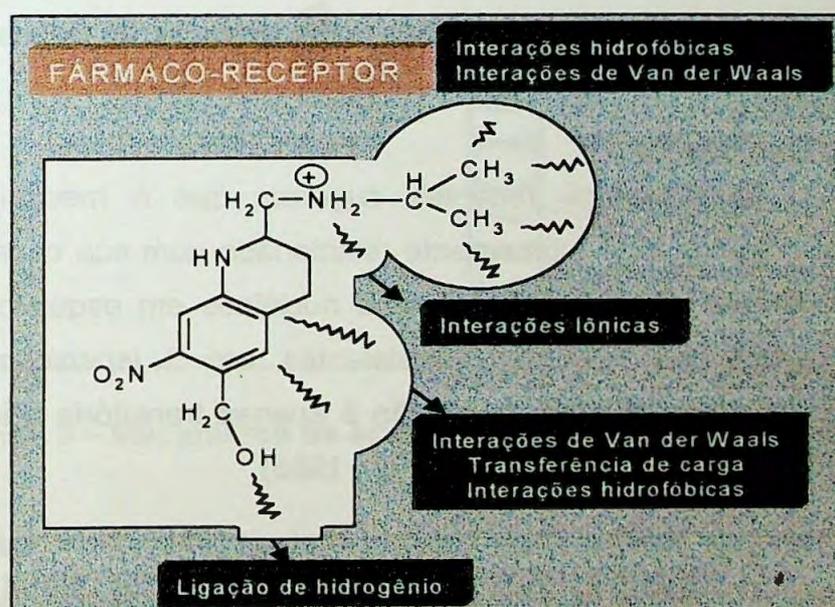


FIGURA 8 – Interações entre a oxamniquina e o receptor hipotético (Fonte: Patrick, 1994).

2.1.6.2.3 Farmacocinética

Oxamniquina administrada por via oral é rapidamente absorvida, metabolizada e excretada. Concentrações plasmáticas de 1-4mg/L são alcançadas em 1-4h e a meia-vida plasmática varia de 1,5 a 2h. O principal

metabólito (41-73% da dose) provém da oxidação do grupo 6-hidroximetil a um grupo carbonil, que é inativo. Outro metabólito, também inativo, resulta da oxidação da cadeia lateral para dar o ácido 2-carboxílico. A excreção acontece, em sua maior parte, na urina (Kaye, Woolhouse, 1976).

2.1.6.2.4 Farmacodinâmica

Uma das primeiras hipóteses do mecanismo de ação da oxamniquina foi baseado nos seus efeitos anticolinérgicos. Acreditava-se que o efeito anticolinérgico da oxamniquina era responsável por um aumento da atividade motora dos esquistossomas. O desarranjo na motilidade interrompe os mecanismos de peristaltismos e alimentação, ao ponto de causar a morte por fome. Mas esta teoria já foi descartada (Woolhouse, 1979).

Experimentos recentes sugerem que o mecanismo de ação da oxamniquina está intimamente relacionado com sua capacidade de inibição irreversível da síntese de ácidos nucleicos em esquistossomas sensíveis, enquanto que em vermes resistentes, em *S. japonicum* insensível e nas células de mamíferos, a inibição é apenas transitória (Pica-Mattoccia, Cioli, 1985; Cioli *et al.*, 1985; Cioli *et al.*, 1995).

O esquema mostrado na FIGURA 9 representa uma hipótese do mecanismo de ação da oxamniquina. Neste esquema, o fármaco é convertido em um éster (possivelmente sulfato, fosfato ou acetato) pela enzima específica do esquistossoma. Então o éster é dissociado espontaneamente, resultando num íon eletrofílico capaz de alquilar o DNA do verme. A formação deste íon ocorre através de uma única etapa metabólica. Acredita-se que a falta desta etapa parece estar relacionada com a capacidade dos vermes em adquirir resistência (Cioli *et al.*, 1995; Tracy, Webster, 1996).

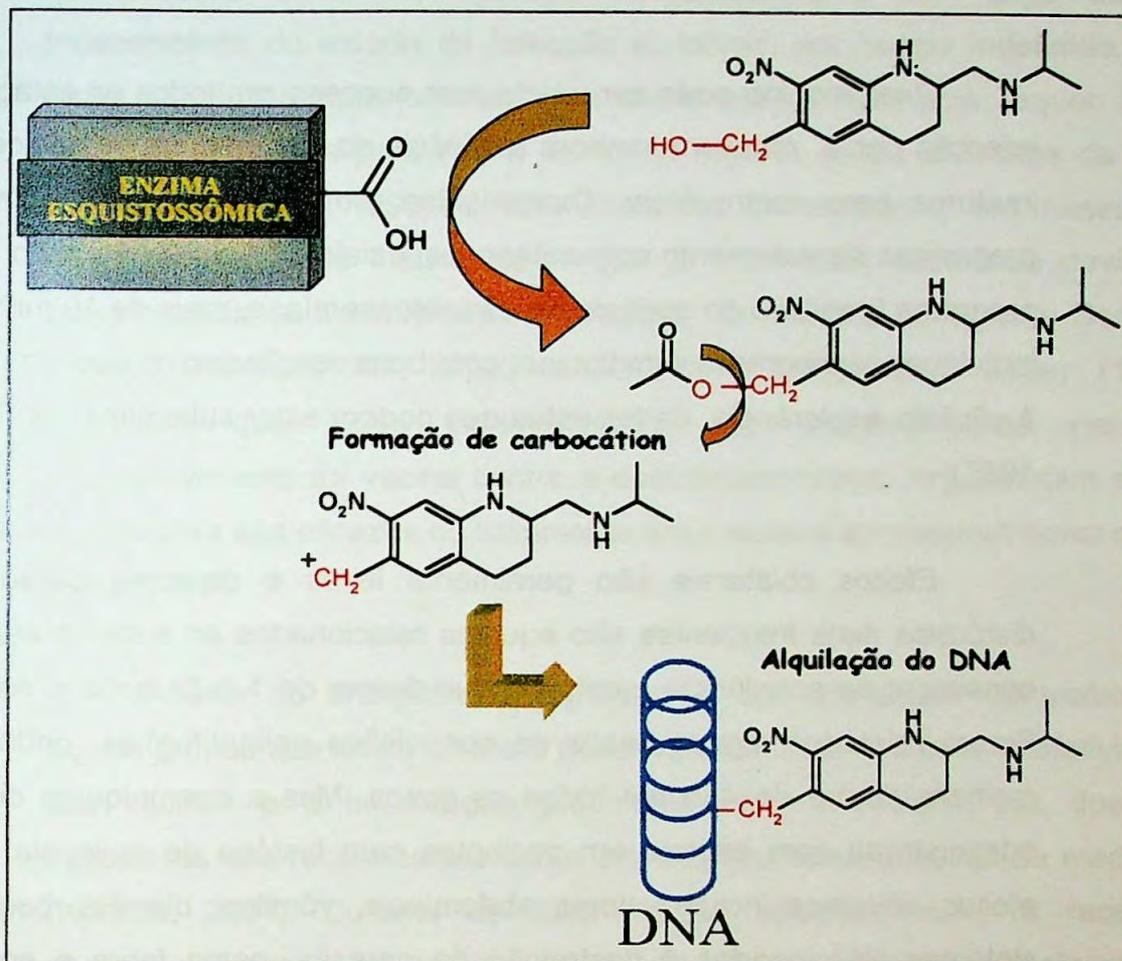


FIGURA 9 – Mecanismo de ação proposto para oxamniquina.

Por ser mecanismo bastante controverso, autores sugerem que o a provável ação deve-se à presença do grupo nitro no fármaco. A oxamniquina pertence à família dos nitroaromáticos e possivelmente o grupo nitro está diretamente envolvido no papel farmacológico. Ele confere característica especial à molécula, afetando os processos de biotransformação. A via metabólica de compostos nitroaromáticos gera um ânion radical que exibe propriedades citotóxicas em vários sistemas celulares (Radi, Belal, 1998).

2.1.6.2.5 Usos terapêuticos

Oxamniquina pode ser usada com sucesso em todos os estágios da infecção por *S. mansoni*, embora a eficácia do fármaco em esquistossomas imaturos gere controvérsia. Oxamniquina tem um excelente recorde nos programas de tratamento comunitário, especialmente na América do Sul. No programa brasileiro de controle da esquistossomíase, mais de 10 milhões de indivíduos receberam oxamniquina, com bons resultados no que diz respeito à eficácia e tolerância, dados estes que podem estar subestimados (Forster, 1987).

Efeitos colaterais são geralmente leves e de curta duração. Os distúrbios mais freqüentes são aqueles relacionados ao sistema nervoso e consistem de sonolência e cefaléia que duram de 1 a 5h após a dosagem. Foram relatados alguns casos de convulsões epileptiformes, onde houve melhora dentro de 48h em todos os casos. Mas a oxamniquina deve ser administrada com cautela em pacientes com história de epilepsia. Outros efeitos adversos incluem dores abdominais, vômitos, diarreia, bem como sintomas relacionados à destruição do parasita, como febre e eosinofilia (Cioli *et al.*, 1995).

2.1.7 BUSCA POR VACINAS EFICAZES

Nem a quimioterapia nem técnicas de controle do vetor têm sido capazes de reduzir os níveis de transmissão regional ao ponto de erradicar a esquistossomíase. O rápido ressurgimento da doença (reinfecção) ocorre quando as medidas de prevenção falham. Assim, novas estratégias para o combate desta doença parasitária são necessárias (James, Colley, 1995).

Um atributo da quimioterapia é que ela reduz a intensidade de infecção e a prevalência geral ao ponto de poucos indivíduos progredirem do estado avançado da doença. Entretanto, para sustentar estes efeitos, a

quimioterapia deve ser aplicada sistematicamente em larga escala, independente do estado da infecção e, talvez, por tempo indefinido. Isto torna a quimioterapia onerosa e a distribuição difícil, pois requer infraestrutura adequada para cobrir, de forma regular, todas as partes da área endêmica (Capron, 1998). O risco associado ao tratamento em massa é o desenvolvimento de resistência, o que já pode estar ocorrendo devido à baixa eficácia do tratamento com praziquantel relatada no Egito e Senegal (Fallon, Doenhoff, 1994; Ismail *et al.*, 1999). Bergquist e Colley (1998) acreditam que todos estes fatores são imprescindíveis para o desenvolvimento da vacina contra a esquistossomíase. Argumentam ainda que vacinas são eficazes no tratamento em massa e apresentam baixo custo (Katz, 1999).

Apesar do antagonismo periódico e das atividades alarmistas de alguns grupos que lutam contra o desenvolvimento de vacinas, a efetividade das vacinas e a imunização preventiva para a maioria das doenças infecciosas são reconhecidas como um dos grandes sucessos da medicina (Kurstak, 2001). Durante as duas últimas décadas, com os recentes desenvolvimentos em metodologias e conceitos de biologia molecular e imunologia, estudos para a produção de vacinas eficazes contra parasitas de importância clínica e veterinária têm tido crescimento acelerado, além de apresentarem resultados bastante satisfatórios contra muitas doenças (Doenhoff, 1998; Kurstak, 2001).

A busca por vacina eficiente contra esquistossomíase mostra-se como objetivo desejável, mas ainda desafiador. O progresso na área tem sido relativamente vagaroso, mas pesquisas demonstrando a capacidade de humanos adquirirem imunidade natural à infecção, juntamente com o sucesso conseguido no uso de vacinas de cercárias atenuadas em animais, suplementado com resultados obtidos com antígenos purificados e definidos, sugerem que o desenvolvimento da vacina é alcançável (McManus, 1999, 2000).

Um dos aspectos mais intrigantes em relação aos estudos nesta área é que, mesmo no melhor dos casos, a imunidade induzida por vacina nunca é completa, e a proteção parcial parece ser o desafio inerente para o descobrimento de uma vacina contra a esquistossomíase (Pearce, 2003). Entretanto, é aceito que uma vacina que induza resistência parcial e/ou que afete a fecundação e a viabilidade dos ovos seria de grande valor no controle da intensidade da infecção e, portanto, na gravidade da doença (Capron, 1998).

Embora várias substâncias protéicas candidatas à vacina tenham sido descritas e testadas em vários modelos animais, níveis reduzidos de proteção acabaram por impedir o desenvolvimento da maioria delas (Wynn, Hoffmann, 2000). Na metade dos anos 90, o programa de pesquisa e treinamento em doenças tropicais da OMS selecionou seis biomoléculas, promissoras candidatas à vacina, para testes. As seis biomoléculas selecionadas foram a enzima glutationa S-transferase de 28kDa, a qual está em estudos clínicos de fase II (Pearce, 2003), as proteínas musculares paramiosina, de 97kDa, e IrV-5, de 62kDa, além de três antígenos de membrana: isomerase triose fosfato de 28kDa, Sm23 e Sm14 (Bergquist, 1998; Katz, 1999; McManus, 2000).

Um dos mais confiáveis modelos experimentais para vacinação contra esquistossomíase é o da infecção prévia com cercárias atenuadas por radiação. A simples exposição às cercárias atenuadas em cepas de ratos, produziu proteção bastante forte contra a desafiadora infecção (James, 1995). Esta candidata, a qual é conhecida por mais de 20 anos, foi a linha de partida para supor que a vacina é possível (Pearce, 2003).

Outra vacina promissora está sendo produzida pelo Instituto Oswaldo Cruz em parceria com o Instituto Butantan, a qual mostrou grande eficácia contra várias espécies de *Schistosoma* (*S. mansoni*, *S. haematobium* e *S.*

japonicum) em testes realizados em animais. O principal componente do imunizante em estudo é a proteína conhecida como Sm14, que tem a capacidade de induzir memória imunológica, de forma que o organismo reconheça o invasor e produza quantidade de anticorpos suficiente para eliminá-lo (Fiocruz, 2000).

Cabe afirmar que a proteção conseguida pelos diversos antígenos citados não ultrapassa 60% e isto não se trata de proteção absoluta, mas somente redução de 60% da carga parasitária em relação a um controle não imune. Ou seja, todos os animais terão parasitos, só que em menor número. Os antígenos acima citados foram testados em animais de laboratório por grupos independentes (patrocinados pelo TDR-WHO) e o máximo de proteção real conseguida foi de 40% (Bergquist, 2002; WHO, 2003).

O desenvolvimento bem sucedido da vacina depende do entendimento claro sobre componentes celulares e humorais de respostas imunes obtidas com a infecção e a identificação de antígenos que engatilham respostas protetoras. O progresso notável conseguido na identificação e produção de antígenos potencialmente protetores contrasta com o ainda fragmentado conhecimento dos mecanismos e possíveis indicadores da imunidade contra doenças parasitárias no homem (Abath *et al.*, 1998).

Embora mecanismos de imunidade anti-esquistossoma tenham sido extensivamente examinados em vários modelos animais, bem como em estudos epidemiológicos, estes estudos falharam em fornecer uma direção consistente e coerente para o desenvolvimento de vacina contra esquistossomíase. Atualmente, acredita-se que o estabelecimento de uma resposta humoral e celular robusta é provavelmente a chave para gerar a imunidade máxima contra esquistossomíase (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2000), embora deva ser notado que estas conclusões são deduzidas exclusivamente de estudos conduzidos com vacina de cercárias atenuadas

em ratos. Estas informações enfatizam a importância de se avaliar ambos os perfis de resposta imune em humanos infectados e supostamente resistentes, tendo em vista sua necessidade de conhecimento antes que a mais efetiva estratégia de vacinação para esquistossomíase possa ser definida formalmente (Wynn, Hoffmann, 2000).

A década de 90 mostrou avanços consideráveis no desenvolvimento de vacinas, especialmente no que diz respeito às de DNA, talvez as mais excitantes. Vários estudos foram publicados relatando o uso de vacinas de DNA para proteção de ratos contra antígenos esquistossômicos (Waine *et al.*, 1999; Yang, 2000), mas apenas poucos relataram imunidade protetora bem sucedida (Zhang *et al.*, 2001, Da'dara *et al.*, 2001). O desenvolvimento de tecnologia de vacinação por DNA permanece como interessante área de pesquisa, devendo ser continuada apesar do sucesso limitado no campo da esquistossomíase até o momento (Pearce, 2003).

Quando comparada aos anos 80, a última década foi a do descobrimento de novos antígenos candidatos a uma possível vacina (Pearce, 2003). Segundo Kurstak (2001), o mundo está em uma nova era, a da *vacinologia*. Mas a vacina, quando descoberta, não poderá ser encarada como a cura definitiva. Deverá ser considerada como um componente importante da estratégia de controle da esquistossomíase, que complementa a quimioterapia, a educação para a saúde e a engenharia sanitária (Katz, 1999; McManus, 1999).

2.1.8 PERSPECTIVAS

Para o controle da esquistossomíase deve existir integração de esforços que incluem metodologias e ferramentas gerenciais para aperfeiçoar estratégias, e enfatizar a educação sanitária, informação, comunicação, além da melhoria das condições de higiene (Schall, 1998). Todavia, não existe evolução significativa em nenhum desses aspectos e o

mais provável é que, até se conseguir uma vacina efetiva, a quimioterapia continue tendo suma importância na redução da intensidade de infestação e, conseqüentemente, da morbidade e mortalidade. Destarte, assumem grande importância os estudos relacionados com a procura de pontos estratégicos de ataque, ou seja, de estruturas e sistemas presentes no helminto que não tenham correspondência no hospedeiro, para, a partir disto, planejar-se, de forma racional, novos quimioterápicos. Por outro lado, o aprimoramento daqueles em uso também é fator interessante na busca de novas armas contra a esquistossomíase.

Recentemente, Alger, Williams, 2002, apresentaram alvo bastante interessante para o desenvolvimento de agentes esquistossomicidas. Este ponto está relacionado com o sistema de destoxificação do parasita. Esquistossomas são expostos a espécies reativas de oxigênio por meio dos seus próprios processos respiratórios e da resposta imune do hospedeiro. Como resultado, o parasita deve possuir mecanismos adequados de destoxificação. Proteínas antioxidantes são expressas em altos níveis em estágios de estresse oxidativo (LoVerde, 1998). Curiosamente, a espécie *S. mansoni* não possui catalase e apresenta níveis relativamente baixos de glutathione peroxidase (GPx), duas enzimas capazes de destoxificar peróxido de hidrogênio (Mei, Loverde, 1997). No entanto, recentemente, Kwatia *et al.* (2000) demonstraram que a tioredoxina peroxidase (TPx-1) está presente em *Schistosoma mansoni* em níveis adequados. TPx-1 é membro de uma família de antioxidantes que está envolvida na destoxificação do peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos (McGonigle *et al.*, 1998). Para catalizar a redução de hidroperóxidos TPx-1 requer quantidades redutoras equivalentes de tioredoxina (Trx) (Kwatia *et al.*, 2000), a qual é mantida no estado reduzido pela tioredoxina redutase (TrxR). Portanto, a destruição do par Trx/TrxR poderia resultar em danos na função celular, tomando-se alvo bastante atrativo para o desenvolvimento de fármacos (Becker *et al.*, 2000).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998b), existe a necessidade constante de pesquisas nas seguintes áreas: desenvolvimento de vacina; ferramentas simples de aplicação em campo para o diagnóstico (teste para antígenos circulantes na urina e saliva); e busca continuada por fármacos no caso do possível desenvolvimento de resistência à oxamniquina e praziquantel.

Entretanto, mesmo com ferramentas eficientes como a quimioterapia, saneamento, suprimentos de água seguros, captação de esgoto, educação para saúde e vacina, quando disponíveis, devem ser implementadas de maneira racional, a fim de obter-se a erradicação total da doença sem ônus para população ou para o governo (Katz, 1999; Engels *et al.*, 2002).

2.2 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

2.2.1 LATENCIAÇÃO

Um dos métodos de planejamento mais empregado é a modificação molecular. Consiste em se partir de uma substância química de atividade conhecida como protótipo e, sintetizar e testar seus congêneres, homólogos e análogos estruturais. A modificação molecular apresenta grandes vantagens, incluindo: a grande probabilidade dos congêneres, homólogos e análogos terem propriedades farmacológicas similares e até mesmo superiores ao protótipo; síntese similar ao protótipo, economizando tempo e dinheiro; alguns dados podem elucidar relação estrutura-atividade e os ensaios biológicos são os mesmos usados para o protótipo (Korolkovas, 1988).

Existem vários processos, tanto gerais como especiais, para a modificação molecular. Dentro dos processos gerais o mais importante é a associação molecular. Consiste em se obter análogos mais complexos de um fármaco protótipo. Para isso, utiliza-se a adição, a replicação ou a hibridação molecular. Dentro dos processos especiais, podem ser citados métodos que alteram as dimensões e a flexibilidade da molécula e que alteram as propriedades físicas e químicas da molécula pela introdução ou substituição de determinados grupos (Korolkovas, 1988; Friis, Bundgaard, 1996).

A latenciação, termo proposto por Harper em 1959, é método especial de modificação molecular. Consiste na transformação química de um fármaco em uma forma inativa, pró-fármaco. Este requer conversão química e/ou enzimática *in vivo*, para então ocorrer a liberação do fármaco ativo (Friis, Bundgaard, 1996; Chung, Ferreira, 1999). Em linhas gerais, os pró-fármacos resultam de ligação temporária entre um agente ativo e um transportador. Reações hidrolíticas e/ou enzimáticas simples clivam este

transportador no momento correto. Estes tipos de pró-fármacos são por si, menos ativos que os compostos protótipos, ou até mesmo inativos. O grupo transportador deve ser escolhido por sua não-toxicidade e sua habilidade de garantir a liberação do princípio ativo (Wermuth *et al.*, 1996).

O conceito de pró-fármaco está representado na FIGURA 10.

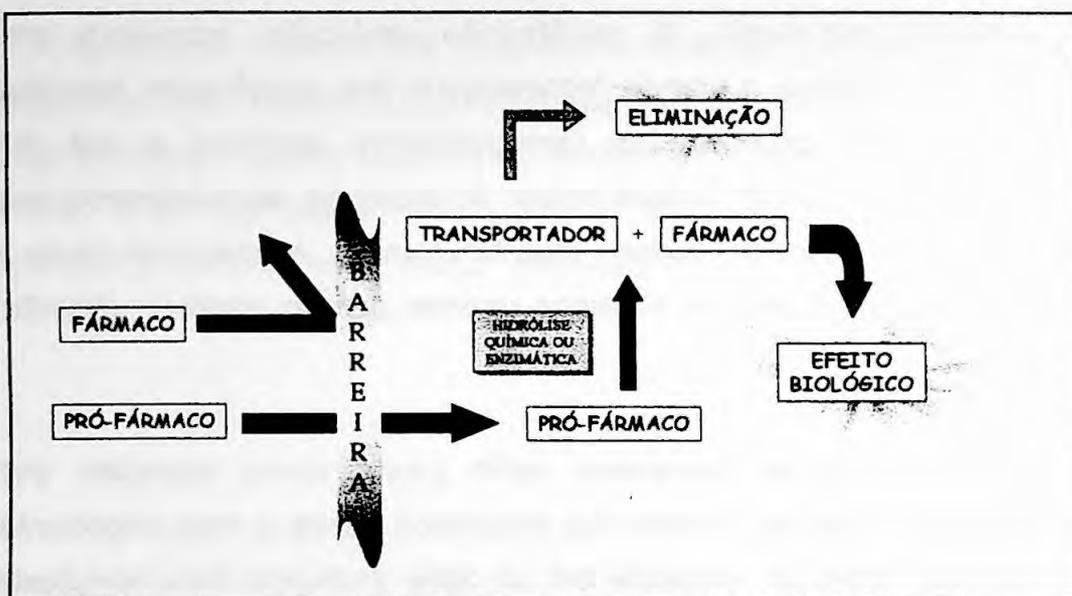


FIGURA 10 – Ilustração esquemática do conceito de pró-fármaco
(Fonte: Friis, Bundgaard, 1996).

Um fármaco que tem sua efetividade limitada por propriedades físico-químicas adversas, como a incapacidade de ultrapassar determinada barreira, é quimicamente modificado anexando-se molécula transportadora para gerar nova entidade química, o pró-fármaco, cujas propriedades são tais que o tornem capaz de atravessar a barreira limitante. Idealmente, a ligação entre o fármaco e transportador deve ser desenvolvida para clivagem eficiente por meios enzimáticos ou não, seguida de rápida eliminação do transportador (Stella *et al.*, 1985).

Numerosas barreiras podem limitar a efetividade clínica de um fármaco. Pró-fármacos são desenvolvidos para superar problemas relacionados com as fases farmacêutica, farmacocinética e até mesmo farmacodinâmica do fármaco protótipo (Testa, 1995).

Na fase farmacêutica, a barreira pode ser representada por problemas de formulação devido às seguintes propriedades: estabilidade química insuficiente, baixa solubilidade, cheiro ou odor inaceitáveis e irritação ou dor tissular (Testa, 1995; Friis, Bundgaard, 1996).

Na fase farmacocinética, isto é, absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco, os principais problemas encontrados são: (1) absorção incompleta do fármaco; (2) baixa biodisponibilidade sistêmica devido ao metabolismo pré-sistêmico; (3) absorção ou excreção muito rápida quando é desejado prolongamento de ação; e (4) baixa especificidade do fármaco pelo sítio de ação, resultando em uma distribuição desfavorável (Testa, 1995; Friis, Bundgaard, 1996).

Na fase farmacodinâmica, aquela onde o fármaco exerce sua ação propriamente dita, o problema mais frequente é a toxicidade periférica (Testa, 1995; Ranney, 2000). A maioria destes problemas são facilmente solucionados pelo método de latenciação.

Compostos bioativos e fármacos geralmente possuem número limitado de grupos funcionais polares, susceptíveis para síntese de pró-fármaco. Entre estes, os mais freqüentes são hidroxilas alcoólicas e fenólicas, grupo amino e função carboxilica (Wermuth *et al.*, 1996). Aproveitando estes grupos, pode-se preparar pró-fármacos por diversas maneiras, são elas: (1) por formação de ésteres, hemiésteres, carbonatos, carbamatos, N-bases de Mannich, amidas e enaminas; (2) introdução de grupos funcionais como azo, peptídeos, glicosídicos e éter; e (3) preparação

de polímeros, sais, complexos, acetais, hemiacetais e cetais (Johnson, Lloyd-Jones, 1987; Korolkovas, 1988; Friis, Bundgaard, 1996).

O desenvolvimento de pró-fármacos, na química medicinal, equivale ao desenvolvimento de grupos protetores na química orgânica. De fato, ambos os métodos tem muito em comum (Wermuth *et al.*, 1996). Assim como os grupos protetores na química orgânica, na química medicinal o aspecto mais importante dentro do planejamento de pró-fármacos é a natureza da ligação química entre o fármaco e o transportador. O conhecimento da natureza desta ligação pode explicar a origem do processo de biotransformação, sua localização em tecidos e células específicos e, a cinética de reconversão ao fármaco protótipo. A velocidade desta reconversão depende do objetivo específico do planejamento do pró-fármaco, podendo ocorrer antes, durante ou depois da absorção ou no sítio de ação do fármaco (Balant, Doelker, 1995). Normalmente a conversão do pró-fármaco ao fármaco protótipo dentro do organismo pode ocorrer por catálise enzimática e por variação de pH (Bundgaard, 1985; Balant, Doelker, 1995; Soyez *et al.*, 1996).

2.2.2 PRÓ-FÁRMACOS POLIMÉRICOS

Durante as duas últimas décadas, tem sido mostrado interesse crescente no que diz respeito à liberação de fármacos e ao desenvolvimento de sistemas-alvo baseados no uso de suportes macromoleculares de origem natural ou sintética (Friis, Bundgaard, 1996; Erdmann, Uhrich, 2000; Hoste *et al.*, 2000; Gallardo *et al.*, 2001; Etrych *et al.*, 2001; Jiang, Zhu, 2001). Do ponto de vista terapêutico, para se conseguir benefícios ótimos da aplicação de um fármaco, este deve ser liberado no sítio específico ou o mais próximo possível. Assim, é garantida a concentração terapêutica ótima em paralelo com a diminuição dos efeitos adversos (Nogusa *et al.*, 2000). Em virtude dos polímeros poderem ser direcionados mediante propriedades mecânicas e químicas desejadas, são freqüentemente usados no desenvolvimento de pró-fármacos (San Román *et al.*, 1995).

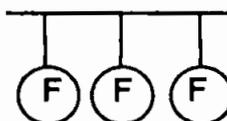
A maioria dos fármacos são micromoléculas e estão relativamente livres para difundirem-se através do sistema biológico. Conseqüentemente, a administração localizada e concentrada para os tecidos ou órgãos destes fármacos torna-se dificultada. Polímeros, entretanto, difundem-se vagarosamente e são absorvidos nas interfaces celulares. O anexo de fármaco a uma matriz polimérica produz o denominado biopolímero ou pró-fármaco polimérico, que possui comportamento farmacológico distinto do fármaco protótipo (Etrych *et al.*, 2001; Soyez *et al.*, 1996; Ouchi, Ohya, 1995). Estes tipos de pró-fármacos são apresentados como um meio eficaz para o prolongamento da atividade farmacológica, para alterar a biodisponibilidade e para diminuição de efeitos colaterais, assim como a toxicidade. O uso de polímeros como transportadores pode diminuir a dose requerida, aumentar a solubilidade do fármaco e permite a incorporação de mais de um fármaco na matriz polimérica. Pode também alterar a distribuição no corpo e assegurar a liberação adequada do fármaco nas células ou tecidos alvos (Zorc, Butula, 1994). No caso das macromoléculas sintéticas, podem ser produzidas com especificações pré-determinadas como o tamanho molecular, carga eletrônica, hidrofobicidade e capacidade de ligação ao fármaco. São mais estáveis durante a manipulação e estocagem. Possuem maior facilidade e menor custo para a produção. Podem, também, mascarar odor e sabor desagradáveis. Por estes motivos, o interesse do uso de polímeros tem crescido para a produção de pró-fármacos (Friis, Bundgaard, 1996; Jiang, Zhu, 2001; Erdmann, Uhrich, 2000; Hoste *et al.*, 2000).

Muitas substâncias que são potencialmente efetivas não podem ser usadas em virtude de sua rápida excreção, rápida metabolização ou reações adversas. Em alguns casos, estes problemas podem ser sobrepujados através de sistemas de pró-fármacos macromoleculares (Ouchi, Ohya, 1995). Três tipos de pró-fármacos poliméricos foram descritos (San Román *et al.*, 1995; Etrych *et al.*, 2001):

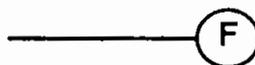
- Pró-fármacos em que o fármaco faz parte do esqueleto polimérico;



- Pró-fármacos em que as unidades do fármaco estão anexadas a ele pelas cadeias laterais do polímero;



- Pró-fármacos em que o fármaco está ligado como grupo terminal do esqueleto polimérico.



Segundo San Román *et al.* (1995), no que diz respeito à cinética e ao mecanismo de liberação, o sistema de liberação pode ser classificado nas seguintes categorias:

➤ **SISTEMAS FARMACOTÉCNICOS:**

- Sistemas controlados por solventes: baseados no princípio da permeabilidade das matrizes poliméricas após o processo de inchaço em um meio hidratado;

- Sistemas controlados por difusão: o fármaco é encapsulado em uma matriz polimérica e a quantidade de fármaco liberada é controlada pela taxa de difusão através da membrana polimérica;

➤ SISTEMAS QUÍMICOS:

- Sistemas de controle químico: aqueles no qual a taxa do fármaco liberado é predominantemente controlada pela taxa de degradação polimérica. O suporte biodegradável pode ser constituído a partir de polímeros naturais como proteínas (albumina, gelatina, colágeno), polissacarídeos (dextrano, amido, quitina, quitosana, etc.) ou a partir de polímeros sintéticos, isto é, poli(anidridos), poli(vinilalcóois), poli(acrílicos), etc. Independente de sua origem, o sistema polimérico usado para a preparação do pró-fármaco polimérico deve ser biocompatível, atóxico, não carcinogênico e, se possível, solúvel no meio fisiológico, sem induzir resposta imunológica. Uma característica importante destes sistemas é a necessidade de clearance do corpo a fim de evitar a acumulação nos tecidos e órgãos (Soyez *et al.*, 1996).

A presença de determinados tipos de ligações em sistemas macromoleculares fornece maneira eficaz de controlar o mecanismo de degradação, a solubilidade e a liberação do fármaco ativo ligado à matriz original. Como indicado na FIGURA 11, os grupos funcionais mais utilizados em virtude de sua reatividade hidrolítica são ésteres, amidas, enaminas, anidridos, carbonatos, carbamatos e ortoésteres (Balant, Doelker, 1995).

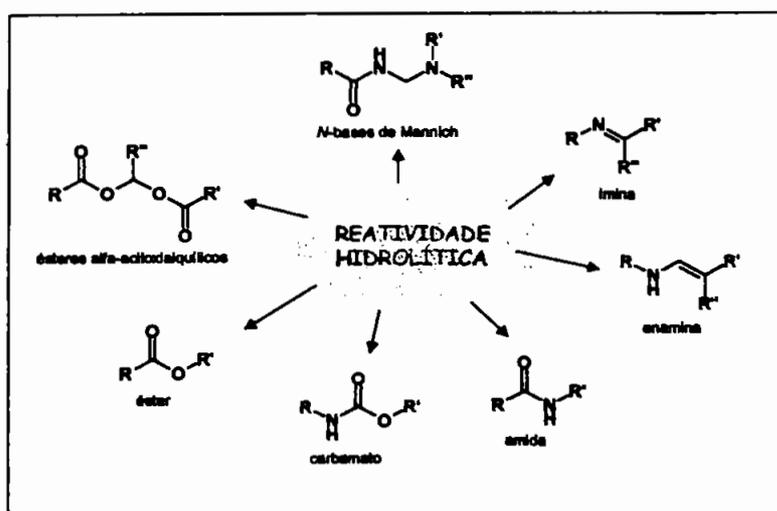


FIGURA 11 – Grupos funcionais susceptíveis à hidrólise em condições fisiológicas (Fonte: San Román *et al.*, 1995).

Embora existam infinitas possibilidades para o desenvolvimento de conjugados fármaco-polímeros, o mais amplamente aceito é o modelo sugerido por Ringsdorf em 1975. O modelo considera que a ligação entre o fármaco e transportador deve caracterizar-se por grupos orgânicos funcionais que possam ser prontamente degradados pelo meio fisiológico. Como é mostrado na FIGURA 12, o modelo sugere três componentes principais, que podem ser incorporados no sistema macromolecular, e cuja composição geral produz a melhor ação terapêutica.

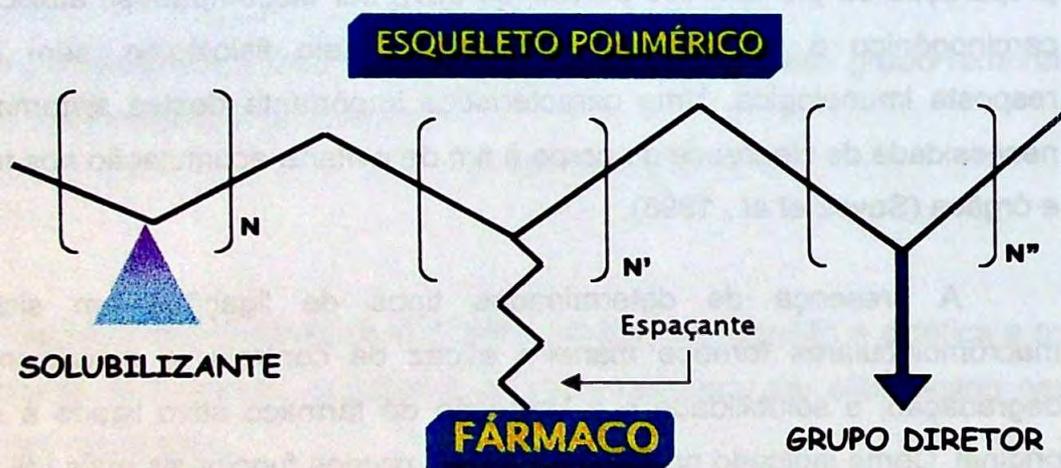


FIGURA 12 – Representação esquemática de pró-fármaco polimérico (Fonte: Ringsdorf, 1975).

Em geral, um primeiro componente é desenvolvido para fornecer ao sistema lipossolubilidade ou hidrossolubilidade. Como vários fármacos possuem caráter hidrofóbico, o anexo covalente ao transportador macromolecular resultará em um decréscimo ainda maior na hidrossolubilidade. Incorporação de grupos hidrofílicos na cadeia lateral pode melhorar a solubilidade em água (Soyez *et al.*, 1996; Hoste *et al.*, 2000).

O segundo é o suporte do agente terapêutico. O fármaco pode ligar-se diretamente à cadeia polimérica ou através de grupo espaçante (Erdmann, Uhrich, 2000; Etrych *et al.*, 2001). A função deste grupo é aumentar a flexibilidade e mobilidade da molécula e minimizar o impedimento estérico dos grupos vizinhos, facilitando, portanto, a clivagem enzimática e a ação farmacológica. Uma seleção apurada deste espaçante oferece a possibilidade de controle do sítio-alvo e da taxa de liberação do fármaco por clivagem hidrolítica e/ou enzimática (Soyez *et al.*, 1996; Nogusa *et al.*, 2000).

Para aplicações específicas, o terceiro componente pode ser introduzido dentro do sistema como agente diretor. Este funciona dirigindo o fármaco para a célula ou tecido alvo, melhorando assim, a performance geral do pró-fármaco polimérico (Ringsdorf, 1975; Ouchi, Ohya, 1995; San Román *et al.*, 1995; Soyez *et al.*, 1996). Este tipo de aplicação tem sido bastante estudado na terapia anticâncer. Visto que os fármacos normalmente empregados não são seletivos, a tendência na terapia anticâncer é a utilização de agentes diretores como anticorpos, açúcares, peptídeos, etc. (Chin, Ferreira, 1998; Ríhová *et al.*, 2000; Etrych *et al.*, 2001).

Inserido em uma matriz polimérica, o fármaco pode entrar na célula por duas vias: (1) por difusão, onde o fármaco livre é liberado dentro da célula ou (2) por endocitose, envolvendo o conjugado polímero-fármaco inteiro, sendo esta última a mais utilizada pelo organismo (Ouchi, Ohya, 1995). Estes mecanismos estão exemplificados na FIGURA 13.

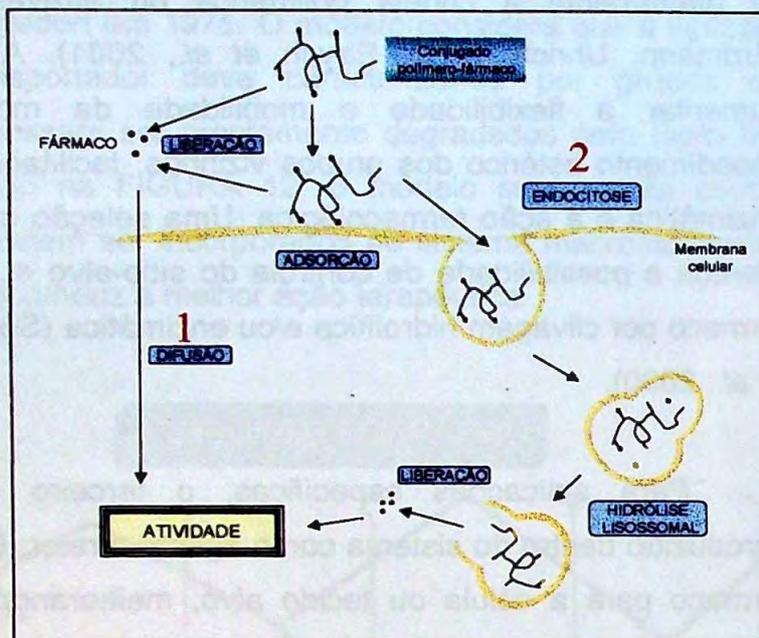


FIGURA 13 – Representação esquemática do mecanismo de difusão e endocitose (Fonte: Ouchi, Ohya, 1995).

A endocitose é definida como a internalização de uma porção da membrana plasmática, com a conseqüente ingestão de materiais e fluidos extracelulares. Durante a endocitose, as macromoléculas são capturadas como solutos no fluido extracelular (pinocitose). A sua taxa de captura é relativamente vagarosa, sendo diretamente proporcional à concentração das macromoléculas no fluido extracelular (Ouchi, Ohya, 1995).

Antes da internalização, as macromoléculas se anexam aos receptores de membrana que freqüentemente localizam-se dentro de áreas específicas. A partir destas áreas, a vesícula pinocítica (endossoma) é formada. Esta vesícula se desliga da membrana plasmática e migra para dentro da célula, fundindo-se a outras vesículas (Lloyd *et al.*, 1984; Ouchi, Ohya, 1995; Soyez *et al.*, 1996; Etrych *et al.*, 2001). As vesículas fundem-se ao compartimento lisossômico da célula. Lisossomas são vesículas de

origem intracelular que tem pH interno ácido e contém grande número de enzimas hidrolíticas capazes de degradar várias macromoléculas. Se a macromolécula for biodegradável, (dextrano, ácido poliglutâmico, polilisina, polietilenoglicol) o material pinocítico é digerido aos constituintes monoméricos, os quais conseguem atravessar a membrana lisossomal para sua utilização pela célula ou para sua excreção (Chandra, Rustgi, 1998). Materiais não-biodegradáveis (ésteres poliacrílicos e poliacrilamidas substituídas) são sequestrados em um segundo lisossoma. Neste lisossoma, após a hidrólise dos grupos funcionais (éster ou amida) por enzimas (esterases ou lipases), são transformados nos seus sais de sódio correspondentes. São liberados por exocitose ou pela morte celular (Ouchi, Ohya, 1995). Neste caso, estes compostos são prontamente solúveis nos fluidos fisiológicos e portanto são eliminados do organismo através da urina (San Román *et al.*, 1995).

No caso dos polímeros sintéticos, uma classe bastante atraente é a dos polímeros vinílicos. Eles podem ser facilmente preparados por polimerização radicalar a partir do monômero vinílico correspondente. Enorme variedade na composição e nas propriedades do polímero podem ser adquiridas pela copolimerização de determinados monômeros. Isto torna possível direcionar a estrutura para os requerimentos de qualquer sistema em consideração (Wermuth *et al.*, 1996). Existem vários trabalhos relatados na literatura utilizando polímeros acrílicos e metacrílicos como transportadores de fármacos, o que comprova a grande viabilidade destes processos (Pató *et al.*, 1983; Duncan, Kopeček, 1984; Silveira, 1987; San Román, 1989; Kulkarni *et al.*, 1990; Krinick *et al.*, 1994; San Román *et al.*, 1992; Gallardo, San Román, 1993; Liso *et al.*, 1996; Daravan, Provder, 1997; Elvira, San Román, 1997; Sintov, Levy, 1997; Sanda *et al.*, 1998; Ortiz *et al.*, 1998; Elvira *et al.*, 2000).

2.2.3 PLANEJAMENTO SINTÉTICO

A latenciação, como já foi referido anteriormente, é método especial de modificação molecular que transforma o fármaco em pró-fármaco. Os pró-fármacos são comumente feitos para atingir diversos objetivos, entre eles, acentuar a eficácia e reduzir a toxicidade e os efeitos adversos de fármacos, através do controle da sua absorção, biodisponibilidade, metabolismo, distribuição e captura da célula (Johnson, Lloyd-Jone, 1987; Korolkovas, 1988, Testa, 1995; Friis, Bundgaard, 1996).

Dentro da latenciação, um método promissor para melhorar solubilidade de um fármaco, prolongar sua liberação, reduzir doses e intervalos de doses, diminuir toxicidade ou adquirir especificidade é a ligação deste fármaco a um transportador polimérico (Merwe *et al.*, 2002; Zacchigna *et al.*, 2002). Muitas vezes é necessária a introdução de unidades espaçantes entre o fármaco e matriz polimérica, a fim de que a liberação enzimática seja facilitada. Este artifício aumenta a acessibilidade enzimática e diminui o impedimento estérico se o fármaco e a matriz polimérica estiverem ligados diretamente (Wermuth, 1996; Etrych *et al.*, 2001).

Como ponto principal da síntese de polímeros, é necessário desenvolver agentes polimerizáveis, ou seja, monômeros. No caso de pró-fármacos poliméricos isto se torna um agravante, pois estes monômeros, além de serem atóxicos serão ligados aos fármacos, para posterior polimerização. Os pró-fármacos podem ser obtidos mediante vários tipos de ligações químicas, as quais devem ser escolhidas com base na estabilidade requerida para o derivado e também com a disponibilidade de derivatização de grupos funcionais na molécula (San Román *et al.*, 1995). Derivados do tipo éster e amida são bastante utilizados no campo da latenciação e muitos exemplos que resultaram em sucesso são descritos pela literatura (San Román *et al.*, 1995; Wermuth, 1996; Erdmann, Uhrich, 2000)

De maneira geral, a preparação de ésteres é reação há muito tempo bem estabelecida (Morrison, Boyd, 1996). É definida como a reação entre álcoois e ácidos carboxílicos. Existem várias formas de preparação de ésteres, entre elas pode-se citar:

❖ **Reação entre ácido carboxílico e álcool:** Esta é denominada reação direta ou esterificação de Fisher. É reação lenta e reversível e necessita freqüentemente de catalisadores e/ou ativadores (Carey, 2000; Rautio *et al.*, 2000).

Nas reações de esterificação direta é necessária a utilização de ativadores e catalisadores de reação. Os agentes mais utilizados são a dicicloexilcarbodiimida (DCC) e a dimetilaminopiridina (DMAP), ativador e catalisador, respectivamente (Rautio *et al.*, 2000). O primeiro tem sido comumente usado para a preparação de amidas, ésteres e anidridos, ressaltando sua importância na síntese de peptídeos. Este composto facilita a formação de amidas e ésteres reagindo com o grupo carboxílico do ácido e ativando-o para a substituição nucleofílica (FIGURA 14) (Khorana, 1953; Neises, Steglich, 1985; Luo, Xie, 1987; Solomons, 1992; Rautio *et al.*, 2000). O segundo é um catalisador para acilação de álcoois e aminas. A reação com álcoois primários e secundários processa-se seguramente, mas é requerida a presença de catalisador, que neste caso é o DMAP. O mecanismo proposto para a reação está representado na FIGURA 15 (Hassner, Alexanian, 1978). Aparentemente, o ácido carboxílico é convertido pelo DCC ao correspondente anidrido, que forma uma espécie acilpiridínio (4) com o catalisador (2). Isto é seguido pelo equilíbrio de 4 com o álcool para produzir o par iônico (5). Ataque nucleofílico pelo R'O⁻ no grupo acila de (5) gera o éster e o catalisador (2). O ácido carboxílico é reciclado pelo DCC enquanto o catalisador é reutilizado na formação de (4). A esterificação direta não é sensível à umidade podendo ser realizada, portanto, em meio ligeiramente aquoso. O produto formado ao final da reação, dicicloexiluréia, tem solubilidade muito baixa na maioria dos solventes orgânicos, e resulta em dificuldade de purificação (Sheehan, Hess, 1955).

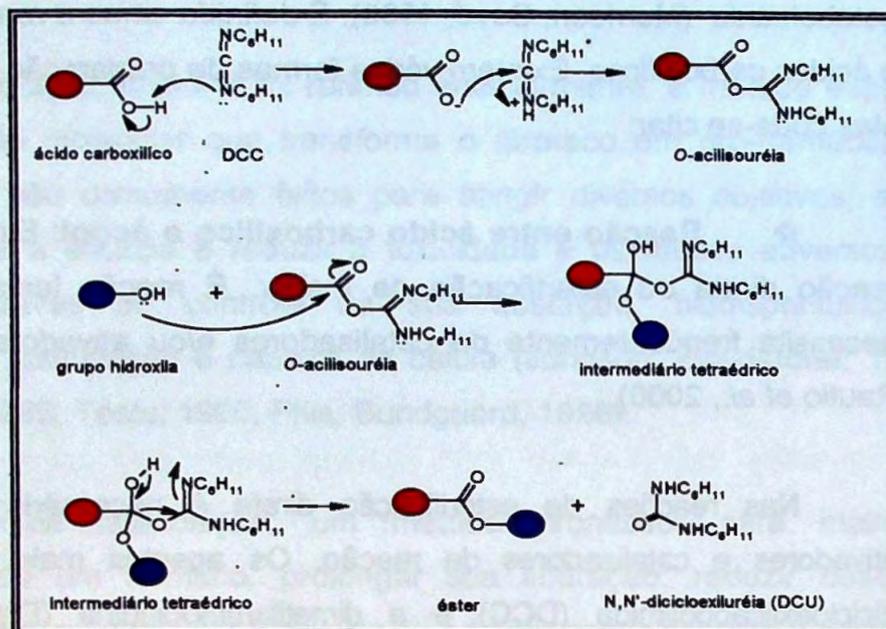


FIGURA 14 – Mecanismo de formação de ligação éster pela condensação de ácido carboxílico e álcool, promovida pelo DCC (Fonte: Carey, 2000).

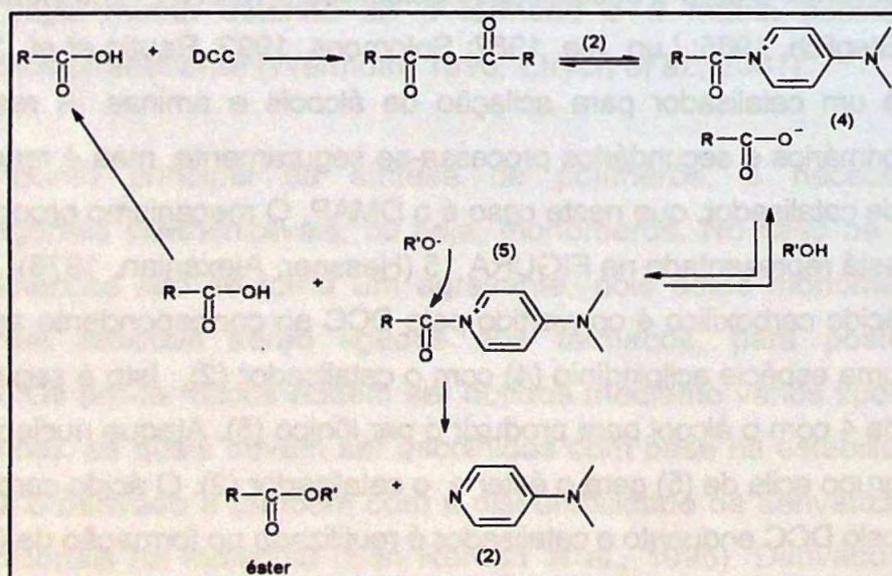


FIGURA 15 – Mecanismo de formação de ligação éster pela condensação de ácido carboxílico e álcool, promovida pelo DCC em presença de DMAP (Fonte: Hassner, Alexanian, 1978).

❖ **Reação entre cloreto de ácido e álcool:** Ao contrário da esterificação direta, que é reação lenta e incompleta, as reações com cloretos de ácidos são mais rápidas e dão bons rendimentos (Morrison, Boyd, 1972; March, 1992).

Ésteres também podem ser sintetizados pela reação entre cloretos de acila (ácidos) e álcoois. A partir do momento que estes cloretos são mais reativos à substituição nucleofílica que os ácidos carboxílicos, a reação ocorre rapidamente e não requer catalisadores ou ativadores (March, 1992). A reação demonstrativa da esterificação entre a oxamniquina e os cloretos de ácidos está representada na FIGURA 16.

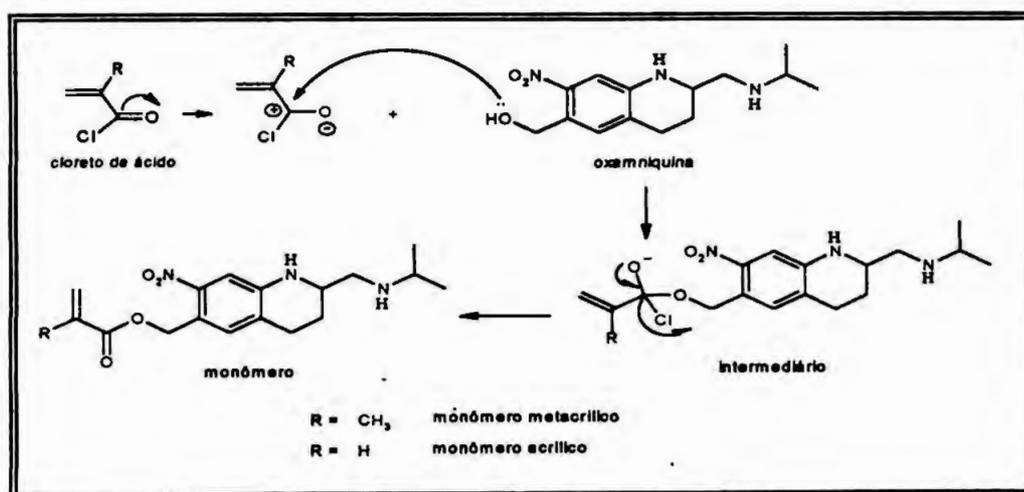
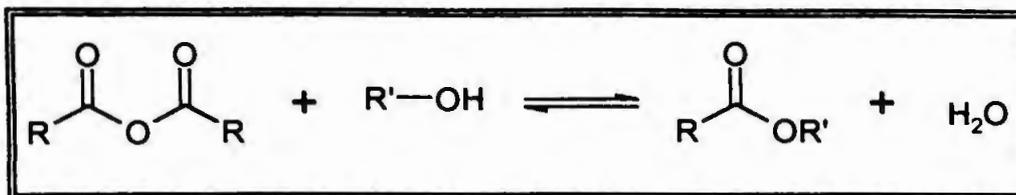
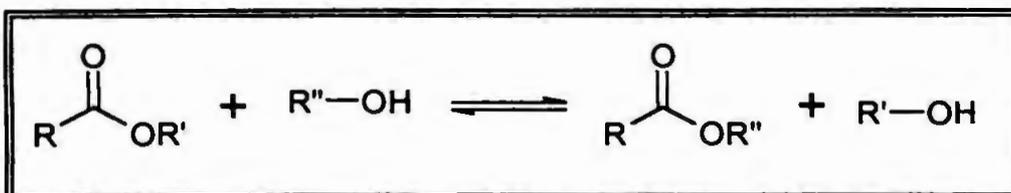


FIGURA 16 – Reação de esterificação entre a oxamniquina e os cloretos de ácido.

❖ **Reação entre anidrido de ácido e álcool:** requer condições mais brandas de reação. Isto é devido a maior reatividade destes compostos quando comparados aos respectivos ácidos carboxílicos. O único inconveniente no uso destes compostos é a sensibilidade à água. A reação de esterificação entre anidrido e álcool está representada a seguir:



❖ **Reação entre éster e álcool (transesterificação):** método bastante útil. É uma das reações orgânicas clássicas que possui inúmeras aplicações sintéticas. É simplesmente a preparação de ésteres a partir de outro éster e um álcool.



A transesterificação pode ser realizada por diversos métodos, vários deles relatados na literatura. Entre eles, podem-se citar: Refluxo dos reagentes à temperatura de 150 °C por 6 horas (Bader *et al.*, 1952); Refluxo dos reagentes na presença de catalisador (Taber *et al.*, 1985); Refluxo dos reagentes com peneira molecular (Otera, 1993) Destilação azeotrópica em aparelho de Dean Stark (Christoffers, Önal, 2000); Catálise básica com auxílio de microondas (Varma, Naicker, 1999).

Semelhante aos ésteres, as amidas são preparadas por métodos muito similares àqueles descritos anteriormente, com a diferença de que agora a porção nucleofílica é um grupo amino, e não a hidroxila. Praticamente todas as sínteses de preparação de ésteres podem ser extrapoladas para a obtenção de amidas. As aminas são grupos mais nucleofílicos do que as hidroxilas e reagem mais prontamente para a formação dos derivados amídicos (Morrison, Boyd, 1996). Método bastante interessante de obtenção de ésteres ou amidas é a reação de SCHOTTEN-BAUMANN, a qual é realizada em solução aquosa de álcali. Cloretos de ácido são utilizados como grupos acilantes dos nucleófilos (amino ou

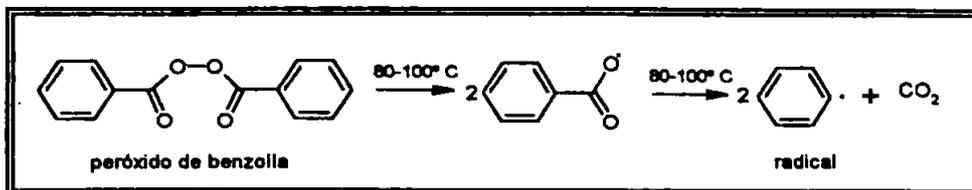
hidroxila). Neste caso, o cloreto de ácido extrai o álcool ou a amina da solução aquosa e reage com o mesmo em fase homogênea. A reação concorrente entre o cloreto e a água ou íon hidróxido (adicionado para neutralizar o ácido) se processa apenas na superfície de separação das fases, e por essa razão é muito lenta. Para impedir a saponificação do éster formado, deve-se operar sempre nas proximidades do ponto de neutralidade, isto é, adicionar o hidróxido gota a gota, acompanhando o consumo do álcali. É método bastante eficiente, principalmente quando se trabalha com aminoácidos, pois a característica polar destes compostos desfavorecem a reação em outros solventes menos polares (Becker *et al.*, 1997).

Polimerização

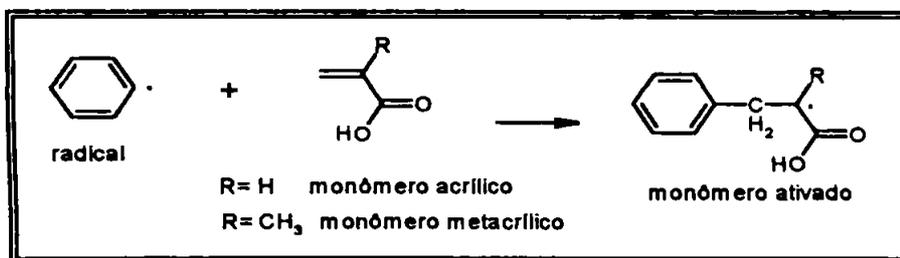
Polímeros são moléculas muito grandes, constituídas por várias unidades menores denominadas monômeros. Segundo a classificação, os polímeros podem ser naturais (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos) ou sintéticos (PVC, teflon, poliestireno). Os polímeros sintéticos podem ser obtidos por várias técnicas. A mais comum, utilizada especialmente com monômeros vinílicos, é a técnica de adição. Esta técnica consiste na formação de radicais, através de iniciadores químicos, que ativam os monômeros para que a polimerização ocorra (Stevens, 1999). A polimerização por adição é aplicada aos monômeros vinílicos e resulta de três fases:

> **INICIAÇÃO**: fase de obtenção de radicais que ativem os monômeros para sua polimerização. Os radicais são obtidos a partir de iniciadores químicos: peróxido de benzoíla, azo-bis-isobutironitrila e persulfato de potássio. A iniciação está representada a seguir:

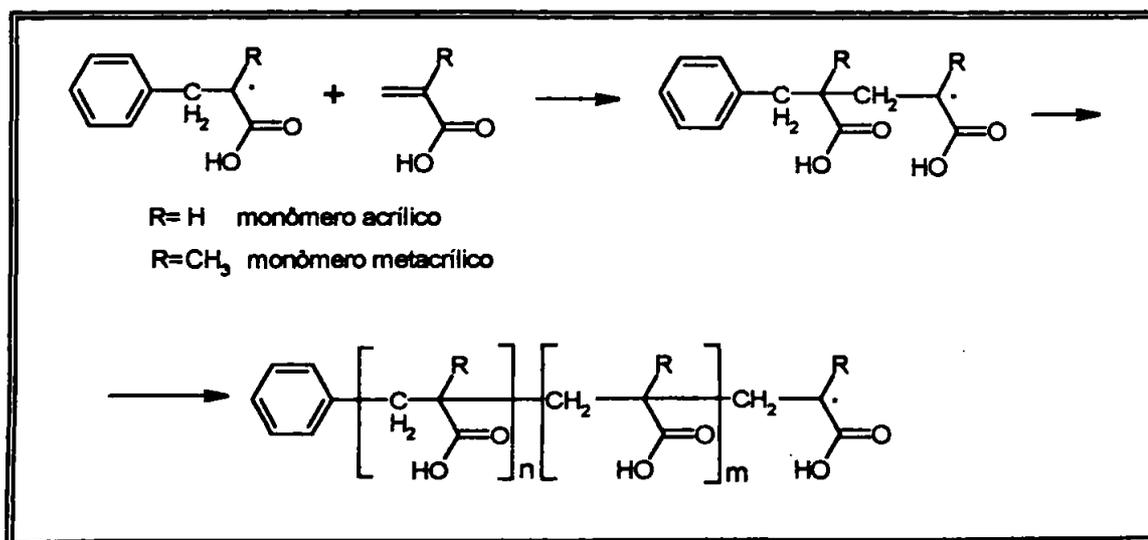
FORMAÇÃO DE RADICAIS:



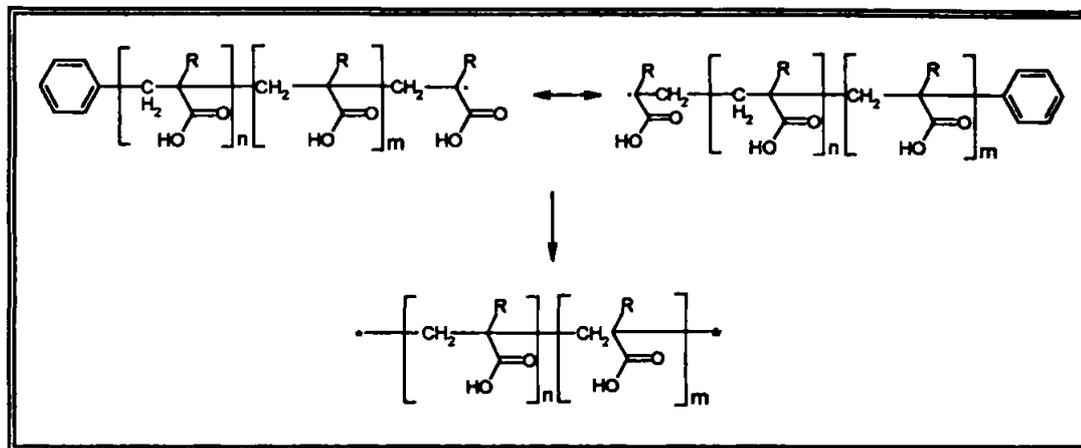
ÍNICIO DA POLIMERIZAÇÃO:



➤ **PROPAGAÇÃO:** é a formação do polímero propriamente dito. Formam-se longas cadeias poliméricas;



➤ **TERMINAÇÃO:** é a interrupção da polimerização. Pode ocorrer tanto pelas próprias cadeias do polímero, como pela colocação de aditivo ou solvente.



Reações de proteção de grupos funcionais

Como regra geral, quando existem dois grupos funcionais de reatividade diferentes numa molécula, pode-se manipular a reatividade de ambos. Grupos protetores têm sido desenvolvidos para a maioria dos grupos funcionais incluindo álcoois, aminas, ácidos carboxílicos e alcenos. Eles são amplamente empregados na síntese de moléculas complexas como peptídeos, aminoácidos, antibióticos beta-lactâmicos e carboidratos. Métodos simples de proteção dos grupos funcionais de aminoácidos foram desenvolvidos para viabilizar a síntese de moléculas simples, bem como a de peptídeos. Da mesma maneira, métodos brandos de remoção também tiveram que ser desenvolvidos de modo a evitar a destruição das ligações formadas ou, ainda, dos próprios aminoácidos que constituem os peptídeos. Além disso, foi, também, necessário desenvolver métodos eficientes de acoplamento, que provocassem o mínimo possível de reações colaterais (Willis, Willis, 1999; Carey, 2000).

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 MATERIAL

3.1.1.1 Produtos farmacêuticos

- oxamniquina grau farmacêutico (Pfizer);
- Cremophor® EL (BASF).

3.1.1.2 Reagentes, solventes e outros

- 2,2'-azo-bis-isobutironitrila – AIBN (Merck);
- acetato de etila (Merck);
- acetona (Merck);
- ácido aminocapróico – ACA (Merck);
- ácido gama-aminobutírico - GABA (Merck);
- ácido clorídrico fumegante (Merck);
- ácidos acrílico e metacrílico (Merck);
- anidrido acético (Merck);
- bicarbonato de sódio (Synth)
- brometo de potássio (Merck);
- carbonato de potássio (Chimie Test);
- cloreto de tionila (Merck);
- cloretos de acrilóila e metacrilóila (Merck);
- clorofórmio (Merck);
- clorofórmio deuterado (Isotec);
- cromatofolhas de alumínio para CCD cobertas com sílica gel 60 F₂₅₄;
- diclorometano-DCM (Merck);
- dimetilaminopiridina-DMAP (Merck);
- dimetilformamida-DMF (Merck);
- dimetilsulfóxido deuterado-DMSO-*d*₆ (Isotec);
- cloridrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida – EDC (Merck);
- etanol (Synth);

- éter de petróleo (Synth);
- éter etílico (Merck);
- glicina (Merck);
- hexano (Synth);
- hidroxibenzotriazol-HOBt (Sigma)
- hidróxido de lítio (Merck);
- hidróxido de sódio (Merck);
- hidróxido de potássio (Pro Analysis);
- isopropanol (Merck);
- metanol (Merck);
- *N-N'*-dicicloexilcarbodiimida-DCC (Merck);
- pentóxido de fósforo (Merck);
- peróxido de benzoíla (Carlo Erba);
- piridina (Synth);
- sílica gel 60 – particulado 0,063-0,200 mm (Merck);
- sulfato de sódio anidro (Synth);
- tetraidrofurano (Merck);
- tolueno (Merck);
- trietilamina (Merck).

Quando necessário, todos os reagentes e solventes foram purificados segundo literatura (Perrin *et al*, 1980).

3.1.1.3 Equipamentos

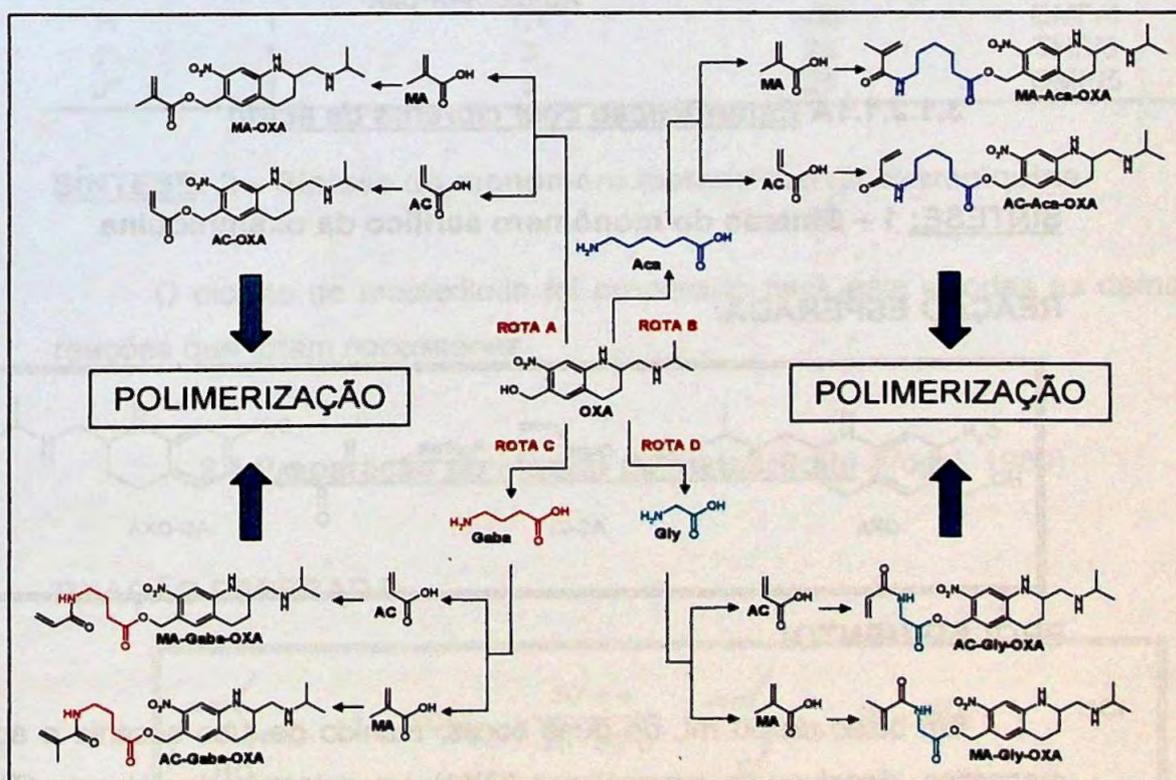
Além da aparelhagem e vidrarias usualmente empregadas em laboratório, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- aparelho para determinação de ponto de fusão Microquímica, modelo MQAPF 301;
- espectrômetro de ressonância magnética nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advance DPX-300;

- lâmpada de radiação ultravioleta Spectroline, modelo ENF-260C
- aparelho de espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), FTIR-Bomem, modelo MB-120;
- termobalança Seiko, modelo TG/DTA 6300;
- espectrofotômetro de absorção no UV/VIS Beckman, modelo DU-70.
- bomba de alto vácuo, modelo E2M5 EDWARDS;
- kugelrohr (forninho para destilação) BÜCHI;
- forno de microondas Electrolux, modelo ME27F.

3.1.2 MÉTODOS

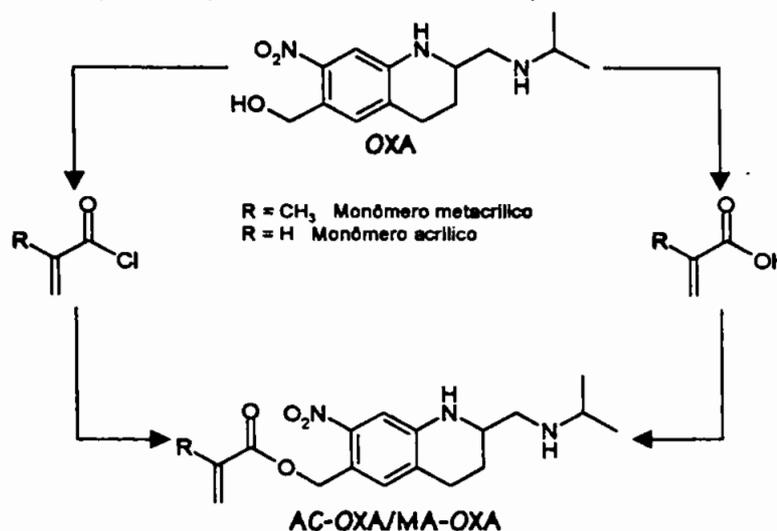
Durante o desenvolvimento deste projeto, vários métodos foram realizados visando selecionar o processo mais adequado de síntese. Aqueles diretamente relacionados com os novos derivados sintetizados encontram-se resumidamente no esquema abaixo.



3.1.2.1 Síntese dos monômeros

3.1.2.1.1 Monômeros diretamente ligados ao fármaco (Rota A)

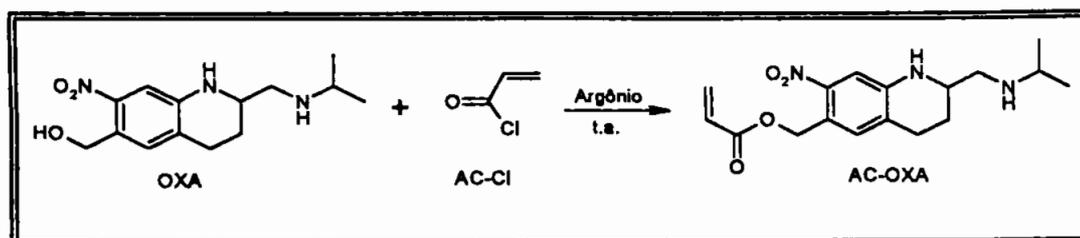
O procedimento geral para a síntese dos monômeros diretamente ligados ao fármaco (Rota A) está descrito no esquema abaixo.



3.1.2.1.1A Esterificação com cloretos de ácido

SÍNTESE: 1 – Síntese do monômero acrílico da oxamniquina

REAÇÃO ESPERADA:



PROCEDIMENTO:

Em balão de 50 mL de duas bocas, munido de tubo secante e agitador magnético, dissolveu-se oxamniquina (OXA) em determinado solvente (THF ou DMF), sob atmosfera de argônio e à temperatura de 0° C. Acrescentaram-se quantidades equimolares de trietilamina nas reações marcadas com asterisco (*).

Com auxílio de bomba de seringa adicionou-se, vagarosamente, solução de cloreto de acrilóila (AC-Cl) em 1mL do respectivo solvente. Manteve-se a reação sob agitação durante 12 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD). O produto obtido foi submetido à cromatografia em coluna eluindo-se com clorofórmio:metanol (20:1). As frações separadas foram analisadas por ressonância magnética nuclear. As condições ensaiadas para obtenção do derivado acrílico estão expostas na TABELA II.

TABELA II – Condições ensaiadas para obtenção do derivado acrílico da oxamniquina

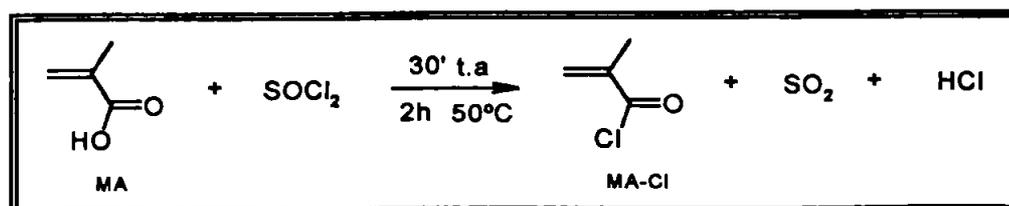
Ensaio	oxamniquina (mmol)	Cloreto de acrilóila (mmol)	Temperatura final (°C)	Solvente/ quantidade (mL)
A	1	1,1	25	THF/5
B	1	1,1	0	THF/5
C	1	1,1	-25	THF/5
D	1	1,1	-60	THF/5
E	1	1,1	25	DMF/4
F	1	1,1	0	DMF/4
G	1	1,1	-25	DMF/4
H	1	1,1	-60	DMF/4
I*	1	3	25	THF/5
J*	1	3	25	DMF/5

SÍNTESE: 2 – Síntese do monômero metacrílico da oxamniquina

O cloreto de metacrilóila foi preparado para esta e todas as demais reações que foram necessárias.

2.1 Preparação do cloreto de metacrilóila (Vogel, 1989)

REAÇÃO ESPERADA:

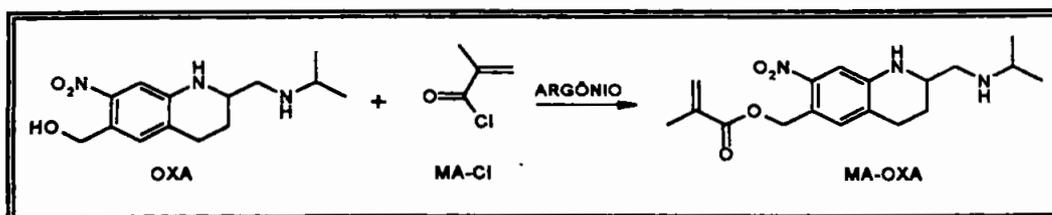


PROCEDIMENTO:

Em balão de 100 mL de duas bocas, adicionaram-se, vagarosamente, 550 mmol de ácido metacrílico (MA) destilado e em seguida 550 mmol de cloreto de tionila (SOCl_2). Deixou-se a reação sob agitação constante por 30 minutos à temperatura ambiente, permitindo a saída de HCl e SO_2 para béquero com água. Após este período, aqueceu-se a reação em banho de água a $50\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h. Em seguida, destilou-se o produto obtido sob pressão reduzida (p.e.: $76\text{ }^\circ\text{C}$).

2.2 Reação entre a oxamniquina e cloreto de metacrilóila

A partir do produto obtido na reação anterior (2.1), procedeu-se à reação de esterificação.

REAÇÃO ESPERADA:**PROCEDIMENTO:**

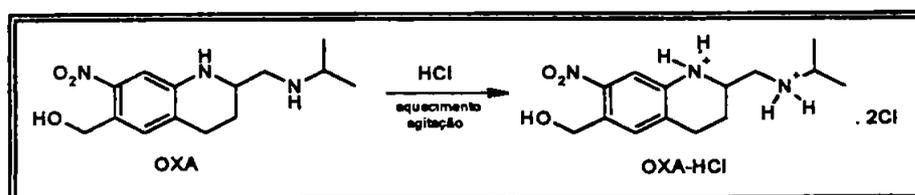
Em balão de 50 mL de duas bocas, munido de tubo secante e agitador magnético, dissolveu-se OXA em determinado solvente (THF ou DMF), sob atmosfera de argônio e à temperatura de $0\text{ }^\circ\text{C}$. Acrescentaram-se quantidades equimolares de trietilamina nas reações marcadas com asterisco (*). Com auxílio de bomba de seringa adicionou-se, vagarosamente, solução de cloreto de metacrilóila (MA-Cl) em 1 mL do respectivo solvente. Deixou-se a reação sob agitação durante 12 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD). O produto obtido foi submetido à cromatografia em coluna com sistema solvente clorofórmio:metanol (8,5:1,5). As frações separadas foram analisadas por RMN. As condições ensaiadas para obtenção do derivado metacrílico estão expostas na TABELA III.

TABELA III – Condições ensaiadas para obtenção do derivado metacrílico da oxamniquina

Ensaio	oxamniquina (mmol)	Cloreto de metacrilato (mmol)	Temperatura final (°C)	Solvente/ quantidade (mL)
A	1	1,1	25	THF/5
B	1	1,1	0	THF/5
C	1	1,1	-25	THF/5
D	1	1,1	-60	THF/5
E	1	1,1	25	DMF/4
F	1	1,1	0	DMF/4
G	1	1,1	-25	DMF/4
H	1	1,1	-60	DMF/4
I*	1	3	25	THF/5
J*	1	3	25	DMF/5

SÍNTESE: 3 – Reação de proteção dos grupos funcionais: formação de cloridrato de oxamniquina

REAÇÃO ESPERADA:



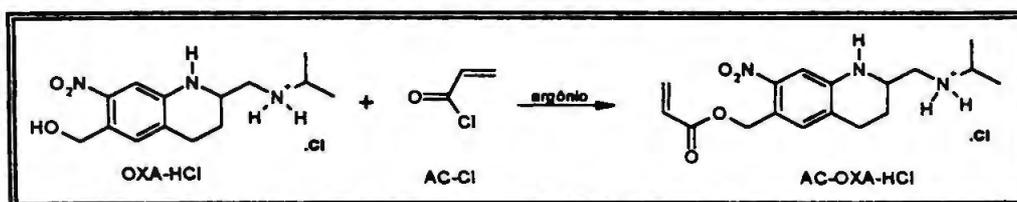
PROCEDIMENTO:

Dissolveram-se cerca de 5 mmol (1,3967 g) de OXA em 100 mL de etanol (solução 1), sob agitação e aquecimento (65 °C). Paralelamente, preparou-se solução de ácido clorídrico concentrado em etanol (solução 2), na proporção de 1:50, respectivamente. Adicionou-se 2 em 1 vagorosamente. Deixou-se sob agitação constante e à temperatura de 65 °C por 1 hora. Esperou-se a cristalização e filtrou-se o produto. Submeteu-se o produto à análise por ressonância magnética nuclear e solubilidade em água.

SÍNTESE: 4 - Reação de esterificação entre o cloridrato de oxamniquina e cloreto de acrilóila

Após a formação do cloridrato de oxamniquina (OXA-HCl), o produto foi submetido à reação com o cloreto de acrilóila (AC-Cl).

REAÇÃO ESPERADA:



PROCEDIMENTO:

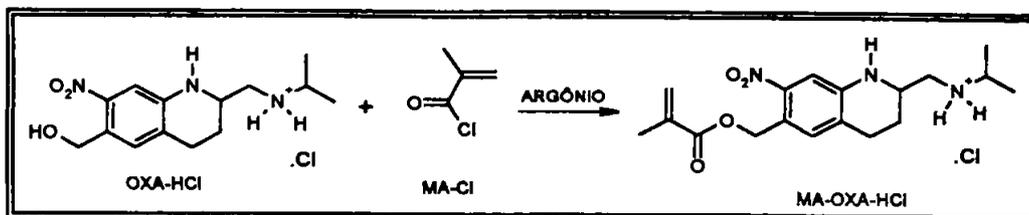
Em balão de 50 mL de duas bocas, munido de tubo secante e agitador magnético, foi dissolvido 1 mmol (0,3513 g) de OXA-HCl em solvente previamente destilado (THF ou DMF), sob atmosfera de argônio e à temperatura inicial de 0° C. Com seringa e agulha adicionaram-se 1,1 mmol (0,0996 g) de AC-Cl. A reação foi deixada sob agitação constante. As alterações nas condições de reação estão expostas na TABELA IV.

TABELA IV – Condições ensaiadas para a reação entre o cloreto de acrilóila e o cloridrato de oxamniquina

Ensaio	Temperatura final (°C)	Solvente	Tempo de reação (horas)
A	0	THF	24
B	0	DMF	24
C	25	THF	12
D	25	DMF	12

SÍNTESE: 5 - Reação de esterificação entre o cloridrato de oxamniquina e o cloreto de metacrilóila

REAÇÃO ESPERADA:



PROCEDIMENTO:

Para esta reação foi utilizado o mesmo procedimento descrito na reação anterior. As alterações nas condições de reação estão apresentadas na TABELA V.

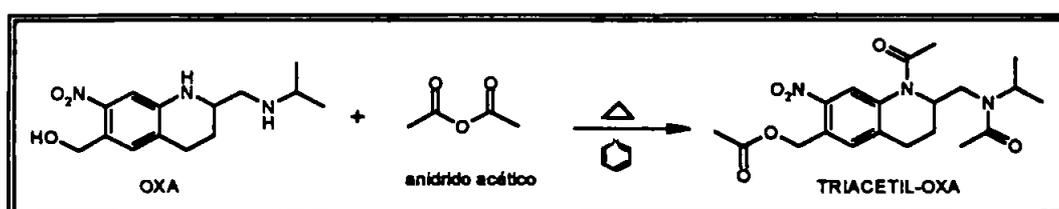
TABELA V – Condições ensaiadas para a reação entre o cloridrato de oxamniquina e cloreto de metacrilóila

Ensaio	Temperatura final (° C)	Solvente	Tempo de reação (horas)
A	0	THF	24
B	0	DMF	24
C	25	THF	12
D	25	DMF	12

SÍNTESE: 6 – Reação de grupos funcionais: ACETILAÇÃO

6.1 Primeira etapa (triacetilação)

REAÇÃO ESPERADA:

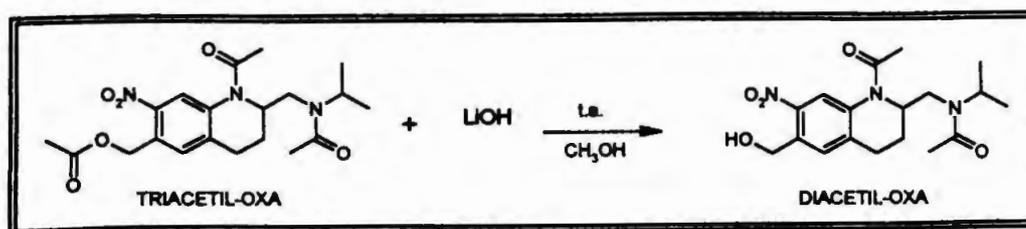


PROCEDIMENTO:

Em balão de 250 mL dissolveu-se determinada quantidade (descrita na TABELA VI) de OXA em piridina destilada. Adicionou-se anidrido acético destilado. Manteve-se a reação sob agitação constante. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. Uma vez concluída a reação, retirou-se o solvente no rotaevaporador a 70 °C e o restante em kugelrohr com pressão reduzida. Submeteu-se o produto à recristalização utilizando etanol como solvente. Deixou-se o produto em repouso por 48 h. O produto foi filtrado e lavado com o mesmo solvente. O produto foi submetido à caracterização por RMN, CCD, solubilidade e ponto de fusão. Foram feitas várias reações variando-se determinados fatores com o intuito de otimizar o processo. As condições ensaiadas encontram-se arroladas na TABELA VI.

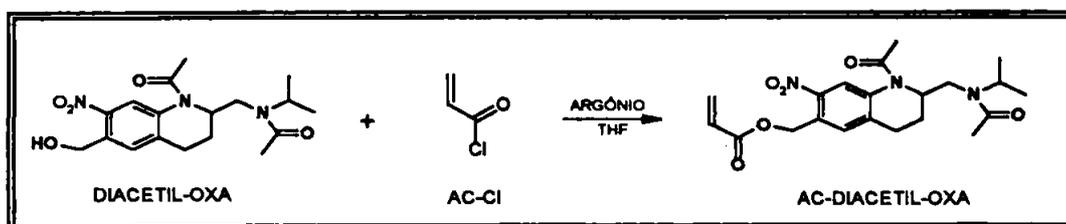
TABELA VI – Condições ensaiadas para a triacetilação da oxamniquina

Ensaio	oxamniquina (mmol)	Piridina (mL)	Anidrido acético (mL)	Tempo de reação (horas)	Temperatura (°C)
A	0,5	15	5	10	25
B	0,5	22,5	7,5	24	40
C	1	45	15	24	55
D	3	135	45	12	80
E	3	100	60	24	55
F	5	135	45	24	55

6.2 Segunda etapa (hidrólise seletiva do éster)**REAÇÃO ESPERADA:**

PROCEDIMENTO:

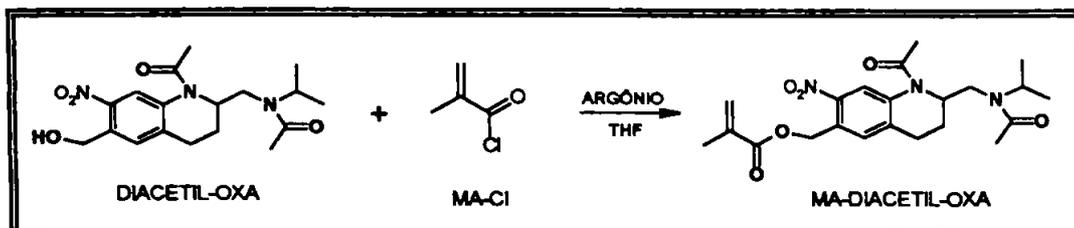
Em balão de 50 mL dissolveram-se 2 mmol (0,8107 g) de oxamniquina triacetilada (TRIACETIL-OXA) em 20 mL de metanol. Em seguida, adicionaram-se 2 mmol (0,0239 g) de LiOH. Procedeu-se a reação à temperatura ambiente por 1,5 h, com agitação constante. A reação foi acompanhada por CCD. Evaporou-se o solvente a temperatura ambiente. Sistema clorofórmio:água (1:1) foi adicionado à amostra. Transferiu-se a amostra para funil de separação e procedeu-se o isolamento da fase clorofórmica. Adicionou-se à fase orgânica, sulfato de sódio para retenção da água. O solvente foi filtrado e rotaevaporado. O produto foi recristalizado com sistema solvente água:metanol, na proporção 1:1. Em seguida, foi submetido à caracterização por RMN, CCD, solubilidade e ponto de fusão.

SÍNTESE: 7 – Reação de esterificação entre a oxamniquina diacetilada e o cloreto de acrilóila**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 50 mL de boca dupla adicionaram-se 9 mL de THF e dissolveu-se 1 mmol (0,3630 g) de oxamniquina diacetilada (DIACETIL-OXA). Cerca de 1mmol (0,09051 g) de AC-Cl foi dissolvido em 1mL de THF e então adicionado vagarosamente à solução DIACETIL-OXA/THF. Procedeu-se a reação por 24h à temperatura ambiente, com agitação constante e atmosfera de argônio. A reação foi acompanhada por CCD. Concluída a reação, retirou-se completamente o solvente e submeteu-se o produto à análise por ressonância magnética e CCD.

SÍNTESE: 8 – Reação de esterificação entre a oxamniquina diacetilada e o cloreto de metacrilóila

REAÇÃO ESPERADA:



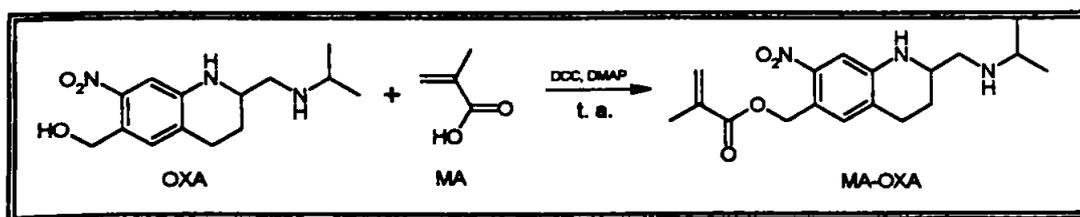
PROCEDIMENTO:

Em um balão de 50 mL de duas bocas, equipado de agitador magnético e tubo secante, foi adicionado 1 mmol (0,3630 g) de DIACETIL-OXA. Posteriormente adicionaram-se 19 mL de THF. Agitou-se até completa dissolução do composto. A mistura foi deixada à temperatura ambiente (25°C). Cerca 1 mmol de MA-Cl (0,1041 g) foi dissolvido em 1 mL de THF e então adicionado vagarosamente à solução DIACETIL-OXA/THF. Procedeu-se a reação por 24h à temperatura ambiente, com agitação constante, sob atmosfera de argônio. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD). Concluída a reação, retirou-se completamente o solvente e submeteu-se o produto à análise por RMN.

3.1.2.1.1B Esterificação direta com ácidos

SÍNTESE: 9 - Síntese do monômero metacrílico da oxamniquina

REAÇÃO ESPERADA:

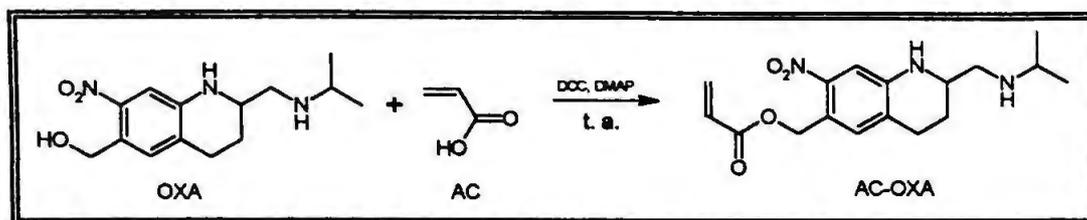


PROCEDIMENTO:

Em balão de 100 mL munido de tubo secante, dissolveu-se OXA em DCM. Adicionou-se vagorosamente o ácido metacrílico (MA). Em seguida, adicionaram-se DMAP e DCC. Deixou-se a reação sob agitação à temperatura ambiente por 8 horas. A reação foi acompanhada por CCD. O produto foi filtrado para eliminação da dicicloexiluréia (DCU). Removeu-se o solvente e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando sistema eluente descrito na TABELA VI. O produto foi analisado por RMN ^1H , ^{13}C e DEPT, espectrometria no infravermelho (IV), ponto de fusão, solubilidade e análise elementar. As condições para cada reação estão arroladas na TABELA VII.

TABELA VII – Condições ensaiadas para a síntese do monômero metacrílico da oxamniquina

Ensaio	OXA (mmol)	MA (mmol)	DCC (mmol)	DMAP (mmol)	Solvente (mL)	Sistema eluente
A	1	1	1,1	0,5	5	éter etílico/ metanol (7:3)
B	1	1,1	1,1	0,5	5	éter etílico/ metanol (7:3)
C	1	1	1	0,5	40	éter etílico/ metanol (7:3)
D	1	1	1	0,5	40	acetato de etila/ metanol (7:3)
E	1	1,1	1,1	0,5	40	acetato de etila/ metanol (7:3)
F	1	2	2	0,5	40	acetato de etila/ metanol (7:3)
G	1	3	6	0,5	40	acetato de etila/ metanol (7:3)
H	1	3	6	0,5	60	acetato de etila/ metanol (7:3)
I	1	3	12	0,5	60	acetato de etila/ metanol (7:3)

SÍNTESE: 10 – Síntese do monômero acrílico da oxamniquina**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

O procedimento para a reação de esterificação da OXA com o ácido acrílico (AC) foi similar ao da reação com o MA. Os produtos foram analisados somente por ressonância. As condições de cada reação estão descritas na TABELA VIII.

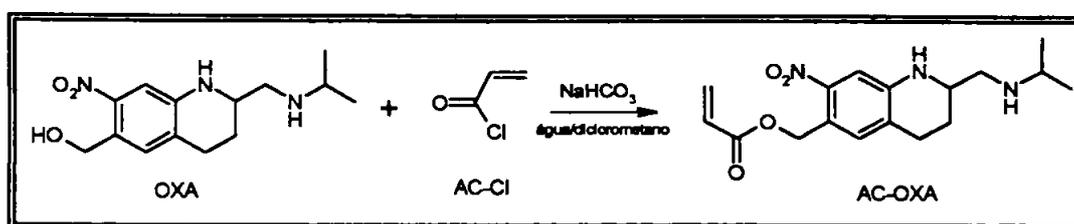
TABELA VIII – Condições ensaiadas para a síntese do monômero acrílico da oxamniquina

Ensaio	OXA (mmol)	AC (mmol)	DCC (mmol)	DMAP (mmol)	Solvente (mL)	Sistema eluyente
A	1	1	1	0,5	5	acetato de etila/ metanol (7:3)
B	1	1,1	1,1	0,5	5	acetato de etila/ metanol (7:3)
C	1	1	1	0,5	40	acetato de etila/ metanol (7:3)
D	1	1,1	1,1	0,5	40	acetato de etila/ metanol (7:3)
E	1	2	2	0,5	40	acetato de etila/ metanol (7:3)
F	1	3	6	0,5	40	acetato de etila/ metanol (7:3)
G	1	3	6	0,5	40	acetato de etila/ metanol (7:3)
H	1	3	6	0,5	60	acetato de etila/ metano (7:3)

3.1.2.1.1C Reações por transferência de fase

SÍNTESE: 11 – Síntese do monômero acrílico da oxamniquina por transferência de fase

REAÇÃO ESPERADA:



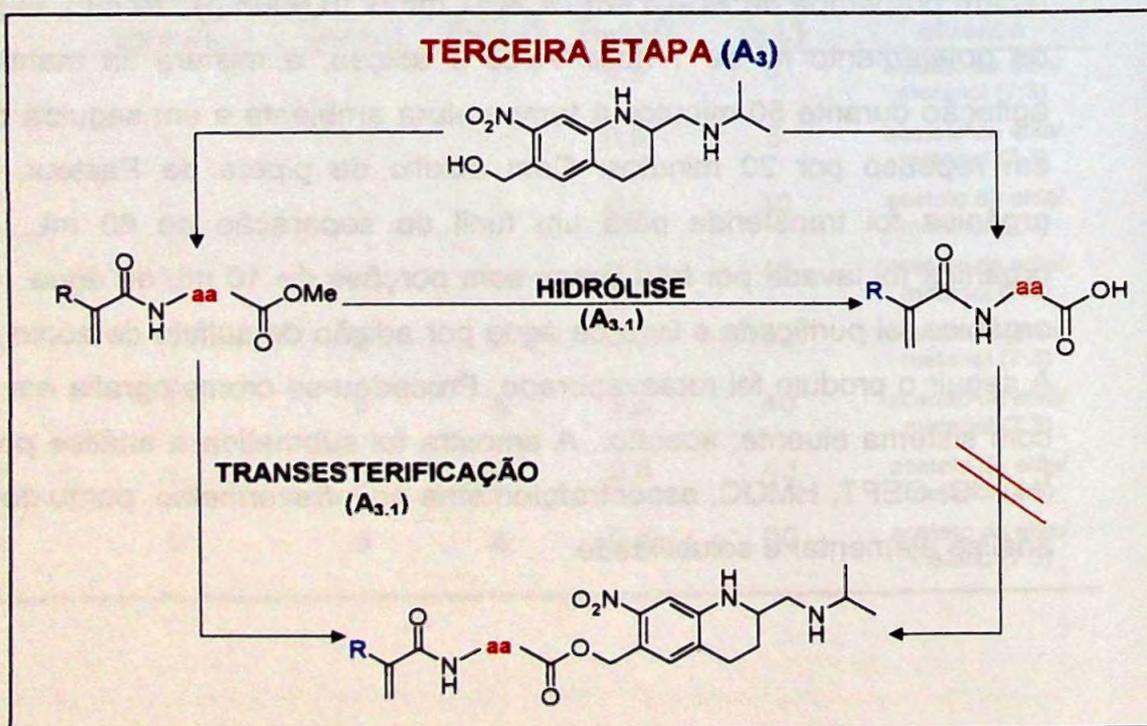
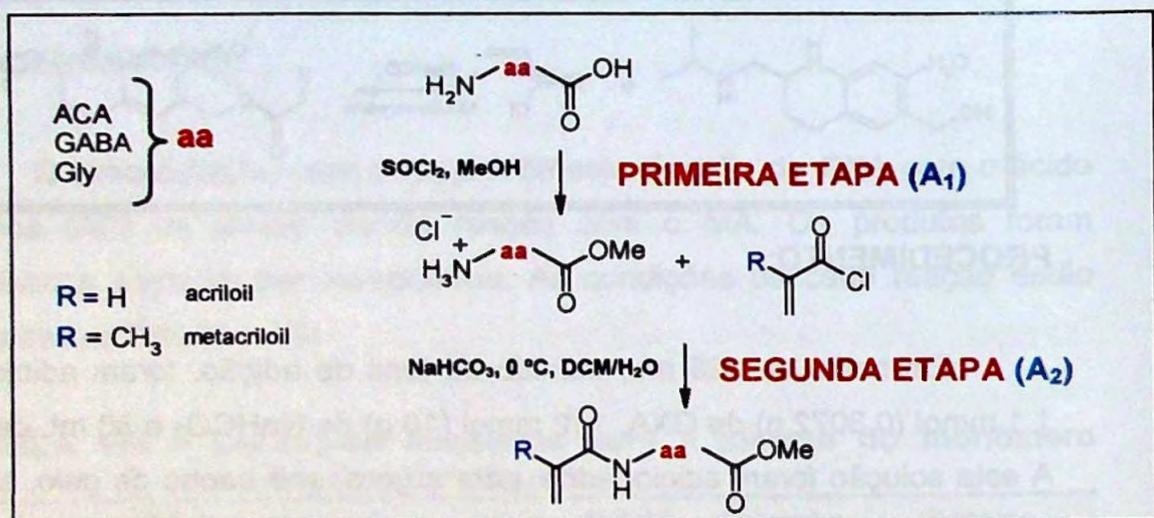
PROCEDIMENTO:

Em balão de 125 mL, munido de funil de adição, foram adicionados 1,1 mmol (0,3072 g) de OXA, 119 mmol (10 g) de NaHCO₃ e 30 mL de água. A esta solução foram adicionados, gota a gota, sob banho de gelo, solução recém preparada de AC-Cl em DCM [1 mmol (0,0905 g): 10 mL]. O período de gotejamento foi de 1 hora. Após a adição, a mistura foi mantida sob agitação durante 50 minutos à temperatura ambiente e em seguida deixada em repouso por 20 minutos. Com auxílio de pipeta de Pasteur, a fase orgânica foi transferida para um funil de separação de 60 mL. A fase orgânica foi lavada por três vezes com porções de 10 mL de água. A fase orgânica foi purificada e livre de água por adição de sulfato de sódio anidro. A seguir o produto foi rotaevaporado. Procedeu-se cromatografia em coluna com sistema eluente: acetato.. A amostra foi submetida à análise por RMN ¹H, ¹³C, DEPT, HMQC, espectrofotometria no infravermelho, ponto de fusão, análise elementar e solubilidade.

3.1.2.1.2 Monômeros ligados ao fármaco através de espaçantes (Rotas B, C e D)

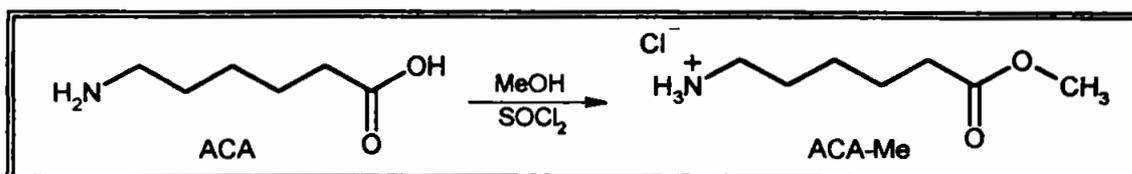
MÉTODO A

O método foi descrito por Mank *et al.*, 1988 para a obtenção de derivados acrililamídicos e metacrililamídicos do ácido aminocaprílico (ACA). Neste trabalho o mesmo procedimento foi utilizado para obtenção destes derivados e também dos derivados do GABA e Gly.

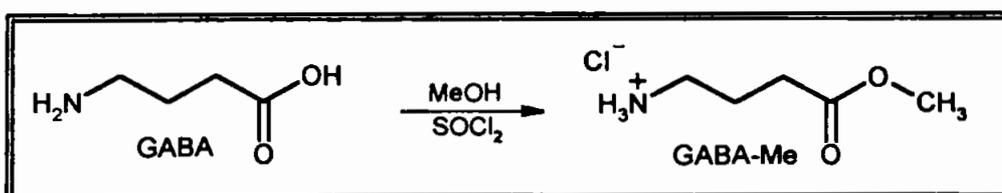


A₁ - PRIMEIRA ETAPA

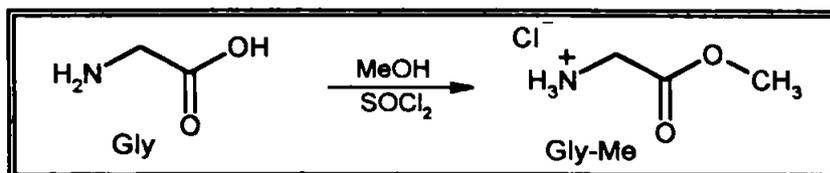
Síntese do éster metílico dos aminoácidos.

SÍNTESE: 12 – 6-AMINOEXANOATO DE METILA (ACA-Me)**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 250 ml, 50 mmol de ACA foram dissolvidos em 80 mL de metanol. A mistura foi deixada sob agitação. Quantidades equimolares de SOCl₂ foram adicionadas lentamente à mistura até completa solubilização. A solução foi rotaevaporada e o resíduo branco foi analisado por RMN.

SÍNTESE: 13 – 4-AMINO BUTIRATO DE METILA (GABA-Me)**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 250 ml, 50 mmol de GABA foram dissolvidos em 80 mL de metanol. A mistura foi deixada sob agitação. Quantidades equimolares de SOCl₂ foram adicionadas lentamente à mistura até completa solubilização. A solução foi rotaevaporada e o resíduo ligeiramente amarelado foi analisado por RMN.

SÍNTESE: 14 – 2-AMINOETANOATO DE METILA (Gly-Me)**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

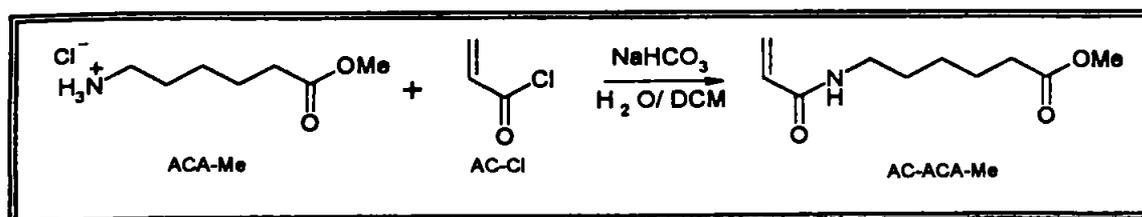
Em balão de 250 ml, 50 mmol de glicina foram dissolvidos em 80 mL de metanol. A solução foi deixada sob agitação. Quantidades equimolares de SOCl_2 foram adicionadas lentamente. A solução foi rotaevaporada e o resíduo branco muito higroscópico foi analisado por RMN.

A₂ - SEGUNDA ETAPA

Síntese dos monômeros acrililamídico e metacrililamídico dos aminoácidos.

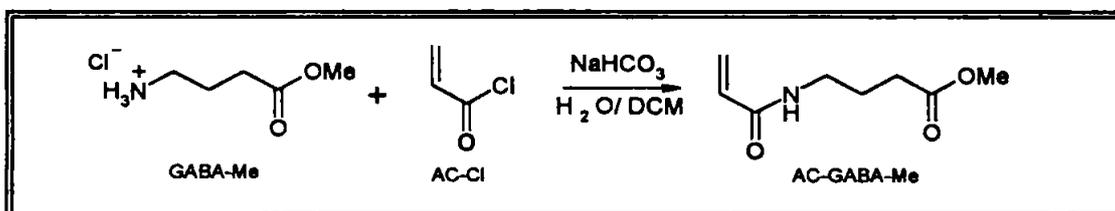
Monômeros acrililamídicos

Os três aminoácidos foram submetidos a esta reação. O procedimento é o mesmo para todos os aminoácidos estudados.

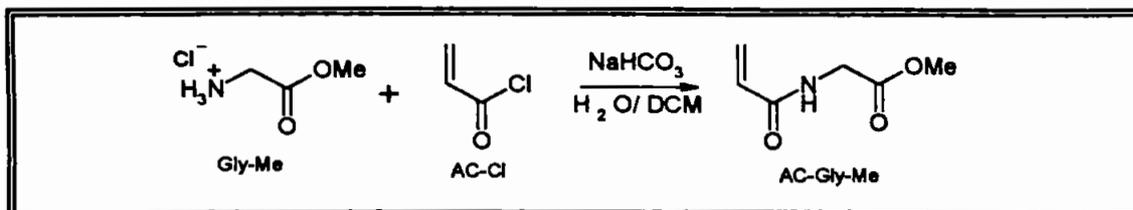
SÍNTESE: 15 – Síntese do AC-ACA-Me**REAÇÃO ESPERADA:**

PROCEDIMENTO:

Em balão de 125 mL, foram adicionados 5 mmol (0,9135 g) de ACA-Me, 120 mmol (10 g) de NaHCO₃ e 30 mL de água. A mistura foi deixada sob agitação em banho de gelo. Através de um funil de adição, uma solução de 5 mmol (0,4525 g) de AC-Cl em 15 mL de DCM foi adicionada lentamente à mistura reacional. A reação foi deixada sob agitação por 1 hora e, posteriormente 30 minutos em repouso. A solução foi filtrada e transferida para funil de separação. A fase orgânica obtida foi lavada 3 vezes com porções de água de 15 mL. A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada. O resíduo foi seco a vácuo e analisado por RMN.

SÍNTESE: 16 – Síntese do AC-GABA-Me**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

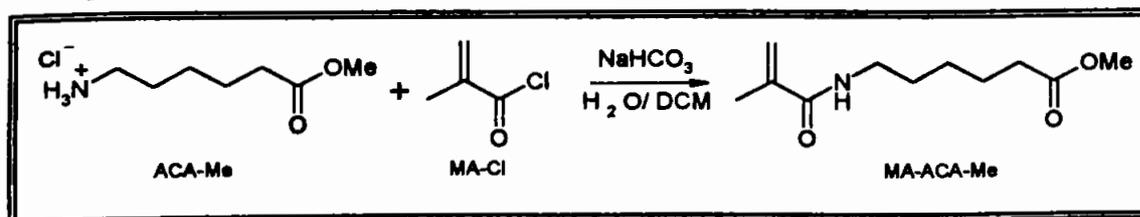
Em balão de 125 mL, foram adicionados 5 mmol (0,7606 g) de GABA-Me, 120 mmol (10 g) de NaHCO₃ e 30 mL de água. A mistura foi deixada sob agitação em banho de gelo. Através de um funil de adição, uma solução de 5 mmol (0,4525g) de AC-Cl em 15 mL de DCM foi adicionada lentamente à mistura reacional. A reação foi deixada sob agitação por 1 hora e, posteriormente 30 minutos em repouso. A solução foi filtrada e transferida para funil de separação. A fase orgânica obtida foi lavada 3 vezes com porções de água de 15 mL. A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada. O resíduo foi seco a vácuo e analisado por RMN.

SÍNTESE: 17 – Síntese do AC-Gly-Me**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 125 mL, foram adicionados 5 mmol (0,6253 g) de Gly-Me, 120 mmol (10 g) de NaHCO_3 e 30 mL de água. A mistura foi deixada sob agitação em banho de gelo. Através de um funil de adição, uma solução de 5 mmol (0,4525 g) de AC-Cl em 15 mL de DCM foi adicionada lentamente à mistura reacional. A reação foi deixada sob agitação por 1 hora e, posteriormente 30 minutos em repouso. A solução foi filtrada e transferida para funil de separação. A fase orgânica obtida foi lavada 3 vezes com porções de água de 15 mL. A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada. O resíduo foi seco a vácuo e analisado por RMN.

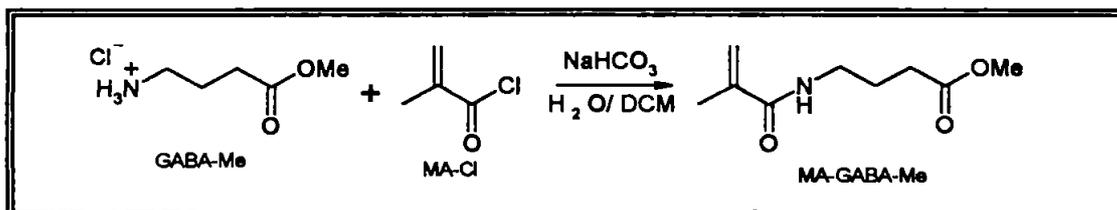
Monômeros metacrililamídicos

Os três aminoácidos foram submetidos a esta reação. O procedimento é o mesmo para todos os aminoácidos estudados.

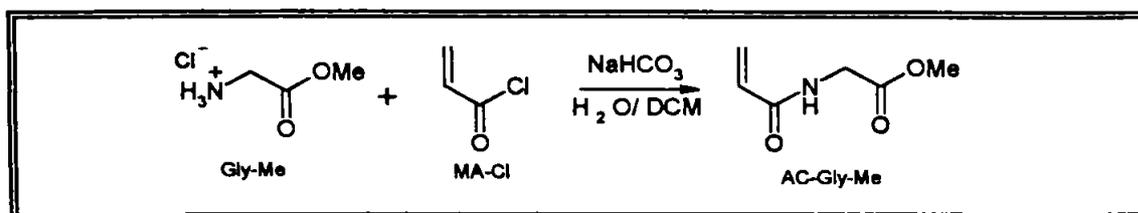
SÍNTESE: 18 – Síntese do MA-ACA-Me**REAÇÃO ESPERADA:**

PROCEDIMENTO:

Em balão de 125 mL, foram adicionados 5 mmol (0,9135 g) de ACA-Me, 120 mmol (10 g) de NaHCO₃ e 30 mL de água. A mistura foi deixada sob agitação em banho de gelo. Através de um funil de adição, uma solução de 5 mmol (0,5205 g) de MA-Cl em 15 mL de DCM foi adicionada lentamente à mistura reacional. A reação foi deixada sob agitação por 1 hora e, posteriormente 30 minutos em repouso. A solução foi filtrada e transferida para funil de separação. A fase orgânica obtida foi lavada 3 vezes com porções de água de 15 mL. A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada. O resíduo foi seco a vácuo e analisado por RMN.

SÍNTESE: 19 – Síntese do MA-GABA-Me**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 125 mL, foram adicionados 5 mmol (0,7606 g) de GABA-Me, 120 mmol (10 g) de NaHCO₃ e 30 mL de água. A mistura foi deixada sob agitação em banho de gelo. Através de um funil de adição, uma solução de 5 mmol (0,5205 g) de MA-Cl em 15 mL de DCM foi adicionada lentamente à mistura reacional. A reação foi deixada sob agitação por 1 hora e, posteriormente 30 minutos em repouso. A solução foi filtrada e transferida para funil de separação. A fase orgânica obtida foi lavada 3 vezes com porções de água de 15 mL. A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada. O resíduo foi seco a vácuo e analisado por RMN.

SÍNTESE: 20 – Síntese do MA-Gly-Me**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

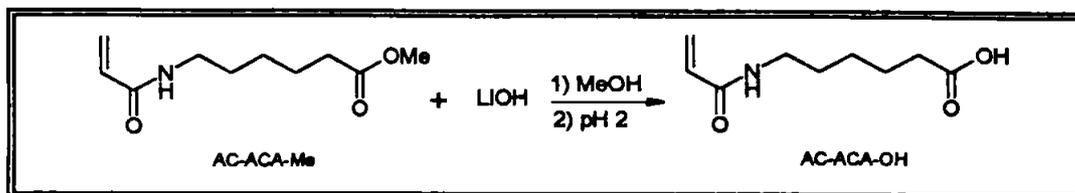
Em balão de 125 mL, foram adicionados 5 mmol (0,6253 g) de Gly-Me, 120 mmol (10 g) de NaHCO₃ e 30 mL de água. A mistura foi deixada sob agitação em banho de gelo. Através de um funil de adição, uma solução de 5mmol (0,5205 g) de MA-Cl em 15 mL de DCM foi adicionada lentamente à mistura reacional. A reação foi deixada sob agitação por 1 hora e, posteriormente 30 minutos em repouso. A solução foi filtrada e transferida para funil de separação. A fase orgânica obtida foi lavada 3 vezes com porções de água de 15 mL. A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada. O resíduo foi seco a vácuo e analisado por RMN.

A₃- TERCEIRA ETAPA

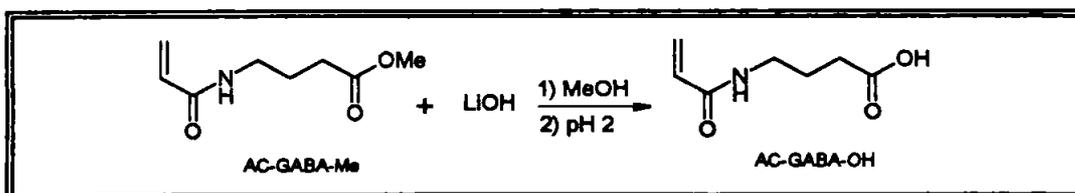
Síntese dos monômeros da oxamniquina com espaçante.

A_{3.1} - HIDRÓLISE ALCALINA**Monômeros acrililamídicos**

O mesmo procedimento foi aplicado para os derivados metilados do ACA e GABA.

SÍNTESE: 21 – Hidrólise do éster metílico do derivado AC-ACA-Me**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 100 mL adicionaram-se 5 mmol (0,9985 g) do AC-ACA-Me em 50 mL de metanol. Deixou-se sob agitação à temperatura ambiente. Hidróxido de lítio foi adicionado em quantidade equivalente, sob agitação constante. A reação foi acidificada, após 2 horas, com HCl concentrado até pH 2. Rotaevaporou-se a solução e o resíduo obtido foi ressuspendido com acetato de etila. A solução foi lavada com 3 porções de água. Analisou-se o produto por RMN.

SÍNTESE: 22 – Hidrólise do éster metílico do derivado AC-GABA-Me**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 100 mL adicionaram-se 5 mmol (0,8560 g) do AC-GABA-Me em 50 mL de metanol. Deixou-se sob agitação à temperatura ambiente. Hidróxido de lítio foi adicionado em quantidade equivalente, sob agitação constante. A reação foi acidificada, após 2 horas, com HCl concentrado até

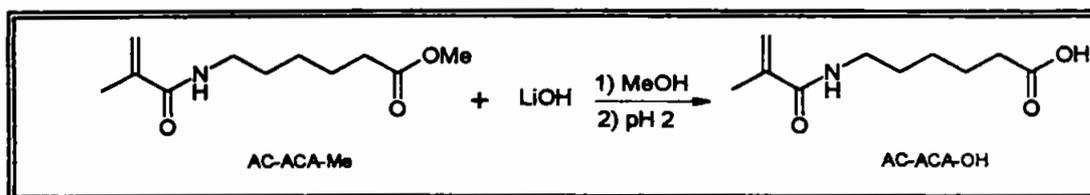
pH 2. Rotaevaporou-se a solução e o resíduo obtido foi ressuspendido com acetato de etila. A solução foi lavada com 3 porções de água. Analisou-se o produto por RMN.

Monômeros metacrililamídicos

O mesmo procedimento foi aplicado para os dois aminoácidos.

SÍNTESE: 23 – Hidrólise do éster metílico do derivado MA-ACA-Me

REAÇÃO ESPERADA:

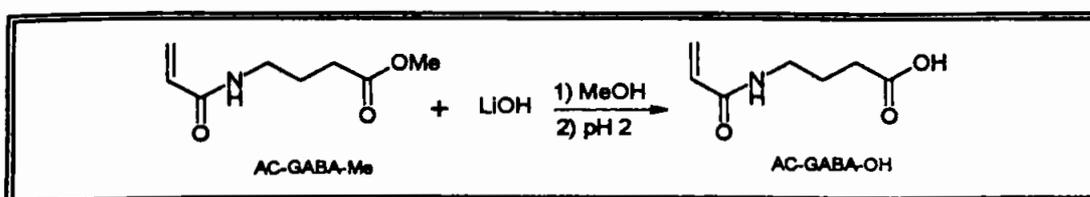


PROCEDIMENTO:

Em balão de 100 mL adicionaram-se 5 mmol (1,0664 g) do MA-ACA-Me em 50 mL de metanol. Deixou-se sob agitação à temperatura ambiente. Hidróxido de lítio foi adicionado em quantidade equivalente, sob agitação constante. A reação foi acidificada, após 2 horas, com HCl concentrado até pH 2. Rotaevaporou-se a solução e o resíduo obtido foi ressuspendido com acetato de etila. A solução foi lavada com 3 porções de água. Analisou-se o produto por RMN.

SÍNTESE: 24 – Hidrólise do éster metílico do derivado MA-GABA-Me

REAÇÃO ESPERADA:

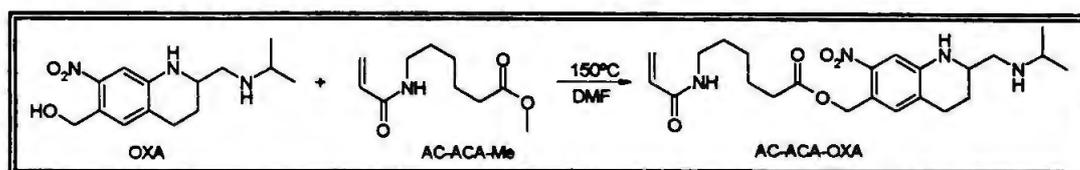


PROCEDIMENTO:

Em balão de 100 mL adicionaram-se 5 mmol (0,9261 g) do MA-GABA-Me em 50 mL de metanol. Deixou-se sob agitação à temperatura ambiente. Hidróxido de lítio foi adicionado em quantidade equivalente, sob agitação constante. A reação foi acidificada, após 2 horas, com HCl concentrado até pH 2. Rotaevaporou-se a solução e o resíduo obtido foi ressuspendido com acetato de etila. A solução foi lavada com 3 porções de água. Analisou-se o produto por RMN.

A_{3.1} - TRANSESTERIFICAÇÃO

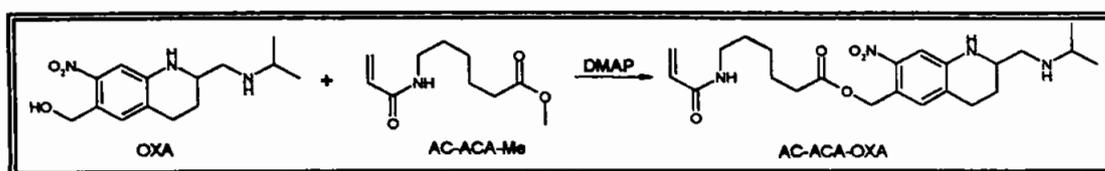
SÍNTESE: 25 - Refluxo dos reagentes à temperatura de 150 °C por 6 h

REAÇÃO ESPERADA:**PROCEDIMENTO:**

Em balão de 100 mL, munido de condensador e tubo secante, foram adicionados OXA e AC-ACA-Me. Ambos foram dissolvidos em 30 mL de DMF. A reação foi deixada sob refluxo à temperatura de 150°C por 6h. A reação foi acompanhada por CCD. O solvente foi rotaevaporado e o resíduo submetido à análise por RMN. As condições ensaiadas encontram-se arroladas na TABELA IX.

TABELA IX- Condições ensaiadas para obtenção do derivado acrililamídico da oxamniquina (AC-ACA-OXA) através de refluxo a 150 °C por 6 horas

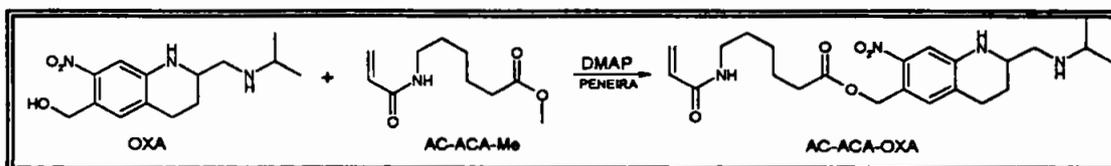
Ensaio	OXA (mmol)	AC-ACA-Me (mmol)
A	0,5	0,5
B	0,5	1,0
C	1,0	0,5
D	1,5	0,5

SÍNTESE: 26 – Refluxo dos reagentes com catalisador**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 100 mL, munido de condensador e tubo secante, foram adicionados OXA e AC-ACA-Me. As substâncias foram dissolvidas em 40 mL de determinado solvente (TABELA X) e logo em seguida adicionou-se DMAP. A reação foi mantida sob agitação e em refluxo por 24h. A reações foram acompanhadas por CCD. O solvente foi rotaevaporado e o resíduo foi submetido à análise por RMN. As condições ensaiadas são apresentadas na TABELA X.

TABELA X - Condições ensaiadas para obtenção do derivado acrililamídico da oxamniquina (AC-ACA-OXA), através do uso de catalisadores

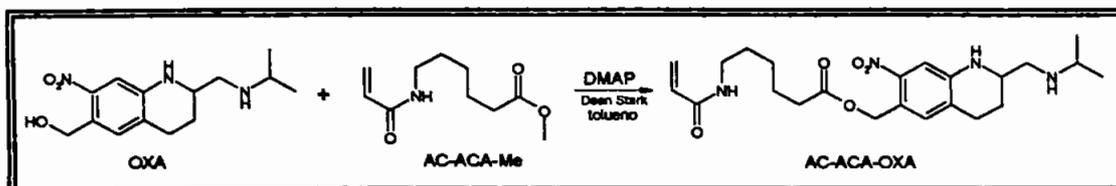
Ensaio	OXA (mmol)	AC-ACA-Me (mmol)	DMAP (mmol)	Solvente
A	1	1	0,25	DCM
B	1	2	0,25	DCM
C	2	1	0,25	Tolueno
D	2	1	0,5	Tolueno
E	1	2	0,25	Tolueno
F	1	2	0,5	Tolueno

SÍNTESE: 27 – Refluxo dos reagentes utilizando peneira molecular**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 100 mL, munido de condensador e tubo secante, foram adicionadas AC-ACA-Me e OXA. Ambas foram dissolvidas em 40 mL de tolueno e deixadas sob agitação por 10 minutos. Peneira molecular e DMAP foram acrescentados e a mistura reacional foi aquecida até refluxo (110 °C) por 24 h. Ao término, a solução foi filtrada e o solvente rotaevaporado. O resíduo foi analisado por CCD e RMN. As condições ensaiadas estão arroladas na TABELA XI.

TABELA XI - Condições ensaiadas para obtenção do acrililamídico da oxamniquina (AC-ACA-OXA), através do uso de peneira molecular.

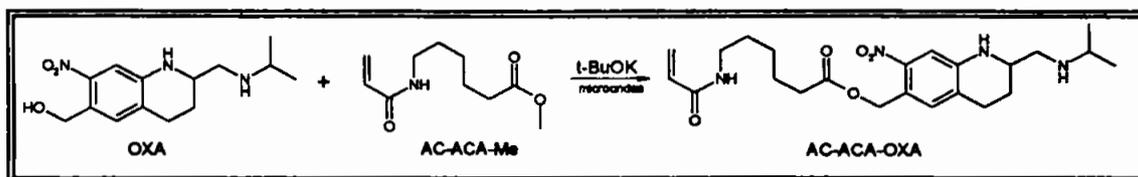
Ensaio	OXA (mmol)	AC-ACA-Me (mmol)	Peneira (gramas)	DMAP (mmol)
A	1	1	0,25	0,25
B	1	2	0,25	0,25
C	2	1	0,25	0,25
D	2	1	0,25	0,5
E	3	1	0,25	0,5

SÍNTESE: 28 – Destilação azeotrópica (Dean Stark)**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 100 mL, munido de aparelho de Dean Stark, condensador e tubo secante, foram adicionados OXA, AC-ACA-Me e DMAP. As substâncias foram parcialmente dissolvidas em 40 mL de tolueno. O aparelho de Dean Stark foi preenchido com tolueno. A reação foi deixada sob refluxo até quando não se coletasse mais metanol. A reação foi acompanhada por CCD. O solvente foi rotaevaporado e o resíduo foi analisado por RMN. As condições ensaiadas estão apresentadas na TABELA XII.

TABELA XII - Condições ensaiadas para obtenção do derivado acrililamídico da oxamniquina (AC-ACA-OXA), através da destilação azeotrópica.

Ensaio	OXA (mmol)	AC-ACA-Me (mmol)	DMAP (mmol)
A	1	1	0,25
B	1	1	0,5
C	2	1	0,25
D	2	1	0,5
E	1	2	0,25
F	1	2	0,5

SÍNTESE: 29 – Esterificação em microondas utilizando *t*-BuOK**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

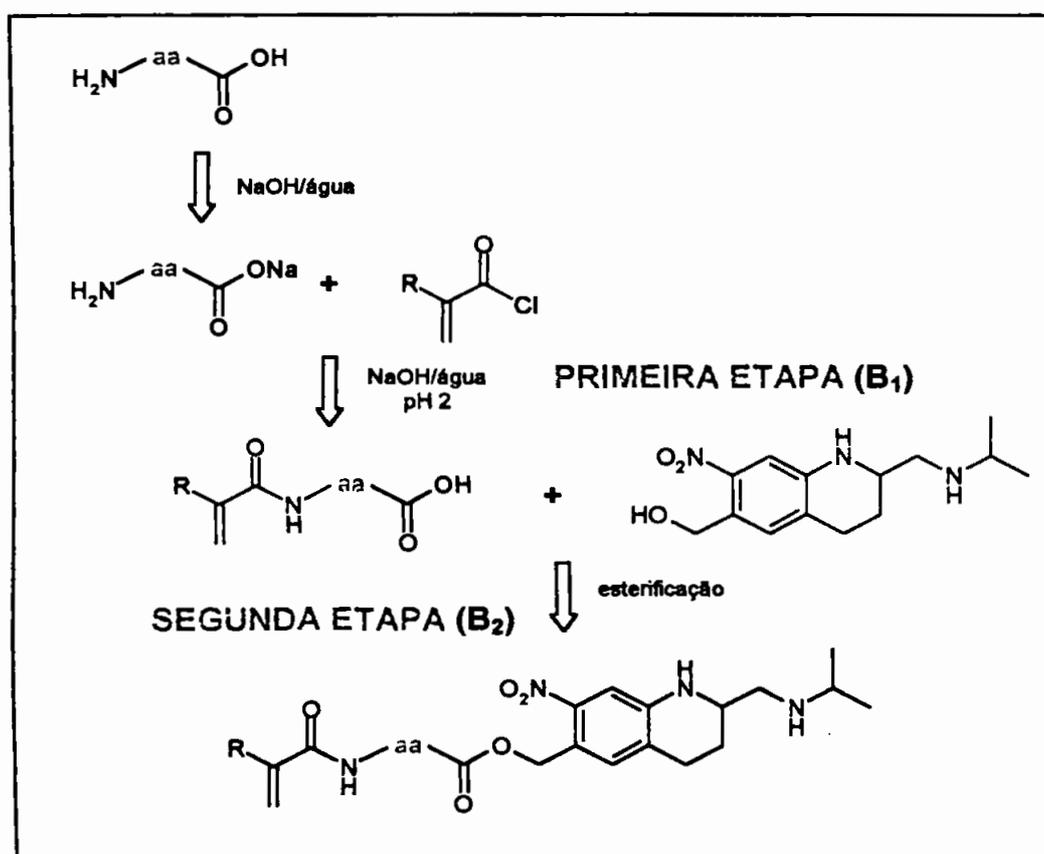
Em tubo de ensaio foi adicionado uma mistura de oxamniquina e AC-ACA-Me e *t*-butóxido de potássio. Esta, foi levada ao microondas. O produto obtido foi extraído com DCM. Rotaevaporou-se o solvente e o resíduo foi analisado por RMN. As condições ensaiadas estão apresentadas na TABELA XIII.

TABELA XIII - Condições ensaiadas para obtenção da oxamniquina (AC-ACA-OXA), com a utilização de base e em forno de microondas.

Ensaio	OXA (mmol)	AC-ACA-Me (mmol)	<i>t</i> -BuOK (mmol)	Potência (watts)	Tempo (minutos)
A	1	1	1	60	2
B	1	2	1	60	2
C	2	1	1	60	2
D	1	1	0,5	60	2
E	1	1	0,5	60	1
F	1	1	0,5	FULL	0,5
G	1	1	0,25	FULL	0,5

MÉTODO B

O método de Schotten-Baumann de acilação com cloretos de acila em meio aquoso alcalino foi aplicado a todas as reações de amidificação dos aminoácidos com os derivados acrílicos e metacrílicos (Drobník, *et al.*, 1976).



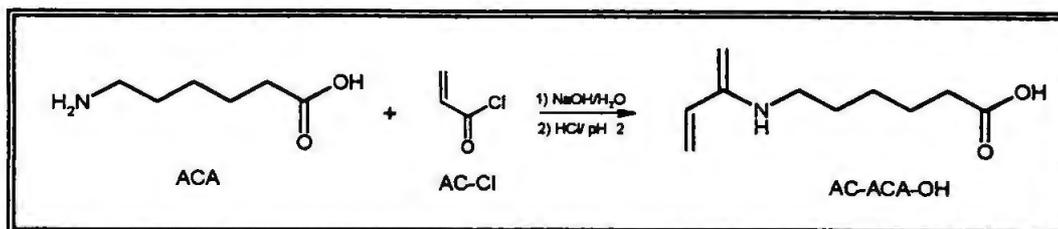
B₁- PRIMEIRA ETAPA

Síntese dos monômeros acrílicos e metacrílicos dos aminoácidos.

Monômeros acrililamídicos (AC-aa-OH)

SÍNTESE: 30 – Síntese do AC-ACA-OH

REAÇÃO ESPERADA:

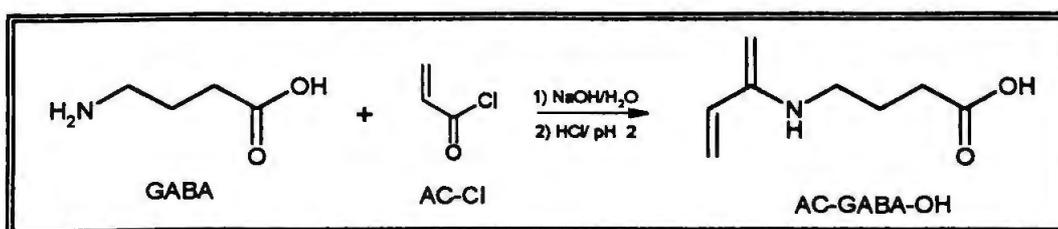


PROCEDIMENTO:

1mmol (0,04 g) de NaOH foi adicionado à solução de 1 mmol (0,1317 g) de ACA em 0,2mL de água. Sob resfriamento até 0°C, 1 mmol (0,0905 g) de AC-Cl e 1 mmol (0,04 g) de NaOH em 0,2mL de água foram adicionados gota a gota e simultaneamente. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por uma hora e após, acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH 2. A fase orgânica foi separada com auxílio de pipeta de Pasteur. A esta fase foi adicionado acetato de etila e a solução transferida para funil de separação de 125 mL. Água foi adicionada e a fase orgânica separada. Adicionou-se sulfato de sódio para secagem. A solução foi filtrada e o solvente rotaevaporado. Secou-se sob vácuo e o resíduo foi analisado por RMN.

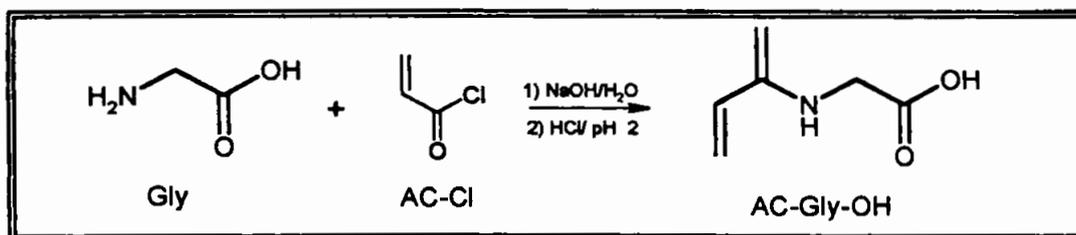
SÍNTESE: 31 – Síntese do AC-GABA-OH

REAÇÃO ESPERADA:

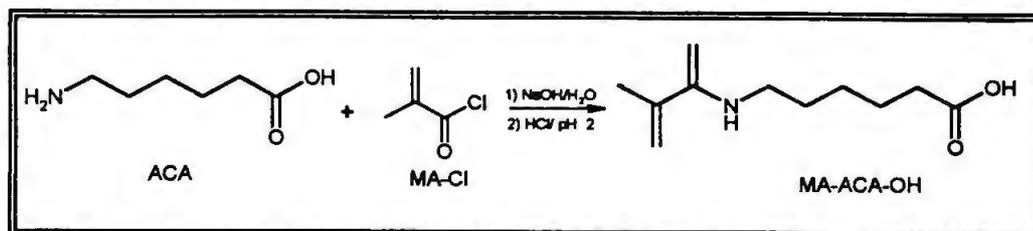


PROCEDIMENTO:

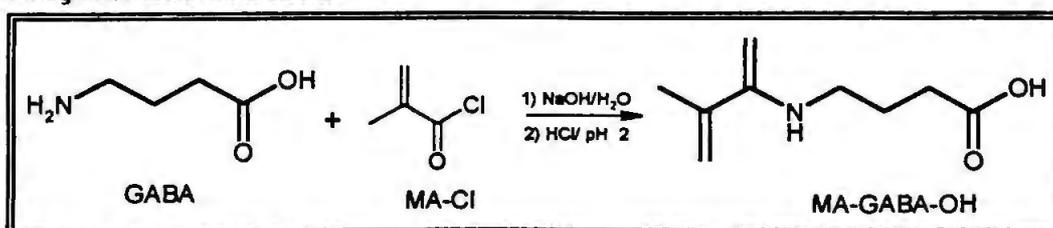
1 mmol (0,04 g) de NaOH foi adicionado à solução de 1 mmol (0,1031 g) de GABA em 0,2 mL de água. Sob resfriamento a 0 °C, 1 mmol (0,0905 g) de AC-Cl e 1 mmol (0,04 g) de NaOH em 0,2 mL foram adicionados gota a gota e simultaneamente por uma hora. Após a completa adição dos reagentes, a mistura reacional foi agitada por mais 15 minutos e então acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH = 2. A solução foi rotaevaporada e um sólido branco foi obtido. Procedeu-se a extração do resíduo com metanol. O precipitado que não foi solúvel em metanol foi filtrado e lavado 3 vezes com metanol. A fase constituída de metanol foi rotaevaporada e seca sob pressão reduzida e em seguida, analisada por RMN.

SÍNTESE: 32 – Síntese do AC-Gly-OH**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

1 mmol (0,04 g) de NaOH foi adicionado à solução de 1 mmol (0,0751 g) de Gly em 0,2 mL de água. Sob resfriamento a - 10 °C, 1 mmol (0,0905 g) de AC-Cl e 1 mmol (0,04 g) de NaOH em 0,2 mL foram adicionados gota a gota e simultaneamente por uma hora. Após a completa adição dos reagentes, a mistura reacional foi agitada por mais 15 minutos a 5 °C e então acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH = 2. À medida que a solução era acidificada um precipitado branco se formava. A solução foi filtrada e rotaevaporada. O resíduo foi ressuspensionado em metanol e novamente filtrado. O filtrado foi rotaevaporado, seco sob pressão reduzida e analisado por RMN.

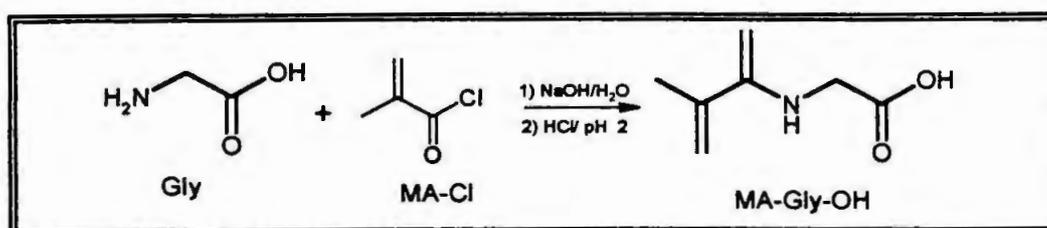
Monômero metacrililamídico (MA-aa-OH)**SÍNTESE: 33 – Síntese do MA-ACA-OH****REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

1 mmol (0,04 g) de NaOH foi adicionado à solução de 1 mmol (0,1317 g) de ACA em 0,2 mL de água. Sob resfriamento até 0 °C, 1 mmol de MA-Cl (0,1041 g) e 1 mmol (0,04 g) de NaOH em 0,2 mL de água foram adicionados gota a gota e simultaneamente. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por mais 15 minutos e após, acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH 2. Notava-se a formação de um precipitado branco que logo se desfazia. Houve a formação de duas fases: uma aquosa clara e outra orgânica amarelada. A fase orgânica foi separada com auxílio de pipeta Pasteur. A esta fase foi adicionado acetato de etila e a solução transferida para funil de separação de 125 mL. Água foi adicionada e a fase orgânica separada. Adicionou-se sulfato de sódio à fase orgânica para secagem. A solução foi filtrada e o solvente rotaevaporado. Secou-se sob vácuo e o resíduo foi analisado por RMN.

SÍNTESE: 34 – Síntese do MA-GABA-OH**REAÇÃO ESPERADA:**

PROCEDIMENTO:

1 mmol (0,04 g) de NaOH foi adicionado à solução de 1 mmol (0,1031 g) de GABA em 0,2 mL de água. Sob resfriamento até 0°C, 1 mmol (0,1041 g) de cloreto de metacrilóila e 1 mmol (0,04 g) de NaOH em 0,2 mL de água foram adicionados gota a gota e simultaneamente por uma hora. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por mais 15 minutos e após, acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH 2. Notava-se a formação de um precipitado branco que logo se desfazia. Houve a formação de duas fases: uma aquosa clara e outra orgânica amarelada. A fase orgânica foi separada com auxílio de pipeta Pasteur. A esta fase foi adicionado acetato de etila e a solução transferida para funil de separação de 125 mL. Água foi adicionada e a fase orgânica separada. Adicionou-se sulfato de sódio à fase orgânica para secagem. A solução foi filtrada e o solvente rotaevaporado. Secou-se sob vácuo e o resíduo foi analisado por RMN.

SÍNTESE: 35 – Síntese do MA-Gly-OH**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

1 mmol (0,04 g) de NaOH foi adicionado à solução de 1 mmol (0,0751 g) de Gly em 0,2 mL de água. Sob resfriamento até 0°C, 1 mmol (0,1041 g) de MA-Cl e 1 mmol (0,04 g) de NaOH em 0,2 mL de água foram adicionados gota a gota e simultaneamente. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por mais 15 minutos, então acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH 2. Notava-se a formação de um precipitado branco que

logo se desfazia. Houve a formação de duas fases: uma aquosa clara e outra orgânica amarelada. A fase orgânica foi separada com auxílio de pipeta Pasteur. A esta fase foi adicionado acetato de etila e a solução transferida para funil de separação de 125 mL. Água foi adicionada e a fase orgânica separada. Adicionou-se sulfato de sódio à fase orgânica para secagem. A solução foi filtrada e o solvente rotaevaporado. Secou-se sob vácuo e o resíduo foi analisado por RMN.

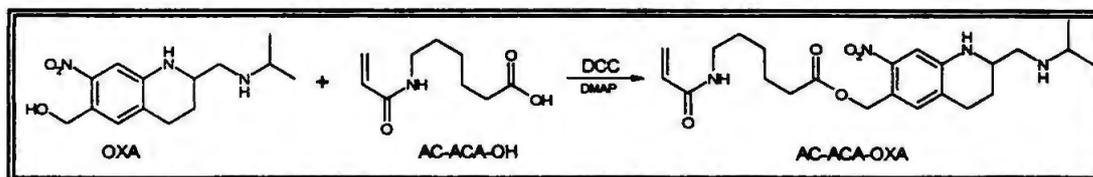
B₂- SEGUNDA ETAPA

Síntese dos monômeros da oxamniquina com espaçante.

B_{2.1} ESTERIFICAÇÃO

SÍNTESE: 36 – Esterificação utilizando carbodiimidas (DCC)

REAÇÃO ESPERADA:



PROCEDIMENTO:

Em balão de 50 mL, munido de funil de adição, AC-ACA-OH foi dissolvido em 6 mL de determinado solvente (DMF ou DCM). Sob resfriamento a 0 °C, solução de DCC em 4 mL do respectivo solvente foi adicionada. Após 30 minutos, solução de oxamniquina em 6 mL do mesmo solvente foi adicionada à mistura reacional. A reação foi deixada sob agitação por 12 horas. Ao término, a solução foi levada à geladeira por 24 horas. O solvente foi rotaevaporado. Submeteu-se o resíduo à cromatografia em coluna com sistema eluente acetato/metanol 7:3. Evaporou-se o solvente e analisou-se por RMN. As condições de reação estão arroladas na TABELA XIV.

TABELA XIV - Condições ensaiadas para obtenção do acrililamídico da oxamniquina (AC-ACA-OXA), utilizando DCC e DMAP

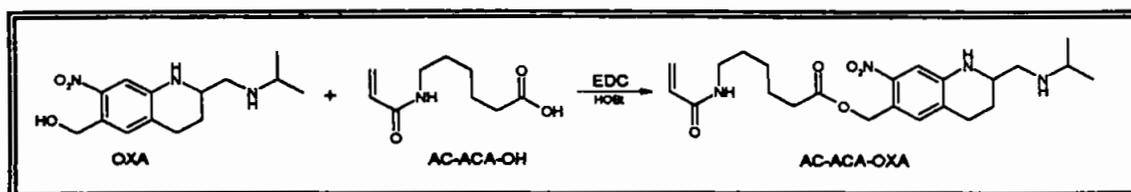
Ensaio	OXA (mmol)	AC-ACA-OH (mmol)	DCC (mmol)	DMAP (mmol)	Solvente
A	1,1	1	1	ausente	DMF
B	1,1	1	3	0,5	DCM
C	1,1	1	3	0,5	DMF
D	1,1	1	6	0,5	DMF
E	1,1	1	6	ausente	DMF
F	1	1,1	3	0,5	DMF
G	1	1,1	6	0,5	DMF
H	1	1	8	0,5	DMF
I	1	3	8	ausente	DMF
J	1	3	8	0,5	DMF
L ¹	0,5	1,1	0,6	ausente	DCM
M ¹	0,5	1,1	0,6	ausente	DMF
N ²	1	2	6	0,5	DCM/DMF (50:3)
O ²	2	1	6	0,5	DCM/DMF (50:3)
Q ²	1	3	6	0,5	DCM/DMF (50:3)

¹ Khorana, 1953.

² Rakowitz *et al.*, 2002

SÍNTESE: 37 – Esterificação utilizando carbodiimidas (EDC)

REAÇÃO ESPERADA:



PROCEDIMENTO:

Em balão de 50 mL, munido de tubo secante, foram adicionados AC-ACA-OH e EDC em DMF, à temperatura de 0 °C. Após 30 minutos, oxamniquina e HOBt foram adicionados à reação. A reação foi deixada à temperatura ambiente por 72 horas. O solvente foi rotaevaporado e o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna, com sistema eluente

acetato/metanol 7:3. O produto foi analisado por RMN. As condições de reação estão arroladas na TABELA XV.

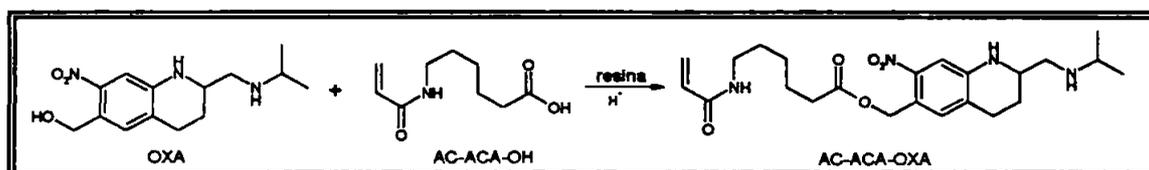
TABELA XV - Condições ensaiadas para obtenção do derivado acrililamídico da oxamniquina (AC-ACA-OXA), utilizando EDC e HOBT

Ensaio	OXA (mmol)	AC-ACA-OH (mmol)	EDC (mmol)	HOBT (mmol)	Solvente
A	1	1	1	1	DCM
B	1	1	1	1	DMF
C	2	1	1	1	DMF
D	1	1	2	1	DMF
E	1	2	2	2	DMF
F	1	1	3	1	DMF
G ¹	1	2	6	2	DCM/DMF (50/3)

¹ Rakowitz *et al.*, 2002

SÍNTESE: 38 – Esterificação utilizando resina de troca iônica

REAÇÃO ESPERADA:



PROCEDIMENTO:

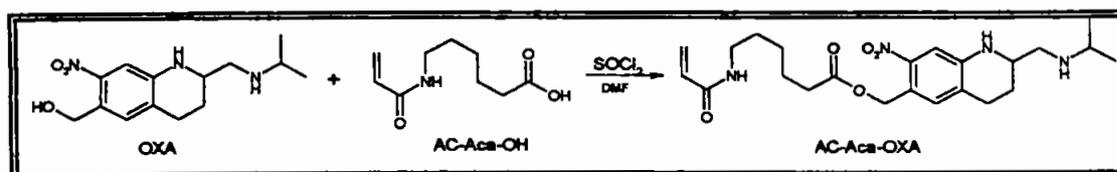
Em balão de 50 mL, munido de aparelho de Dean Stark, condensador e tubo secante, foram dissolvidos AC-ACA-OH e OXA em 30 mL de tolueno. A esta solução foi adicionada resina ácida (Amberlite IR-120-P), previamente tratada. O aparelho de Dean Stark foi preenchido com tolueno. A solução foi aquecida até refluxo e assim foi deixada até quando não se coletasse mais água. A solução foi filtrada e o solvente rotaevaporado. O resíduo foi analisado por CCD e RMN. As condições experimentais estão apresentadas na TABELA XVI.

TABELA XVI - Condições ensaiadas para obtenção do derivado acrililamídico da oxamniquina (AC-ACA-OXA), utilizando resina ácida

Ensaio	OXA (mmol)	AC-ACA-OH (mmol)	Amberlite (gramas)
A	1	1	4
B	2	1	4
C	1	2	4

SÍNTESE: 39 – Esterificação utilizando cloreto de tionila

REAÇÃO ESPERADA:

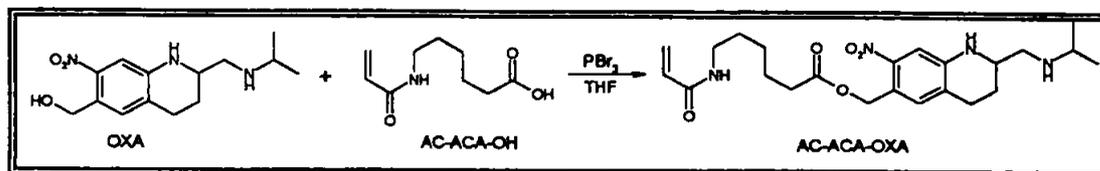


PROCEDIMENTO:

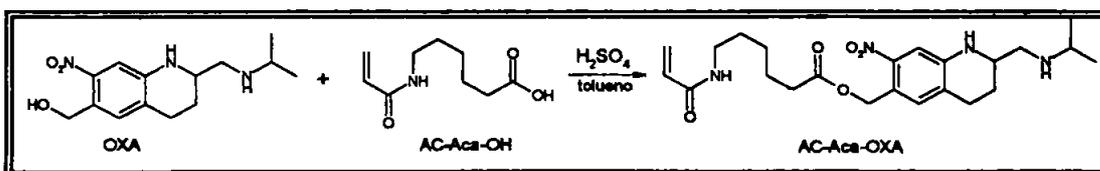
Em balão de 25 mL, munido de tubo secante, dissolveu-se AC-ACA-OH em DMF. Adicionou-se, vagarosamente, quantidade equimolar de SOCl₂, através de seringa. Em seguida, oxamniquina foi adicionada. Após 24 horas de reação, o solvente foi rotaevaporado e o resíduo foi seco em bomba de alto vácuo. Procedeu-se a análise por RMN. As condições ensaiadas para a reação estão apresentadas na TABELA XVII.

TABELA XVII - Condições ensaiadas para obtenção do derivado acrililamídico da oxamniquina (AC-ACA-OXA), utilizando cloreto de tionila

Ensaio	OXA (mmol)	AC-ACA-OH (mmol)	SOCl ₂ (mmol)	Trietilamina (mmol)	Tempo (horas)
A	1	1	1,1	ausente	24
B	1	1	1,1	1	24

SÍNTESE: 40 – Esterificação utilizando tribrometo de fósforo**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

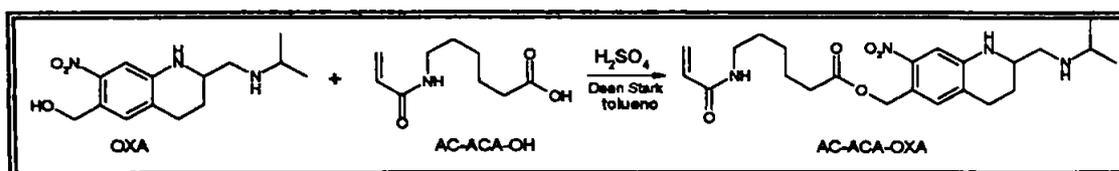
Em balão de 25 mL de duas bocas foi adicionado 1 mmol (0,173g) de AC-ACA-OH em 15 mL de THF recém destilado. Foi adicionado 0,4 mmol (0,0375 mL) de PBr₃ com auxílio de seringa sob atmosfera de argônio e agitação constante. A reação foi aquecida até 50 °C e mantida por 2 horas. Após este período 1 mmol (0,2793 g) de OXA foi adicionado. A reação foi deixada sob agitação e temperatura por 24 horas. Acompanhou-se a reação por CCD. O produto foi analisado por RMN.

SÍNTESE: 41 – Esterificação direta utilizando ácido sulfúrico**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 25 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram adicionados 5 mmol (1,3967 g) de OXA, 1 mmol (0,173g) de AC-ACA-OH, 0,5 mL de H₂SO₄ e 10 mL de tolueno. A mistura reacional foi aquecida até refluxo por 8 horas. A reação foi acompanhada por CCD e o produto analisado por RMN.

SÍNTESE: 42 – Esterificação direta utilizando ácido sulfúrico (Dean Stark)

REAÇÃO ESPERADA:

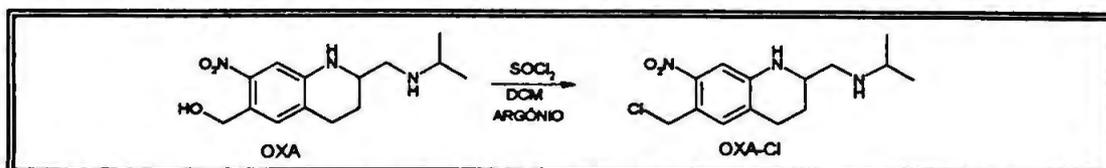


PROCEDIMENTO:

Em balão de 100 mL, munido de aparelho de Dean Stark, condensador e tubo secante, foram adicionados OXA, AC-ACA-OH e ácido sulfúrico. As substâncias foram parcialmente dissolvidas em 40 mL de tolueno. O aparelho de Dean Stark foi preenchido com tolueno. A reação foi deixada até quando não se coletasse mais água. O solvente foi rotaevaporado e o resíduo analisado por RMN. As condições de reação estão arroladas na TABELA XVIII.

TABELA XVIII - Condições ensaiadas para obtenção do derivado acrililamídico da oxamniquina (AC-ACA-OXA), utilizando ácido sulfúrico (Dean-Stark)

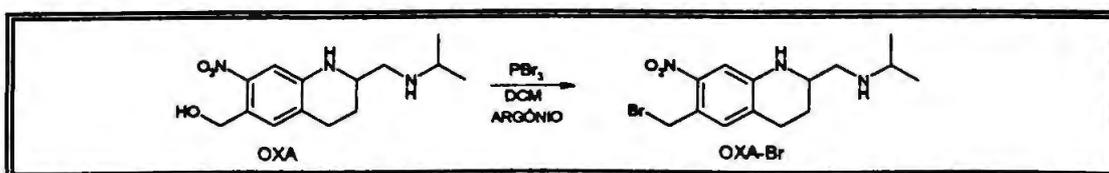
Ensaio	OXA (mmol)	AC-ACA-OH (mmol)	H ₂ SO ₄ (ml)
A	1	1	0,5
B	1	1	1,0
C	4	1	0,5
D	4	1	1
E	1	4	0,5

SÍNTESE: 43 – Formação de cloreto de oxamniquina**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 25 mL de duas bocas, munido de septo e tubo secante, foi adicionado 1 mmol (0,2793g) de OXA em 15 mL de DCM. Sob atmosfera de argônio e com auxílio de seringa, 1 mmol de cloreto de tionila, foi adicionado à solução. A reação foi deixada sob agitação constante durante 24 horas. O solvente foi rotaevaporado e o resíduo seco sob vácuo e analisado por RMN. As condições ensaiadas para a formação estão na TABELA XIX.

TABELA XIX - Condições ensaiadas para obtenção do cloreto de oxamniquina

Ensaio	OXA (mmol)	SOCl ₂ (mmol)
A	1	1
B	1	2
C	1	3

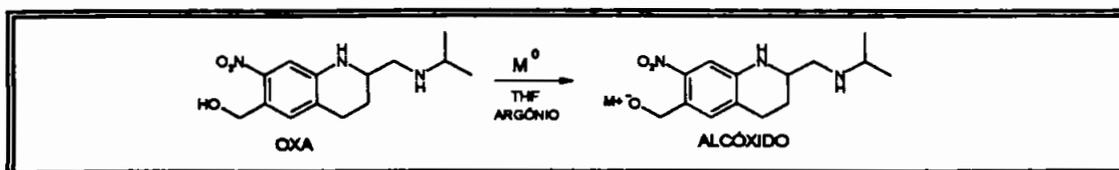
SÍNTESE: 44 – Formação de brometo de oxamniquina**REAÇÃO ESPERADA:**

PROCEDIMENTO:

Em balão de 25 mL de duas bocas, munido de septo e tubo secante, foi adicionado OXA em 30 mL de DCM. Sob atmosfera de argônio e com auxílio de seringa, tribrometo de fósforo foi adicionado à solução. A reação foi deixada sob agitação constante durante 24 horas. O solvente foi rotaevaporado e o resíduo seco sob vácuo e analisado por RMN. As condições ensaiadas para a formação estão na TABELA XX.

TABELA XX - Condições ensaiadas para obtenção do brometo de oxamniquina

Ensaio	OXA (mmol)	PBr ₃ (mmol)
A	1	1
B	1	2

SÍNTESE: 45 – Formação de alcóxido de oxamniquina**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 100 mL de duas bocas, munido de tubo secante, foram adicionados OXA, em 15 mL de THF. O metal foi adicionado à solução sob agitação constante e atmosfera de argônio. A mistura foi deixada sob agitação até que todo metal fosse consumido. O solvente foi rotaevaporado

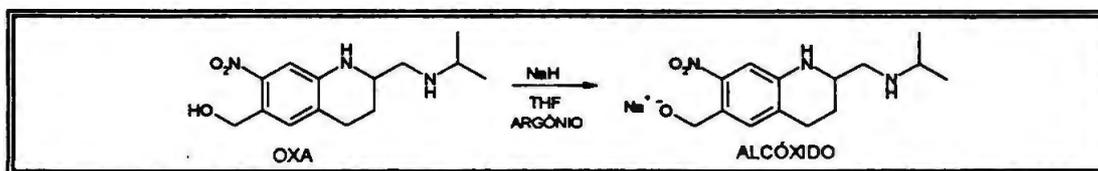
e o resíduo analisado por RMN. condições de reação estão arroladas na TABELA XXI.

TABELA XXI - Condições ensaiadas para obtenção do alcóxido de oxamniquina

Ensaio	OXA (mmol)	Li ⁰ (mmol)	Na ⁰ (mmol)
A	2	2	-
B	2	2,2	-
C	2	-	2
D	2	-	2,2

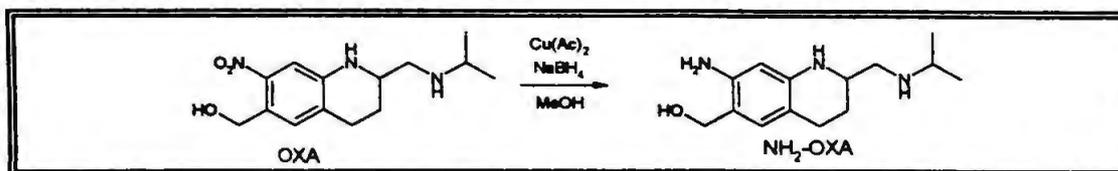
SÍNTESE: 46 – Formação de alcóxido de oxamniquina (NaH)

REAÇÃO ESPERADA:



PROCEDIMENTO:

Em balão de 100 mL de duas bocas, munido de tubo secante, foram adicionados 2 mmol (0,5586g) de OXA, em 15 mL de THF. 2 mmol (0,0576g) de hidreto de sódio 60% foram adicionados à solução sob agitação constante e atmosfera de argônio. A mistura reacional foi deixada sob agitação constante por 24 horas. O solvente foi rotaevaporado e o resíduo analisado por RMN.

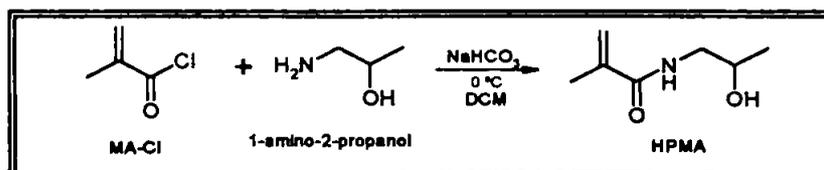
SÍNTESE: 47 – Redução do grupo nitro da oxamniquina**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 100 mL, munido de tubo secante, OXA foi dissolvida em 35 mL de determinado solvente (TABELA XXII) e em seguida, foram adicionados 5 mL de solução saturada de acetato de cobre II. Pequenas porções de boroidreto de sódio foram adicionadas até total de 250 mg. A mistura foi deixada sob agitação vigorosa por 24 horas. A mistura foi lavada com porções de solução saturada de bicarbonato de sódio e o produto extraído com clorofórmio. A solução orgânica seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada. O resíduo foi submetido à purificação em coluna cromatográfica com metanol como fase móvel. O resíduo obtido foi analisado por RMN. As condições ensaiadas estão apresentadas na TABELA XXII.

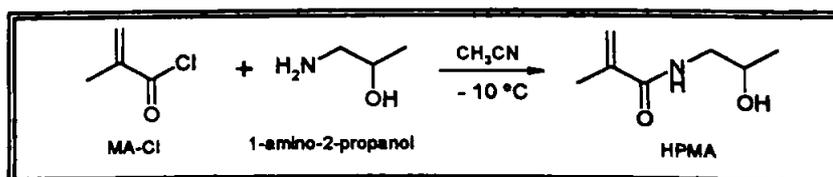
TABELA XXII - Condições ensaiadas para obtenção do derivado amínico da oxamniquina (NH₂-OXA)

Ensaio	OXA (mmol)	Solvente	NaBH ₄ (mmol)	Atmosfera
A ¹	1	metanol	13	normal
B	1	metanol	1,1	normal
C	1	etanol	1,1	normal
D	1	metanol	-	argônio

¹ Cowan, 1988

SÍNTESE: 48 – Síntese do N-(hidroxipropil) metacrilamida (HPMA)**REAÇÃO ESPERADA:****PROCEDIMENTO:**

Em balão de 50 mL, 34 mmol (0,084g) de bicarbonato de sódio anidro foram adicionados em uma solução de 30 mmol (2,31 mL) de 1-amino-2-propanol em 8,5 mL de DCM recém destilado. A suspensão foi resfriada até 0 °C enquanto uma solução de 29 mmol (2,82 mL) de cloreto de metacrilóila em 4,0 mL de DCM foi adicionada gota a gota sob agitação vigorosa por 1 hora. A reação foi agitada por 30 minutos a 15 °C, então 1,0 g de sulfato de sódio anidro foi adicionado. O sólido foi filtrado e o solvente rotaevaporado até metade do volume. O resíduo foi recristalizado de acetona. O produto analisado por CCD.

**SÍNTESE: 49 – Síntese do N-(hidroxipropil) metacrilamida (HPMA)
(MÉTODO: Kopeček, Strolhalm, 1978)****REAÇÃO ESPERADA:**

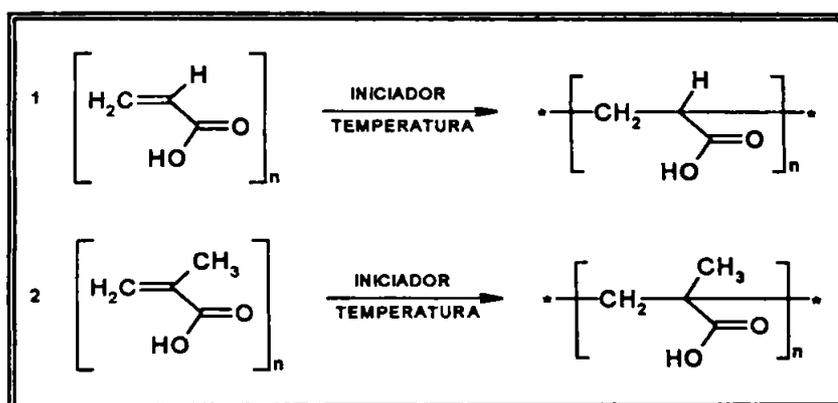
PROCEDIMENTO:

Em um balão de 25 mL munido de funil de adição e termômetro, 30 mmol (2,25 g ~ 2,31 mL) de 1-amino-2-propanol foram dissolvidos em 9 mL de acetonitrila e a solução foi resfriada a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uma solução de 15 mmol (1,5615 g ~ 1,45 mL) de cloreto de metacrilato em 6,5 mL de acetonitrila foi adicionada gota a gota com agitação vigorosa. A temperatura foi mantida abaixo de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ até completa adição. A mistura foi então agitada por mais 30 minutos a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. O cloridrato de 1-amino-2-propanol que precipitou durante a reação foi filtrado e os cristais lavados com nova porção de acetonitrila. O filtrado foi concentrado à metade do volume original em um rotaevaporador (temperatura não excedeu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$) e cristalizado a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os cristais brancos obtidos foram analisados por RMN.

3.1.2.2 Polimerização

Antes de promover a polimerização dos monômeros acrílicos e metacrílicos da oxamniquina, foi necessária a elaboração da metodologia de polimerização. Para tanto, os ácidos acrílico e metacrílico foram previamente polimerizados a fim de adequar-se condições eficientes para a síntese dos derivados poliméricos da oxamniquina. Para a polimerização dos ácidos acrílico e metacrílico (reações 1 e 2, respectivamente), utilizaram-se três técnicas:

REAÇÕES ESPERADAS:



SÍNTESE: 50 - Polimerização com solvente

Em balão de 50 mL, dissolveu-se 1 mL de MA em 2 mL de tolueno. Adicionou-se 0,05 g de peróxido de benzoila e deixou-se a reação sob agitação constante. Aqueceu-se em banho de água até 80 °C por 2 horas. Retirou-se a agitação. Após a turvação da mistura, a polimerização foi instantânea. Lavou-se com éter e então retirou-se o solvente a vácuo. Esta técnica foi também utilizada para o ácido acrílico. Os produtos obtidos foram analisados por ressonância magnética nuclear.

SÍNTESE: 51 - Polimerização sem solvente

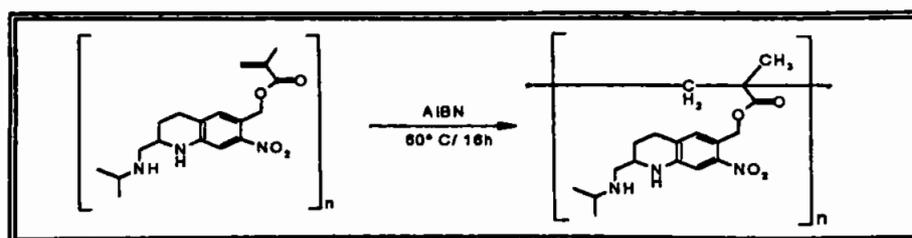
Em balão de 50 mL adicionou-se 1 mL de MA e dissolveu-se 0,05 g de peróxido de benzoíla. Aqueceu-se em banho de água até chegar a temperatura de 80 °C. O início da polimerização é notado pela turvação do meio. Retirou-se o aquecimento e a polimerização foi imediata. O polímero foi lavado com éter etílico e seco sob pressão reduzida. Esta técnica também foi utilizada para o ácido acrílico. Os produtos obtidos foram analisados por ressonância magnética nuclear.

SÍNTESE: 52 - Polimerização na ausência de oxigênio

Em ampola Pyrex de 5 mL adicionou-se 1 mmol (0,0861 g) de ácido metacrílico previamente destilado, 1,0 mL de DMF e 0,5% do iniciador AIBN. Agitou-se bem. A reação foi realizada com ausência de oxigênio pelo borbulhamento de argônio por 1 minuto antes de fechar o sistema. Após ser selada, a ampola foi submetida à temperatura de polimerização (60 –70 °C) e deixada por 16 horas. Ao término da reação, o conteúdo da ampola foi colocado em excesso de éter etílico. A amostra precipitada foi lavada com o solvente 3 vezes e seca sob vácuo. Esta técnica também foi utilizada para o ácido acrílico. Os produtos foram analisados por ressonância.

SÍNTESE: 53 - Polimerização do monômero metacrílico da oxamniquina

O metacrilato de oxamniquina foi polimerizado segundo método descrito na síntese 52.

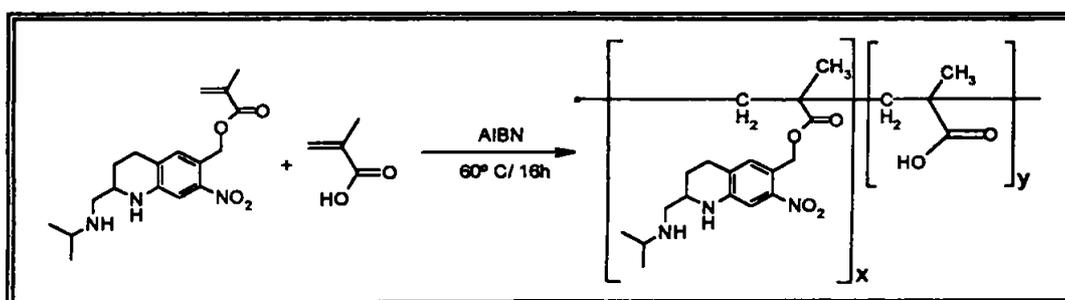
REAÇÃO ESPERADA:

PROCEDIMENTO:

Em ampola Pyrex de 5 mL adicionou-se 1 mmol (0,3633 g) do monômero metacrílico da oxamniquina, 1,0 mL de DMF e 0,5% do iniciador AIBN. Agitou-se bem. A ampola foi fechada sob atmosfera de argônio e deixada à temperatura de 60 –70 °C por 16 horas. Ao término da reação, o conteúdo da ampola foi colocado em excesso de éter etílico. A amostra precipitada foi lavada com o solvente 3 vezes e seca sob vácuo.

SÍNTESE: 54 - Copolimerização do metacrilato de oxamniquina com ácido metacrílico

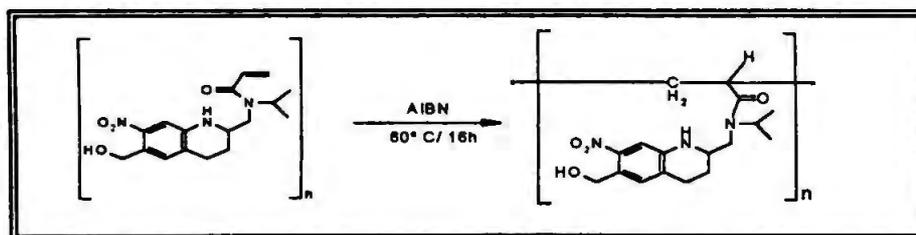
A copolimerização foi realizada segundo técnica descrita para o ácido metacrílico na síntese 52.

REAÇÃO ESPERADA:**PROCEDIMENTO:**

Em ampola Pyrex de 5 mL adicionou-se 1 mmol (0,3633 g) do monômero metacrílico da oxamniquina, 1 mmol (0,0861 g) de ácido metacrílico destilado, 1,0 mL de DMF e 0,5% do iniciador AIBN. Agitou-se bem. A ampola foi fechada sob atmosfera de argônio e deixada à temperatura de 60 –70 °C por 16 horas. Ao término da reação, o conteúdo da ampola foi colocado em excesso de éter etílico. A amostra precipitada foi lavada com o solvente 3 vezes e seca sob vácuo.

SÍNTESE: 55 - Polimerização do monômero acrílico da oxamniquina

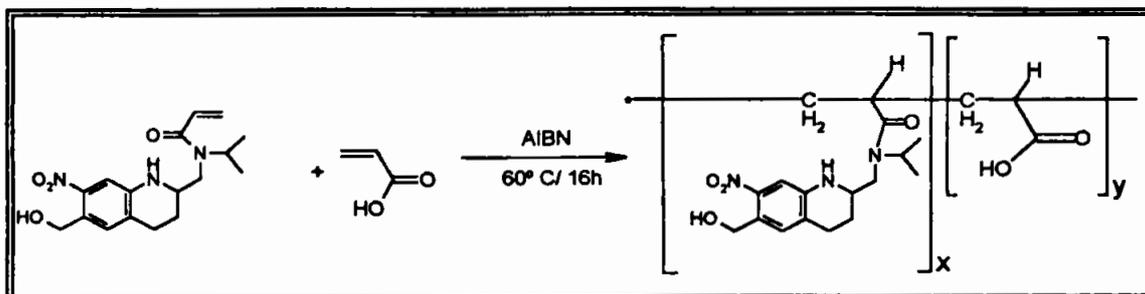
A tentativa de polimerização do acrilato de oxamniquina foi realizada segundo método descrito na síntese 52.

REAÇÃO ESPERADA:**PROCEDIMENTO:**

Em ampola Pyrex de 5 mL adicionou-se 1 mmol (0,3493 g) do monômero metacrílico da oxamniquina, 1,0 mL de DMF e 0,5% do iniciador AIBN. Agitou-se bem. A ampola foi fechada sob atmosfera de argônio e deixada à temperatura de 60 –70 °C por 16 horas. Ao término da reação, o conteúdo da ampola foi colocado em excesso de éter etílico. A amostra precipitada foi lavada com o solvente 3 vezes e seca sob vácuo.

SÍNTESE: 56 - Copolimerização do *N*-acrilóil derivado de oxamniquina (AC-OXA) com ácido acrílico

A copolimerização foi realizada segundo técnica descrita para o ácido metacrílico na síntese 52.

REAÇÃO ESPERADA:**PROCEDIMENTO:**

Em ampola Pyrex de 5 mL adicionou-se 1 mmol (0,3493 g) do monômero acrílico da oxamniquina, 1 mmol (0,0720 g) de ácido acrílico destilado, 1,0 mL de DMF e 0,5% do iniciador AIBN. Agitou-se bem. A ampola foi fechada sob atmosfera de argônio e deixada à temperatura de 60 –70 °C por 16 horas. Ao término da reação, o conteúdo da ampola foi colocado em excesso de éter etílico. A amostra precipitada foi lavada com o solvente 3 vezes e seca sob vácuo.

3.1.2.3 Métodos analíticos (Silverstain, 1998; Wilcox, Wilcox, 1995; Connors, 1982; Phillips, 1983; Shriner, 1983; Schröder *et al.*, 1989; Craver, Provder, 1990; Bikales, 1971; Cárdenas *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 1992; Polacco *et al.*, 2000; Svenson, Nicholls, 2001)

Os métodos utilizados na separação, purificação e caracterização estão descritos a seguir.

3.1.2.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O acompanhamento das reações foi realizado por CCD, utilizando cromatofolhas de alumínio cobertas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). A revelação das placas foi feita por lâmpada de ultravioleta (UV) e iodo.

3.1.2.3.2 Cromatografia em coluna (CC)

Utilizaram-se colunas de 37x5 cm e 20x3 cm e sílica gel 60 (Merck) para a separação e purificação dos produtos obtidos.

3.1.2.3.3 Ponto de fusão

Os pontos de fusão dos produtos sólidos foram obtidos em aparelho para determinação de ponto de fusão Microquímica, modelo MQAPF 301.

3.1.2.3.4 Análise Elementar

A análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo em analisador elementar Perkin Elmer 2400 CHN.

3.1.2.3.5 Espectrometria no infravermelho (IV)

O espectros de absorção na região infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro, FTIR-Bomem, modelo MB-120, no comprimento de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} . As amostras na forma de pó foram incorporadas em pastilhas de KBr (na proporção de 2%).

3.1.2.3.6 Espectrometria por ressonância magnética nuclear

Foi utilizado espectrômetro de ressonância magnética nuclear 300MHz BRÜKER, modelo Advance DPX-300, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os produtos e intermediários foram dissolvidos em clorofórmio ou dimetilsulfóxido deuterados com tetrametilsilano (TMS) como referência interna a 0 ppm.

3.1.2.3.7 Análise Térmica

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) foram obtidas em equipamento Seiko, modelo TG/DTA 6300, na faixa de temperatura de 25 a 1100 °C, utilizando razão de aquecimento de 10 °C/min, atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e massa de amostra em torno de 4 mg, suportada em cadinho de platina.

3.1.2.3.8 Determinação do grau de substituição do copolímero

A determinação do grau de substituição foi feita utilizando-se espectrofotômetro UV/Vis Beckmann DU-70. Para a construção da curva de calibração, utilizaram-se concentrações teóricas de oxamniquina que variavam de 1 a 16 $\mu\text{g/mL}$ em comprimento de onda máximo de 270 nm, utilizando DMF como solvente. Analisou-se o copolímero, utilizando o mesmo comprimento de onda e solvente e a concentração de oxamniquina foi obtida pela extrapolação da absorbância na curva de calibração.

3.1.2.3.9 Difração de Raios-X

Os difratogramas de raios-X foram realizados com um difratômetro de Raios-X, Siemens D5000, com tubo de CuK_α em intervalo de 3 a 65°, com passo de 0,05 (θ) e tempo de passo de 1 segundo, utilizando o método do pó.

3.1.2.4 Métodos biológicos

Os ensaios para avaliação da atividade biológica dos novos compostos foram realizados em conjunto com pesquisadores do Setor de Esquistossomose do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL-SP). A seguir está descrita a metodologia empregada na realização dos ensaios.

Teste para avaliação da atividade terapêutica

a) Infecção dos animais

Foram utilizados camundongos "SWISS", machos pesando entre 37 e 40 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do IAL-SP. Os animais foram infectados por via subcutânea, cada qual com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*, cepa BH, mantida no Setor de Esquistossomose do IAL-SP. Para confirmação da infecção, as fezes dos roedores foram examinadas, individualmente, através do método direto, para a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni*, a partir do 45º dia após inoculação (o 45º dia representa o período em que ovos maduros são encontrados nas fezes, ponto final do ciclo no hospedeiro definitivo). Somente os animais que apresentaram ovos nas fezes foram utilizados nos experimentos.

b) Administração dos fármacos e esquemas posológicos

Os camundongos infectados, selecionados na fase anterior foram distribuídos em grupos de 15 exemplares cada e submetidos aos esquemas posológicos com as novas substâncias. A dosagem inicial (50 mg/kg) escolhida foi a metade da dose usual de oxamniquina (100 mg/kg de peso). Cabe salientar que a dose do pró-fármaco foi estabelecida segundo dados obtidos a partir do grau de substituição do fármaco do copolímero. Como trata-se de pró-fármaco polimérico, a dose de 50 mg/kg foi escolhida propositalmente, visando a avaliação do prolongamento de ação e a redução da frequência de administração.

Como grupos controle foram mantidos:

- 1) 15 animais infectados e não tratados;
- 2) 15 animais infectados que receberam somente o veículo (solução aquosa 15% de Cremophor EL[®]);
- 3) 15 animais infectados que receberam oxamniquina empregada na obtenção dos novos derivados, suspensa em solução aquosa 15% de Cremophor EL[®] (100 mg/kg);
- 4) 15 animais infectados que receberam oxamniquina empregada na obtenção dos novos derivados, suspensa em solução aquosa 15% de Cremophor EL[®] (50 mg/kg);
- 5) 15 animais infectados que receberam ácido polimetacrílico (polímero transportador) em solução aquosa 15% de Cremophor EL[®] (50 mg/kg);

Outros três grupos, de 15 animais cada, receberam os derivados, também suspensos em solução aquosa 15% de Cremophor EL[®]:

- 6) monômero A (acrilato de oxamniquina – 50 mg/kg);
- 7) monômero B (metacrilato de oxamniquina - 50 mg/kg);
- 8) pró-fármaco polimérico (ácido poli(metacrílico-co-metacrilato de oxamniquina – 50 mg/kg);

A TABELA XXIII mostra, sucintamente, o esquema utilizado para os ensaios de atividade.

TABELA XXIII – Substâncias administradas e os respectivos períodos de avaliação

ANIMAIS/Quantidade	SUBSTÂNCIA	AVALIAÇÃO	AVALIAÇÃO
GRUPO 1/ 15 animais	ausente	10 DIAS	-
GRUPO 2/ 15 animais	Cremophor	10 DIAS	-
GRUPO 3/15 animais	oxamniquina (100 mg/Kg)	10 DIAS	-
GRUPO 4/15 animais	oxamniquina (50 mg/Kg)	10 DIAS	20 dias
GRUPO 5/15 animais	Ácido polimetacrílico	10 DIAS	-
GRUPO 6/15 animais	monômero A	10 DIAS	20 dias
GRUPO 7/15 animais	monômero B	10 DIAS	20 dias
GRUPO 8/15 animais	pró-fármaco	10 DIAS	20 dias

Cada derivado foi suspenso em solução aquosa 15% de Cremophor EL® e administrado por via oral, em dose única, através de sonda gástrica, com volume igual a 0,3 mL por animal.

c) Avaliação da eficácia dos pró-fármacos

Os animais dos grupos controle 1, 2, 3 e 5 foram sacrificados por asfixia em cuba de CO₂ dez dias após o tratamento, enquanto os animais dos grupos 4, 6, 7 e 8 foram sacrificados dez e vinte dias após o tratamento. De cada camundongo, foram retirados dois fragmentos do intestino delgado, de 1 cm cada, para pesquisa de ovos e identificação dos seus estágios de desenvolvimento (técnica do oograma quantitativo) (Pellegrino, Faria, 1965). Os vermes adultos serão pesquisados e quantificados pela técnica da perfusão das veias mesentéricas e porta (Pellegrino, Siqueira, 1956).

Os resultados obtidos nos grupos experimentais foram confrontados com os dados relativos aos animais controle.

3.1.2.4 Ensaio de liberação

A partir dos pró-fármacos obtidos, serão realizados testes farmacocinéticos *in vitro*, similares aos efetuados *in vivo*, para comprovar a liberação do fármaco. Estes testes serão realizados no Laboratório de Química Farmacêutica da FCF/USP.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS

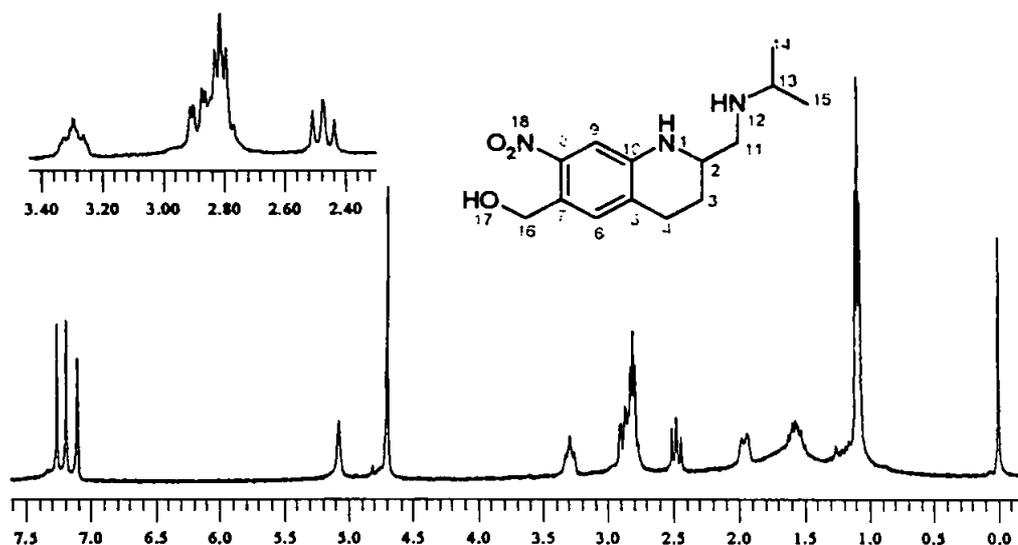
4.1.1 Produto farmacêutico e principais reagentes

O fármaco oxamniquina foi gentilmente cedido pelos Laboratórios Pfizer Ltda e encontra-se puro e adequado para síntese. Os demais reagentes foram adquiridos comercialmente, exceto o cloreto de metacrilóila que foi preparado e destilado segundo procedimento já mencionado. Todos encontram-se puros. Os espectros a seguir são demonstrativos e servem também como referência para análise de produtos posteriores. A TABELA XXIV mostra os ensaios de solubilidade realizados para oxamniquina.

TABELA XXIV – Solubilidade* da oxamniquina

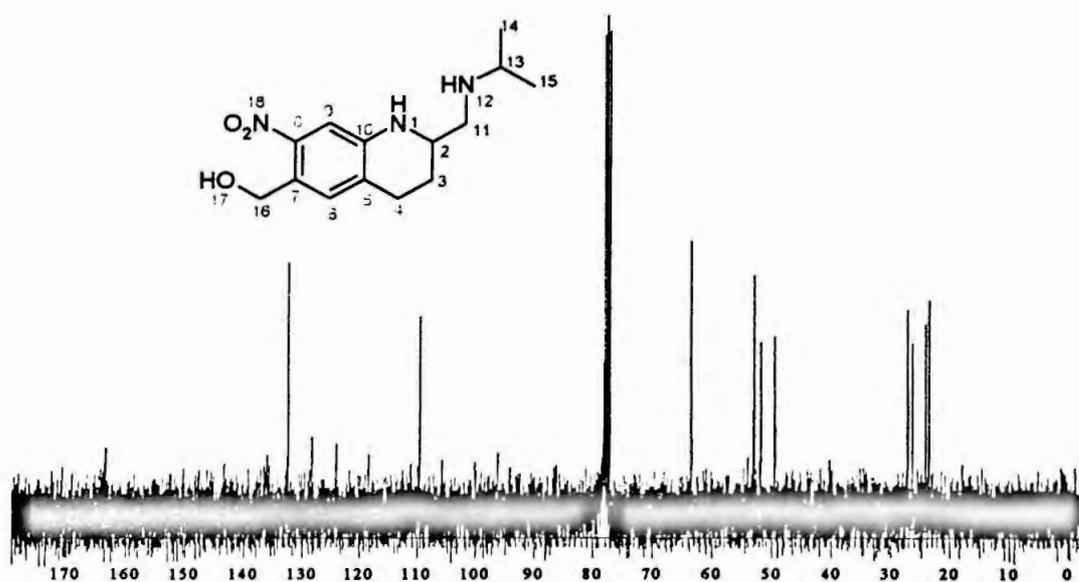
Solvente	Temperatura ambiente	Temperatura 50°C
Acetato de etila	levemente solúvel	solúvel
Acetona	pouco solúvel	pouco solúvel
Água	insolúvel	insolúvel
Clorofórmio	solúvel	-
Diclorometano	solúvel	-
Etanol	pouco solúvel	solúvel
Éter	insolúvel	-
Hexano	insolúvel	-
Isopropanol	pouco solúvel	solúvel
Metanol	solúvel	solúvel

* Segundo Parise Filho *et al.*, 2001.

Espectro 1 - RMN ¹H da oxamniquina.TABELA XXV: Atribuições de RMN ¹H do OXA

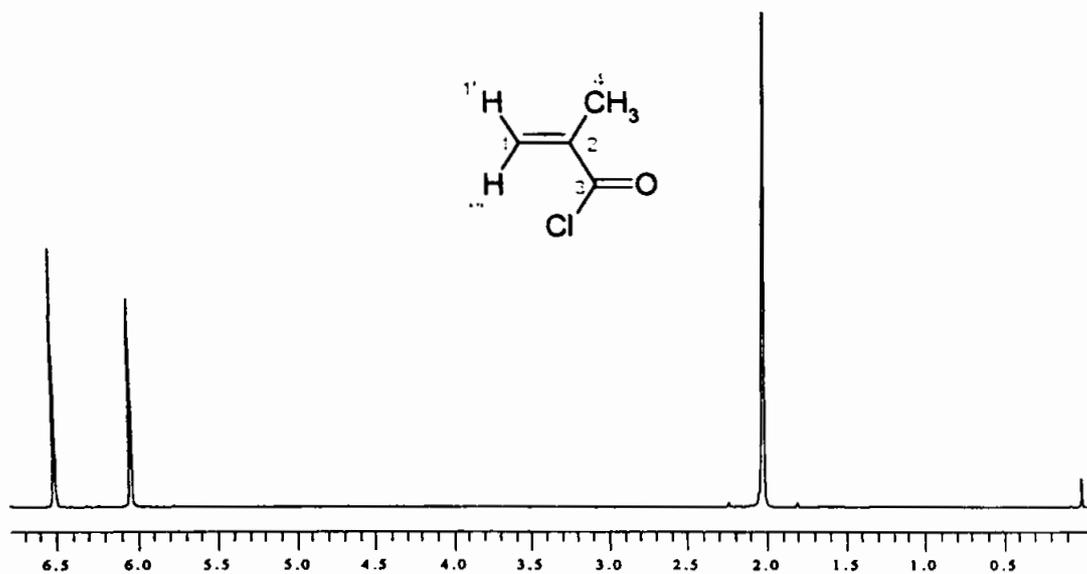
RMN - ¹ H (DMSO-d ₆ , 300MHz, δ=ppm)
3,31 (m, 1H, H-2); 1,96 (dd, 1H, H-3 equatorial); 1,56 (m, 1H, H-3' axial); 2,80 (m, 2H, H-4), 7,19 (s, 1H, H-6); 7,10 (s, 1H, H-9); 2,90-2,85 (dd, 1H, H-11 gauche); 2,48 (t, 1H, H-11' anti); 2,86-2,76 (m, 1H, H-13); 1,25 (d, 3H, H-14*); 1,22 (d, 3H, 15*); 4,69 (s, 2H, H-16); 5,07 (s, 1H, H-17)

* podem estar trocados

Espectro 2 - RMN ¹³C da oxamniquina.TABELA XXVI: Atribuições de RMN ¹³C da oxamniquina

RMN - ¹³ C (DMSO-d ₆ , 75MHz, δ=ppm)
52,42 (C2); 25,70 (C3); 26,55 (C4); 127,70 (C5); 131,74 (C6); 123,54 (C7); 144,83 (C8); 109,94 (C9); 147,38 (C10); 51,24 (C11); 48,92 (C13); 22,87 (C14*); 23,46 (C15*); 62,89 (C16)

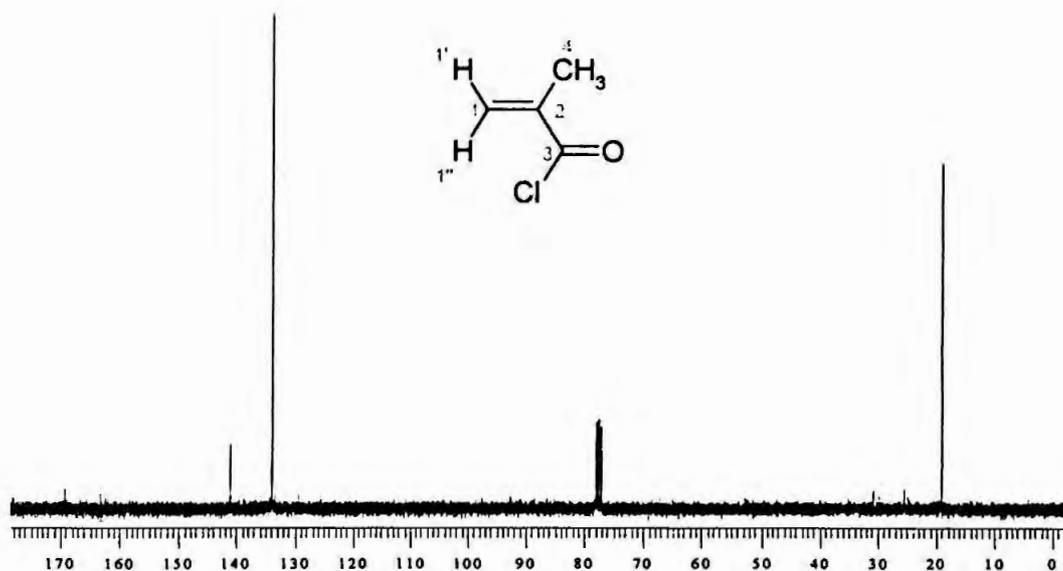
*podem estar trocados



Espectro 3 - RMN ¹H do cloreto de metacrilóila.

TABELA XXVII: Atribuições de RMN ¹H do cloreto de metacrilóila

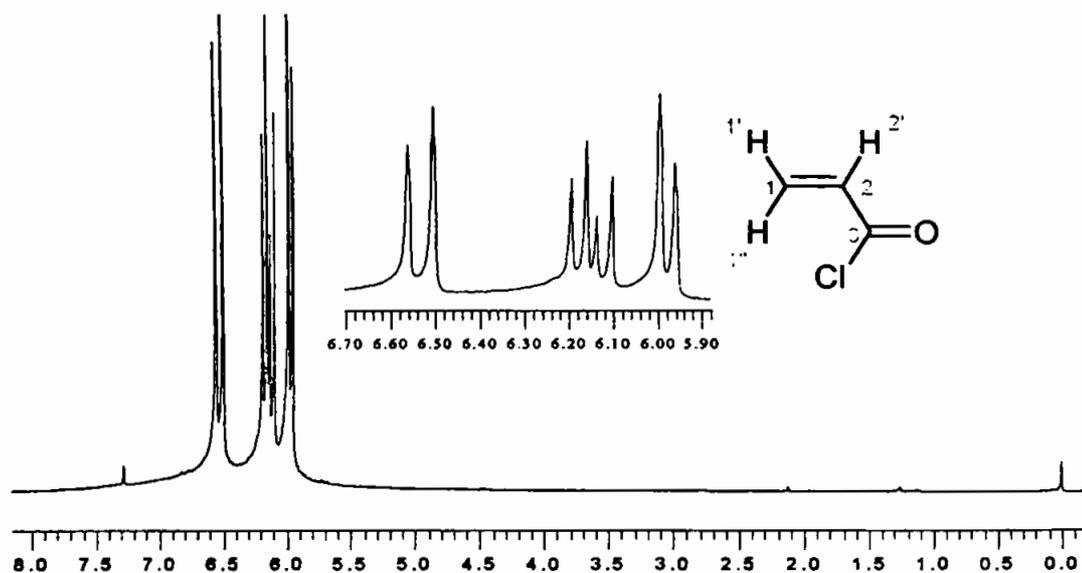
RMN - ¹ H (DMSO-d ₆ , 300MHz, δ=ppm)
6,5 (s, 1H, H-1'); 6,01 (s, 1H, H-1''); 2,06 (s, 3H, H-4)



Espectro 4 - RMN ¹³C do cloreto de metacrilóila.

TABELA XXVIII: Atribuições de RMN ¹³C do cloreto de metacrilóila

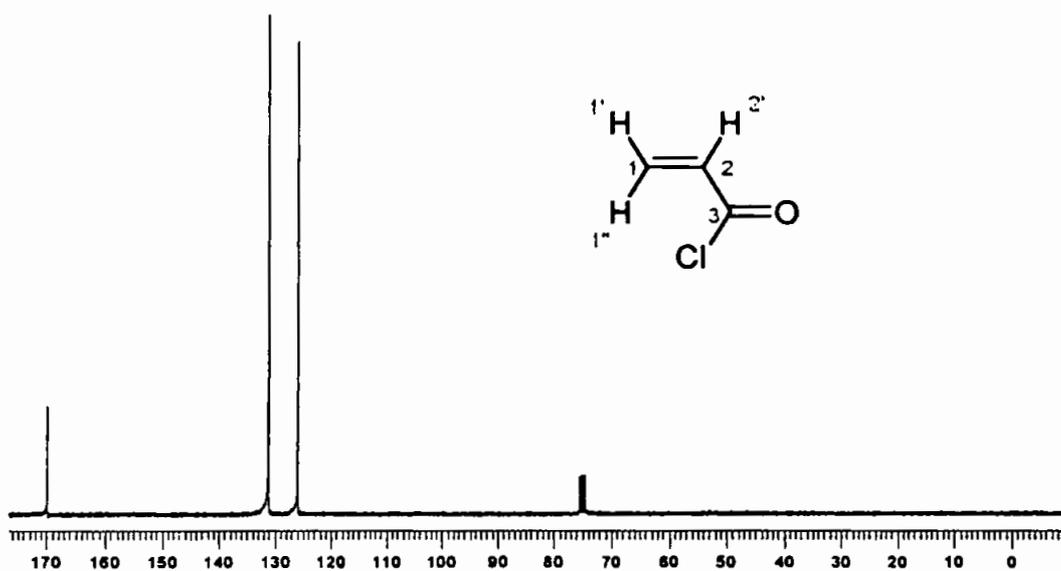
RMN - ¹³ C (DMSO-d ₆ , 75MHz, δ=ppm)
134,12 (C1); 141,67 (C2); 169,58 (C3); 19,45 (C4)



Espectro 5 - RMN ^1H do cloreto de acrilóila.

TABELA XXIX: Atribuições de RMN ^1H do cloreto de acrilóila

RMN - ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)
6,65 (d, 1H, H-1", $J_{\text{trans}}=16,0$); 6,19 (d, 1H, H-1', $J_{\text{cis}}=10,1$); 6,32 (dd, 1H, H-2, $J_{\text{cis}}=9,8$, $J_{\text{trans}}=17,1$)



Espectro 6 - RMN ^{13}C do cloreto de acrilóia.

TABELA XXX: Atribuições de RMN ^{13}C do cloreto de acrilóia

RMN - ^{13}C (DMSO- d_6 , 75MHz, δ =ppm)
126,1 (C1); 131,5 (C2); 170,01 (C3)

4.1.2 Síntese dos monômeros

4.1.2.1 Monômeros diretamente ligados ao fármaco (Rota A)

4.1.2.1.1A Esterificação com cloretos de ácido

SÍNTESE: 1 – Síntese do monômero acrílico da oxamniquina

TABELA XXXI – Aspecto físico do produto e análise realizada

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	Semi-sólido vermelho	RMN ^1H e ^{13}C	Não obtido
B	Semi-sólido alaranjado	RMN ^1H e ^{13}C	Não obtido
C	Semi-sólido vermelho	RMN ^1H	Não obtido
D	Semi-sólido vermelho	RMN ^1H	Não obtido
E	Semi-sólido alaranjado	RMN ^1H	Não obtido
F	Semi-sólido vermelho	RMN ^1H	Não obtido
G	Semi-sólido vermelho	RMN ^1H	Não obtido
H	Semi-sólido vermelho	RMN ^1H	Não obtido
I*	Semi-sólido alaranjado	RMN ^1H e ^{13}C	Não obtido
J*	Semi-sólido alaranjado	RMN ^1H e ^{13}C	Não obtido

* trietilamina

A análise dos produtos foi feita essencialmente por ressonância magnética nuclear. Segundo os espectros houve a formação vários subprodutos, os quais não foram separados quando submetidos à cromatografia por coluna. As reações mostraram baixa seletividade e baixo rendimento.

SÍNTESE: 2 – Síntese do monômero metacrílico da oxamniquina**TABELA XXXII – Aspecto físico do produto e análise realizada.**

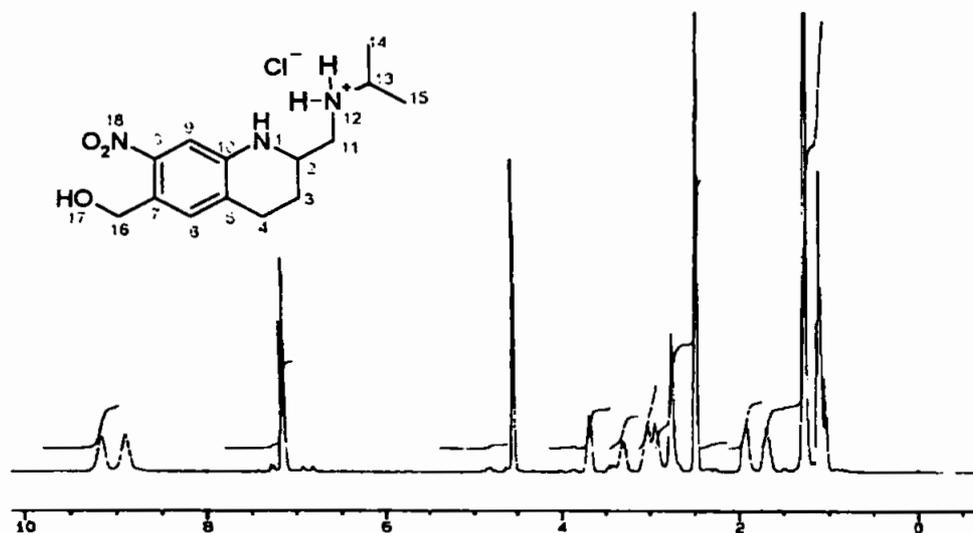
Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	Sólido marrom claro	RMN ¹ H	Não obtido
B	Sólido alaranjado	RMN ¹ H	Não obtido
C	Semi-sólido amarelo	RMN ¹ H	Não obtido
D	Semi-sólido marrom claro	RMN ¹ H	Não obtido
E	Semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	Não obtido
F	Semi-sólido marrom claro	RMN ¹ H	Não obtido
G	Semi-sólido marrom claro	RMN ¹ H	Não obtido
H	Semi-sólido marrom claro	RMN ¹ H	Não obtido
I*	Sólido alaranjado	RMN ¹ H	Não obtido
J*	Sólido alaranjado	RMN ¹ H	Não obtido

* trietilamina

À semelhança da reação anterior, os produtos foram analisados por ressonância magnética nuclear. Houve a formação de vários subprodutos que não foram separados eficientemente por coluna cromatográfica. Todas as reações apresentaram baixo rendimento e difícil reprodutibilidade. A reação mostrou ser lenta e pouca seletiva.

SÍNTESE: 3 – Reação de proteção de grupos funcionais: Formação do cloridrato de oxamniquina

O produto foi analisado por ressonância magnética nuclear e pela hidrossolubilidade. O produto apresenta-se fisicamente como sólido na forma de pó, amarelo claro. Como observado no Espectro 1, houve a formação do sal de oxamniquina (cloridrato de oxamniquina). Embora a formação do cloridrato não tenha ocorrido nas duas aminas, o cloridrato de oxamniquina foi muito mais solúvel em água que sua forma base. A reação apresentou rendimento de 85%.

Espectro 7 - RMN ^1H do cloridrato de oxamniquina.TABELA XXXIII: Atribuições de RMN ^1H do cloridrato de oxamniquina

 RMN - ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)

3,70 (m, 1H, H-2); 1,93 (dd, 1H, H-3 equatorial); 1,72 (m, 1H, H-3' axial);
 2,77 (m, 2H, H-4), 7,17 (s, 1H, H-6); 7,14 (s, 1H, H-9); 3,04 (dd, 1H, H-11
 gauche); 3,32 (m, 1H, H-13); 1,14 (d, 3H, H-14*); 1,15 (d, 3H, H-15*); 4,57
 (s, 2H, H-16); 9,15 (slargo, 1H, H-12); 8,89 (slargo, 1H, H-12')

* podem estar trocados

SÍNTESE: 4 – Reação de esterificação entre o cloridrato de oxamniquina e cloreto de acrilóila

TABELA XXXIV – Aspecto físico do produto e análise realizada.

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	sólido amarelado	RMN ¹ H	Não obtido
B	sólido alaranjado	RMN ¹ H	Não obtido
C	sólido amarelo	RMN ¹ H	Não obtido
D	semi-sólido avermelhado	RMN ¹ H	Não obtido

Os produtos foram analisados por ressonância magnética nuclear e cromatografia em camada delgada (CCD). Pela CCD, observou-se a formação de subprodutos, mas os espectros mostram a não formação do produto esperado, mesmo quando se variaram solvente, temperatura e tempo de reação. Não foi possível a separação dos compostos. Houve problemas de reprodutibilidade.

SÍNTESE: 5 – Reação de esterificação entre o cloridrato de oxamniquina e cloreto de metacrilóila

TABELA XXXV – Aspecto físico do produto e análise realizada.

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	semi-sólido amarelo	RMN ¹ H	Não obtido
B	semi-sólido amarelo	RMN ¹ H	Não obtido
C	semi-sólido marrom-amarelado	RMN ¹ H	Não obtido
D	semi-sólido marrom avermelhado	RMN ¹ H	Não obtido

Os produtos desta reação foram analisados por RMN e CCD. À semelhança da síntese anterior, os produtos obtidos não foram os esperados. Houve problemas de separação, rendimento e de reprodutibilidade. A variação da temperatura, solvente e tempo de reação não resultou em mudanças significativas.

SÍNTESE: 6 – Reação de proteção de grupos funcionais: Acetilação**Primeira etapa (triacetilação)****TABELA XXXVI – Aspecto físico do produto e análise realizada**

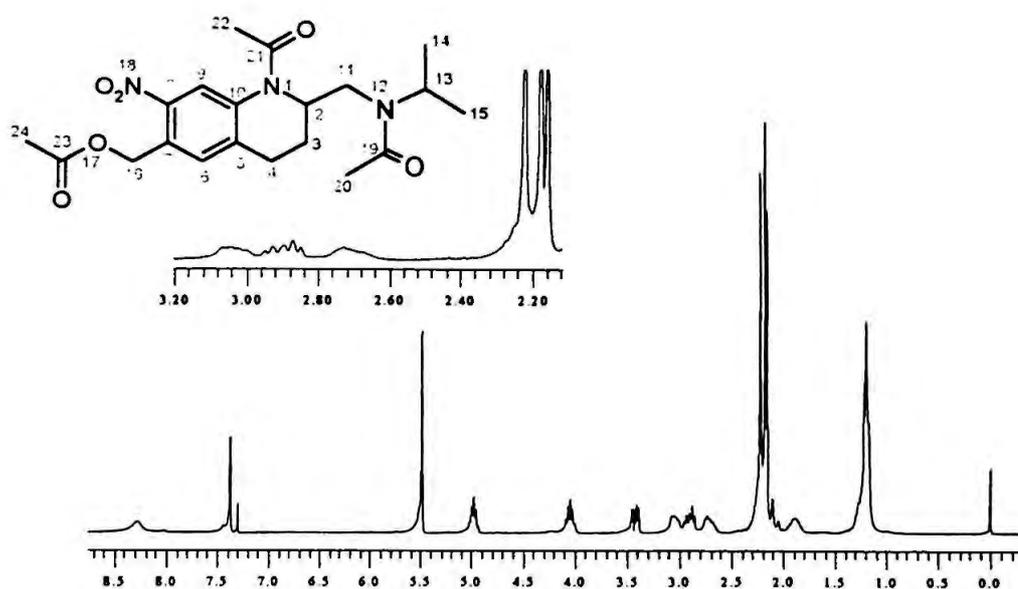
Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	semi-sólido marrom claro	RMN ¹ H	impuro
B	Sólido alaranjado	RMN ¹ H	impuro
C	semi-sólido amarelo	RMN ¹ H	impuro
D	semi-sólido marrom claro	RMN ¹ H	impuro
E	sólido amarelo-claro	RMN ¹ H/P.F./solubilidade	obtido
F	sólido amarelo -claro	RMN ¹ H/P.F./solubilidade	obtido

Os produtos obtidos foram analisados por RMN, ponto de fusão e solubilidade. A CCD revelou a formação de um produto mais apolar em relação à oxamniquina. Os espectros 8 e 9 revelam a formação do produto esperado. O produto apresenta-se sob a forma de cristais amarelo-claros. O composto apresentou faixa de fusão 133-136 °C. A reação F apresentou melhor rendimento, 68%. A solubilidade em diversos solventes está apresentada na TABELA XXXVII.

TABELA XXXVII – Solubilidade* do derivado triacetilado

Solvente	Temperatura ambiente	Temperatura 50°C
Acetato de etila	pouco solúvel	solúvel
Acetona	solúvel	solúvel
Água	insolúvel	insolúvel
Clorofórmio	muito solúvel	-
Diclorometano	muito solúvel	-
Etanol	pouco solúvel	solúvel
Éter	insolúvel	-
Hexano	insolúvel	-
Isopropanol	insolúvel	solúvel
Metanol	solúvel	solúvel

* Segundo Farmacopéia Brasileira 4ª edição.



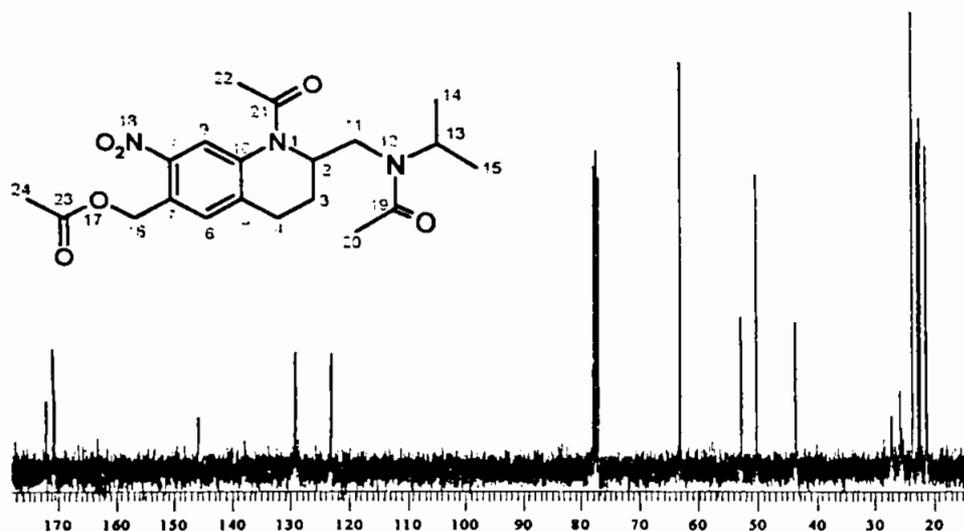
Espectro 8 - RMN ^1H do derivado triacetilado da oxamniquina.

TABELA XXXVIII: Atribuições de RMN ^1H do do derivado triacetilado

RMN - ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)

4,88-5,06 (m, 1H, H-2); 3,05-2,99 (dd, 1H, H-3 equatorial); 1,88 (m, 1H, H-3' axial); 2,84-2,94 (m, 2H, H-4), 7,35 (s, 1H, H-6 e H-9); 3,38-3,44 (dd, 1H, H-11 gauche); 2,73-2,70 (m, 1H, H-11' anti); 3,98-4,07 (m, 1H, H-13); 1,18 (d, 3H, H-14*); 1,20 (d, 3H, H-15*); 5,48 (s, 2H, H-16); 2,15 (s, 3H, H-20); 2,17 (s, 3H, H-22); 2,21 (s, 3H, H-24)

* podem estar trocados



Espectro 9 - RMN ^{13}C do derivado triacetilado da oxamniquina.

TABELA XXXIX: Atribuições de RMN ^{13}C do do derivado triacetilado

RMN - ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz, δ =ppm)

52,23 (C2); 25,00 (C3); 26,72 (C4); 129,23 (C6); 145,80 (C8); 123,14 (C9);
 162,9 (C10); 43,06 (C11); 49,12 (C13); 23,10 (C14*); 25,1 (C15*); 62,70
 (C16); 170,60 (C19); 21,74 (C20); 170,76 (C21); 20,75 (C22); 171,98 (C23);
 20,66 (C24)

* podem estar trocados

Segunda etapa (Hidrólise seletiva do éster)

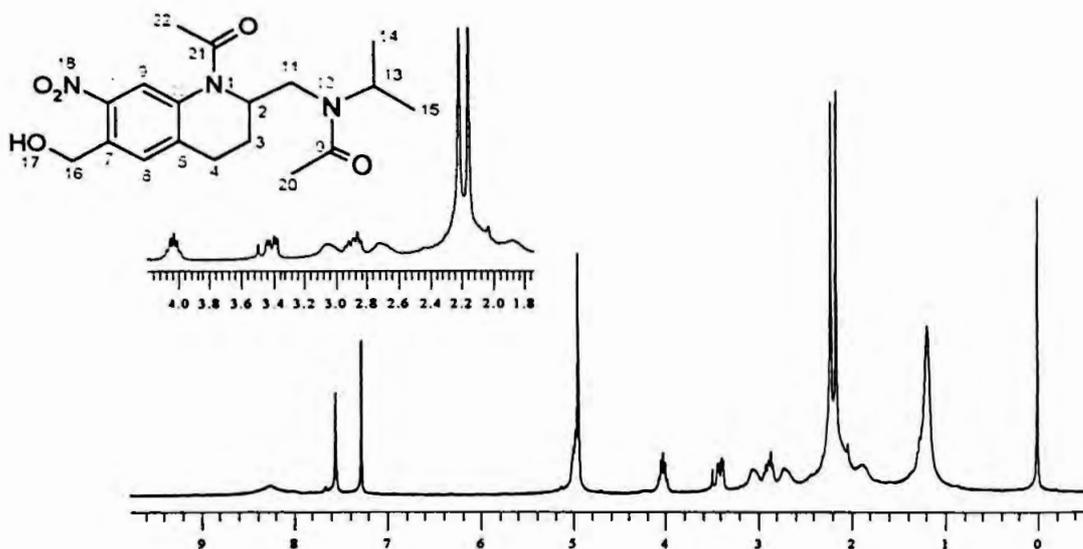
Os produtos obtidos foram analisados por ressonância magnética nuclear, ponto de fusão e solubilidade. A CCD revelou a formação composto único, mais polar que o derivado triacetilado. Os espectros 10 e 11 revelam a formação do produto diacetilado esperado. O aspecto físico do produto é pó laranja acastanhado bem fino. O composto apresentou faixa de fusão de: 162-167 °C. O rendimento da reação foi de 51%. A solubilidade em diversos solventes está apresentada na TABELA XL.

TABELA XL – Solubilidade* do derivado diacetilado

Solvente	Temperatura ambiente	Temperatura 50°C
Acetato de etila	pouco solúvel	Solúvel
Acetona	solúvel	Solúvel
Água	insolúvel	Insolúvel
Clorofórmio	muito solúvel	muito solúvel
Diclorometano	muito solúvel	muito solúvel
Etanol	solúvel	Solúvel
Éter	insolúvel	Insolúvel
Hexano	insolúvel	Insolúvel
Isopropanol	pouco solúvel	Solúvel
Metanol	solúvel	Solúvel

* Segundo Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

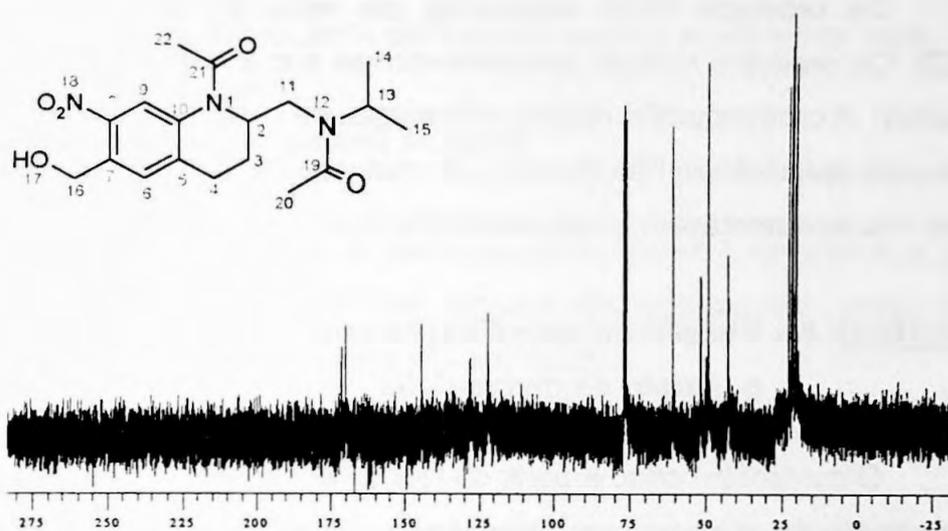


Espectro 10 - RMN ^1H do derivado diacetilado da oxamniquina.

TABELA XLI: Atribuições de RMN ^1H do do derivado diacetilado

RMN - ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)
5,01-4,93 (m, 1H, H-2); 3,05-3,03 (dd, 1H, H-3 equatorial); 1,86-1,85 (m, 1H, H-3' axial); 2,93-2,83 (m, 2H, H-4), 7,65 (s, 1H, H-6 e H-9); 3,43-3,36 (dd, 1H, H-11 gauche); 2,70 (m, 1H, H-11' anti); 3,99 (m, 1H, H-13); 1,17 (d, 3H, H-14*); 1,18 (d, 3H, H-15*); 5,00 (s, 2H, H-16); 8,1 (Slargo, 1H, H-17), 2,14 (s, 3H, H-20); 2,18 (s, 3H, H-22)

* podem estar trocados



Espectro 11 – RMN ¹³C do derivado diacetilado da oxamniquina.

TABELA XLII: Atribuições de RMN ¹³C do do derivado diacetilado

RMN - ¹³ C (CDCl ₃ , 75MHz, δ=ppm)
52,23 (C2); 25,00 (C3); 27,09 (C4); 129,23 (C6); 145,14 (C8); 122,65 (C9); 162,9 (C10); 43,20 (C11); 49,81 (C13); 22,27 (C14*); 23,22 (C15*); 61,94 (C16); 170,45 (C19); 21,73 (C20); 170,9 (C21); 20,76 (C22)

* podem estar trocados

SÍNTESE: 7 – Reação de esterificação entre a oxamniquina diacetilada e o cloreto de acrilóila

Os produtos foram analisados por ressonância magnética nuclear e CCD. Os produtos obtidos apresentavam-se sob a forma sólida, de coloração marrom. A cromatografia revelou a formação de compostos intermediários, mas que pela ressonância não mostrou ser derivado vinílico, pois na região de 5 a 6 ppm não apresentavam sinais característicos.

SÍNTESE: 8 – Reação de esterificação entre a oxamniquina diacetilada e o cloreto de metacrilóila

O composto obtido a partir da reação entre a oxamniquina e o cloreto de metacrilóila foi analisado por ressonância magnética nuclear e CCD. O produto obtido apresentou-se sob a forma de sólido marrom escuro. A CCD revela a formação de subprodutos e em maior grau a presença de material de partida. A ressonância apresentou que pouco derivado diacetilado não reagiu com o cloreto de metacrilóila.

4.1.2.1.1B Esterificação direta com ácidos

SÍNTESE: 9 – Síntese do metacrilato de oxamniquina (MA-OXA)

TABELA XLIII – Aspecto físico do produto e análise realizada

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido
B	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido
C	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	impuro
D	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	impuro
E	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido
F	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido
G	sólido alaranjado	P.F./Microanálise/ solubilidade/ RMN ¹ H, ¹³ C e DEPT	obtido
H	sólido alaranjado	P.F./Microanálise/ solubilidade/ RMN ¹ H, ¹³ C e DEPT	obtido
I	sólido alaranjado	P.F./Microanálise/ solubilidade/ RMN ¹ H, ¹³ C e DEPT	obtido

O produto obtido foi analisado por ponto de fusão, análise elementar, solubilidade, RMN ^1H , ^{13}C e DEPT e espectrofotometria no infravermelho, além da cromatografia em camada delgada. Todas as reações (A a H) foram produtivas, entretanto, a reação H apresentou melhor rendimento, 69%.

Cromatografia em camada delgada

Pela CCD, observou-se a reação total da oxamniquina com o ácido metacrílico. Embora outras manchas tenham sido observadas, estas foram facilmente separadas por cromatografia em coluna.

Cromatografia em coluna

O sistema solvente acetato de etila/metanol (7:3) apresentou melhores resultados em relação ao éter etílico/metanol (7:3). O primeiro mostrou-se adequado para a separação e purificação do produto obtido.

Ponto de fusão

O monômero metacrílico, após purificação e secagem, apresentou ponto de fusão entre 65° e 67°C.

Análise elementar

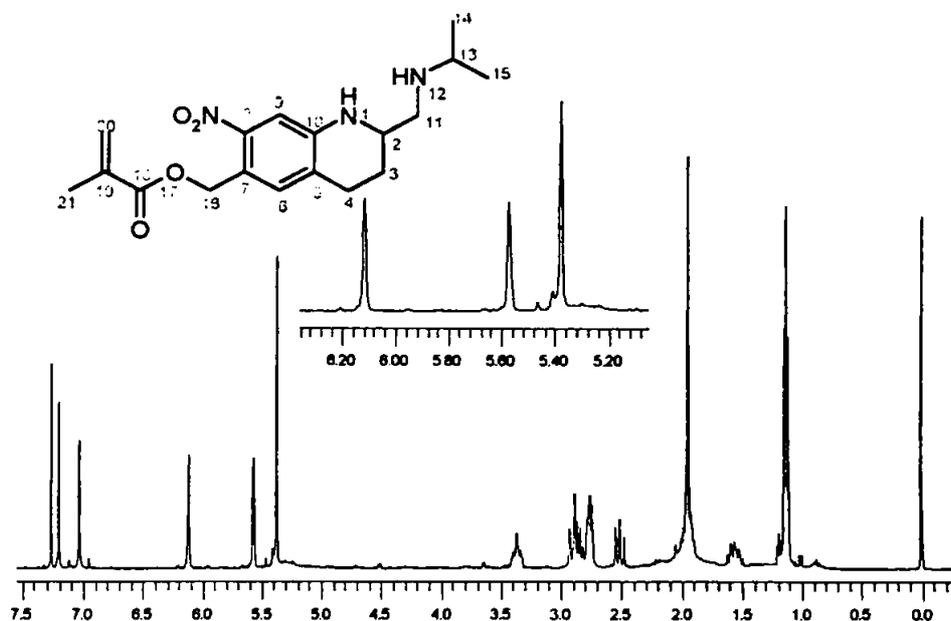
A TABELA XXXIX apresenta os percentuais de cada elemento na fórmula molecular do monômero metacrílico da oxamniquina. Estão relacionados os valores teóricos e os determinados experimentalmente.

TABELA XLIV – Dados obtidos pela análise elementar do derivado da oxamniquina

MONÔMERO METACRÍLICO DA OXAMNIQUINA		
Fórmula empírica: C₁₈H₂₅N₃O₄ Peso molecular: 347,42		
ANÁLISE	Calculado	Experimental
Carbono	62,23%	61,89%
Hidrogênio	7,25%	7,08%
Nitrogênio	12,09%	11,94%

Espectrometria por ressonância magnética nuclear

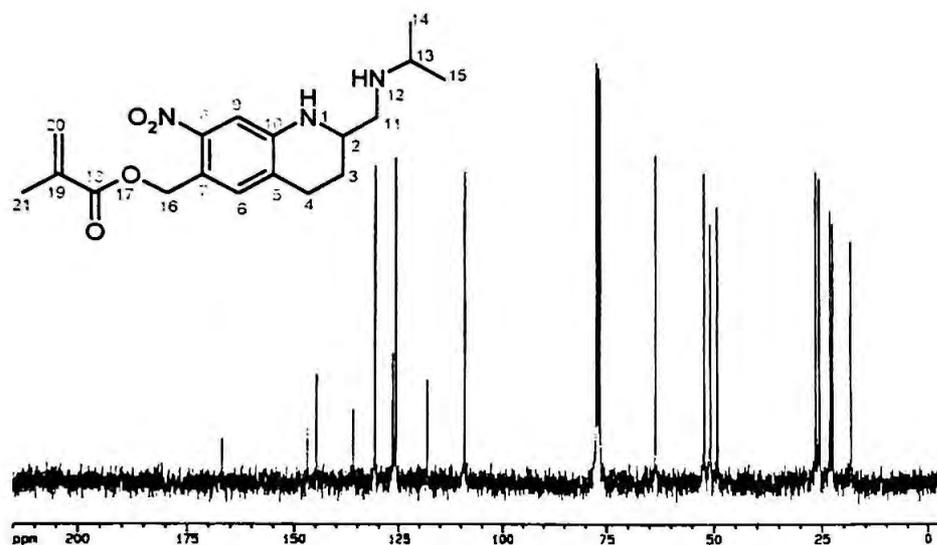
O espectro 12 mostra a formação do monômero metacrílico da oxamniquina, o qual pode ser confirmado pelo deslocamento químico especialmente do próton H-16 (5,37 ppm) e pelo aparecimento dos sinais 6,11 ppm (H-20^{*}), 5,57 ppm (H-20[']) e 1,98 ppm (H-21) representando os prótons olefínicos e a metila, respectivamente. Pelo espectro de RMN ¹³C (Espectro 13), a ligação éster pode ser comprovada pelo aparecimento da carbonila em 167,46ppm (C18), evidenciando a formação do monômero na posição desejada. O espectro 14 de DEPT ajuda a confirmar o composto obtido.



Espectro 12- RMN ¹H do metacrilato de oxamniquina (MA-OXA).

TABELA XLV: Atribuições de RMN ¹H do MA-OXA

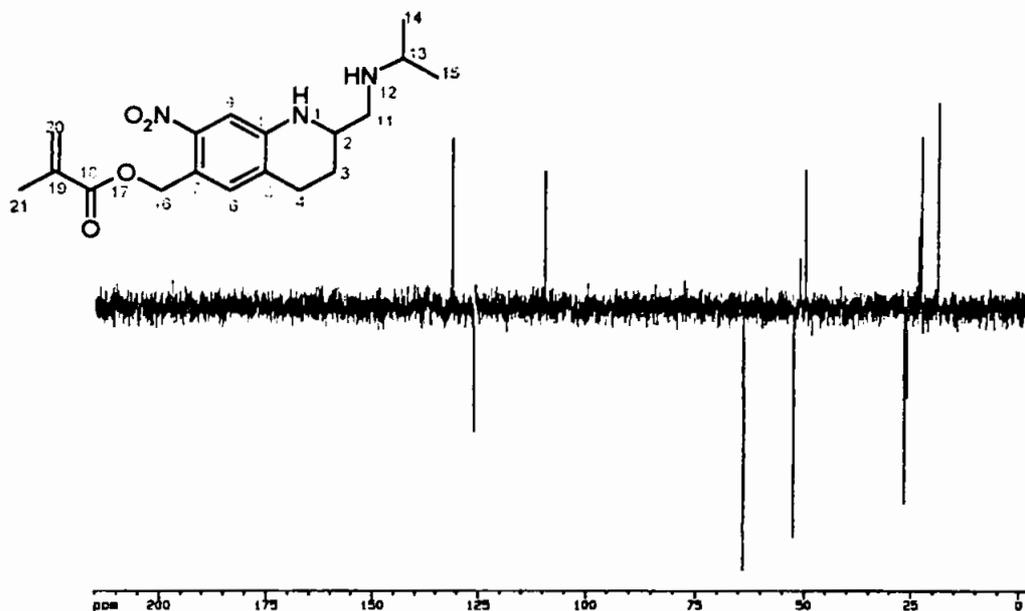
RMN - ¹ H (DMSO-d ₆ , 300MHz, δ=ppm, J=Hz)
3,36 (m, 1H, H-2); 1,98-1,91 (dd, 1H, H-3 equatorial); 1,58-1,52 (m, 1H, 3' axial); 2,80 (t, 2H, H-4); 7,20 (s, 1H, H-6); 7,03 (s, 1H, H-9); 2,93-2,88 (dd, 1H, H-11, J _{anti} =9,5); 2,51 (t, 1H, 11', J _{gauche} = 6,7); 2,89-2,80 (m, 1H, H-13); 1,12 (d, 3H, H-14*, J=6,7); 1,10 (d, 3H, H-15*, J=6,7); 5,37 (s, 2H, H-16); 6,11 (s, 1H, H-20); 5,57 (s, 1H, H-20'); 1,95 (s, 3H, H-21)



Espectro 13 - RMN ^{13}C do metacrilato de oxamniquina (MA-OXA).

TABELA XLVI: Atribuições de RMN ^{13}C do MA-OXA

RMN - ^{13}C (DMSO- d_6 , 75MHz, δ =ppm)
52,66 (C2); 25,95 (C3); 26,79 (C4); 162,97 (C5); 131,38 (C6); 118,52 (C7); 145,28 (C8); 109,61 (C9); 147,38 (C10); 51,26 (C11); 49,52 (C13); 22,94 (C14); 23,50 (C15); 64,03 (C16); 167,46 (C18); 136,54 (C19); 126,27 (C20); 18,72 (C21)



Espectro 14- DEPT 135 ° do MA-OXA.

TABELA XLVII: Atribuições de DEPT 135 ° do MA-OXA

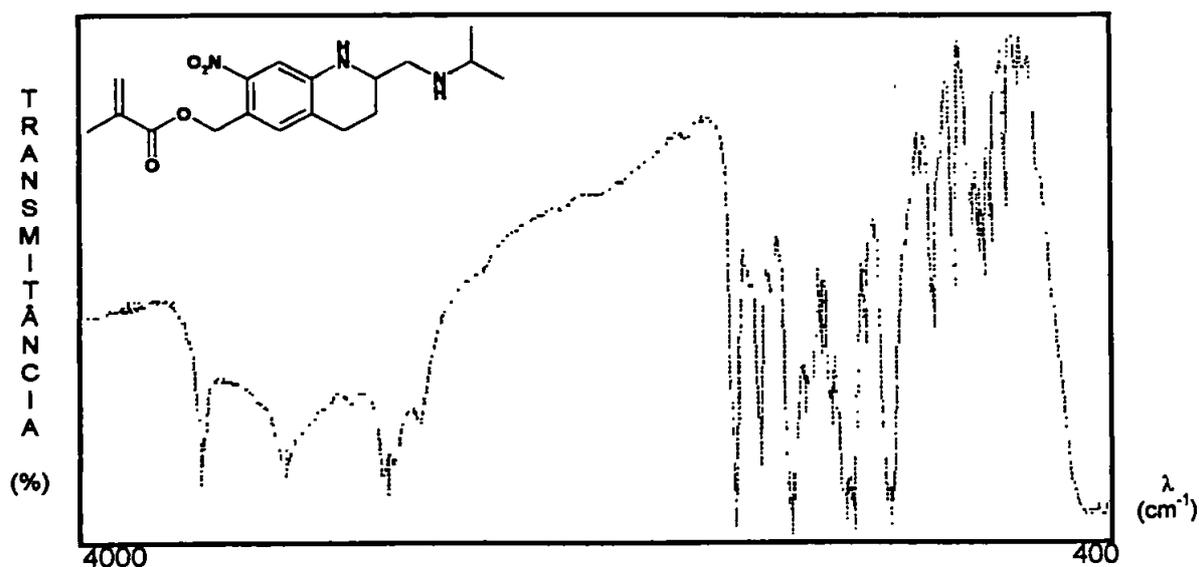
RMN - ^{13}C (DMSO- d_6 , 75MHz, δ =ppm, J=Hz)
52,53 (C2); 25,95 (C3); 26,63 (C4); 131,38 (C6); 109,61 (C9); 50,96 (C11); 49,79 (C13); 22,63 (C14); 23,14 (C15); 64,00 (C16); 126,25 (C20); 18,71 (C21)

Espectrofotometria no infravermelho (IV)

O espectro 15 apresenta os sinais de infravermelho do monômero metacrílico da oxamniquina. Na TABELA XLVIII estão arrolados os dados de análise espectral.

TABELA XLVIII – Dados obtidos a partir da espectrofotometria no IV para o monômero metacrílico da oxamniquina

ν (KBr, cm^{-1})	SINAL
3589	Estiramento NH
3298	Estiramento CH aromático
2948	Estiramento CH
1715	Estiramento C=O
1627	Estiramento C=C
1518	Estiramento assimétrico NO_2
1465	Estiramento CH_2
1324	Estiramento simétrico NO_2
1296	Estiramento C-N
1253	Estiramento C-O
1017	Deformação angular =C-H vinílico fora do plano
942	Deformação angular =C-H vinílico fora do plano
835	Deformação angular =C-H aromático fora do plano



Espectro 15 - Espectro no IV do MA-OXA.

Solubilidade

TABELA XLIX – Solubilidade* do metacrilato de oxamniquina.

Solvente	Temperatura ambiente	Temperatura 50°C
Acetato de etila	solúvel	solúvel
Acetona	solúvel	solúvel
Água	pouco solúvel	pouco solúvel
Clorofórmio	muito solúvel	-
Diclorometano	muito solúvel	-
Etanol	solúvel	solúvel
Éter	insolúvel	-
Hexano	insolúvel	insolúvel
Isopropanol	pouco solúvel	solúvel
Metanol	muito solúvel	muito solúvel

* Segundo Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

SÍNTESE: 10 - Síntese do monômero acrílico da oxamniquina

TABELA L – Aspecto físico do produto e análise realizada

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido/impuro
B	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido/impuro
C	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido/impuro
D	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido/impuro
E	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido/impuro
F	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido/impuro
G	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido/impuro
H	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H	obtido/impuro

Os produtos obtidos foram analisados por ressonância magnética nuclear. Houve a formação do monômero acrílico, mas sua purificação não foi suficientemente completa. Pelo espectro de RMN foi possível observar grandes quantidades de dicitloexiluréia (DCU) e também de ácido acrílico. Não se conseguiu purificar eficientemente o produto.

4.1.2.1.1C Reações por transferência de fase

SÍNTESE: 11 - Síntese do monômero acrílico da oxamniquina

O produto obtido foi analisado por ponto de fusão, análise elementar, solubilidade, ressonância magnética nuclear ^1H , ^{13}C , DEPT e HMQC, além de espectrofotometria de absorção no infravermelho. O produto apresenta-se sob a forma sólida, de coloração amarelada. O rendimento foi de 52%.

Cromatografia em camada delgada

Pela CCD, observou-se a reação total da oxamniquina com o cloreto de acrilóila. Embora outras manchas tenham aparecido, elas foram facilmente separadas por cromatografia em coluna.

Cromatografia em coluna

O sistema eluente utilizado foi apenas acetato de etila. Este solvente mostrou-se adequado para a separação e purificação do produto obtido.

Ponto de fusão

O monômero acrílico, após purificação e secagem, apresentou ponto de fusão entre 109 a 110 °C.

Análise elementar

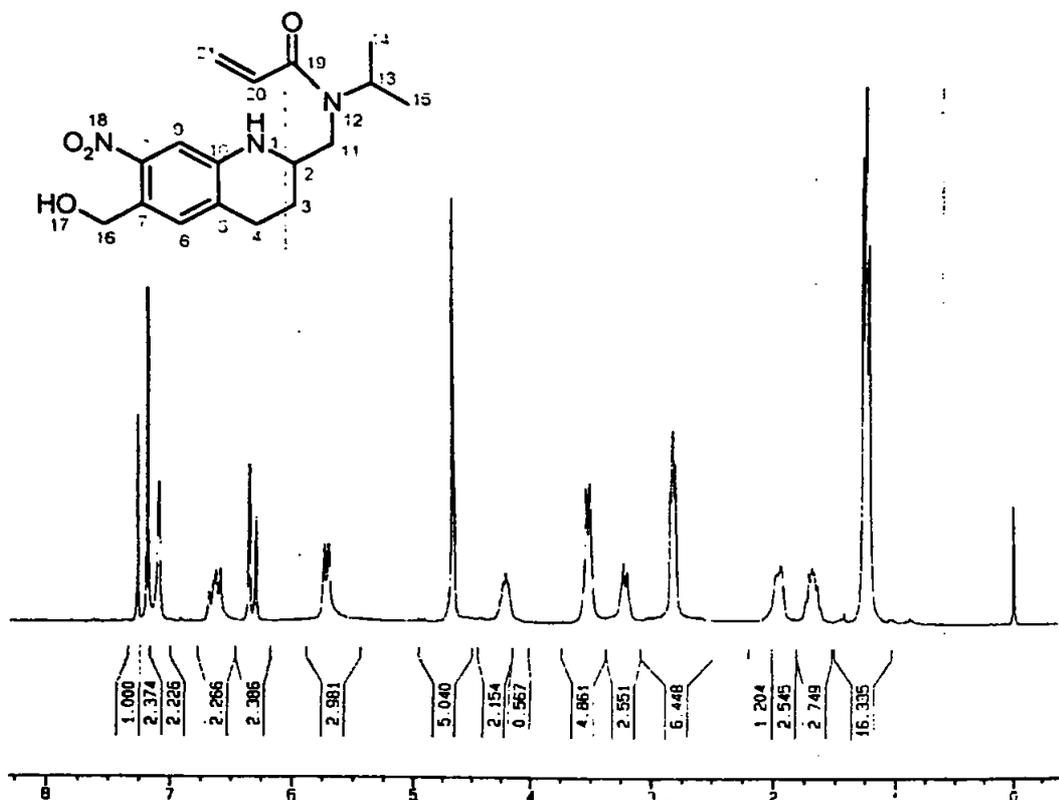
A TABELA LI apresenta os percentuais de cada elemento na fórmula molecular do monômero acrílico da oxamniquina. Estão relacionados os valores calculados e os determinados experimentalmente.

TABELA LI – Dados obtidos pela análise elementar do derivado da oxamniquina

MONÔMERO ACRÍLICO DA OXAMNIQUINA		
Fórmula empírica: C₁₇H₂₃N₃O₄ Peso molecular: 333,39		
ANÁLISE	Calculado	Experimental
Carbono	61,24%	61,28%
Hidrogênio	6,97%	7,09%
Nitrogênio	12,60%	12,28%

Espectrometria por ressonância magnética nuclear

O Espectro 16 mostra a formação do monômero acrílico da oxamniquina, o qual pode ser confirmado pelo aparecimento dos sinais 6,64 ppm (H-20), 6,36 ppm (H-21) e 5,75 ppm (H-21') representando os prótons olefínicos e pelo deslocamento do próton H-13 que passou de 2,81 para 4,24 ppm. Pelo Espectro 17 de RMN ¹³C, pode ser comprovada a ligação amídica pela carbonila em 169,07 ppm (C19), evidenciando a formação do monômero. Os espectros de DEPT (Espectro 18) e HMQC (Espectro 19) ajudam a confirmar o composto obtido.

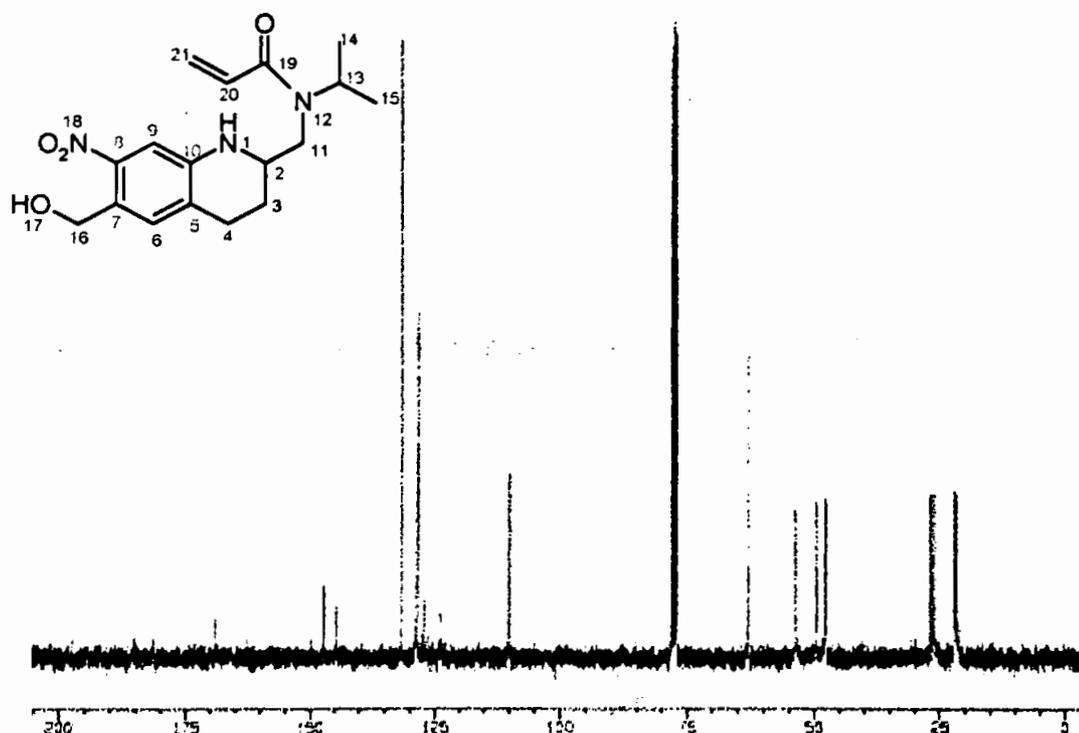


Espectro 16 - RMN ^1H do monômero acrílico da oxamniquina (AC-OXA).

TABELA LII: Atribuições de RMN ^1H do AC-OXA

RMN - ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)

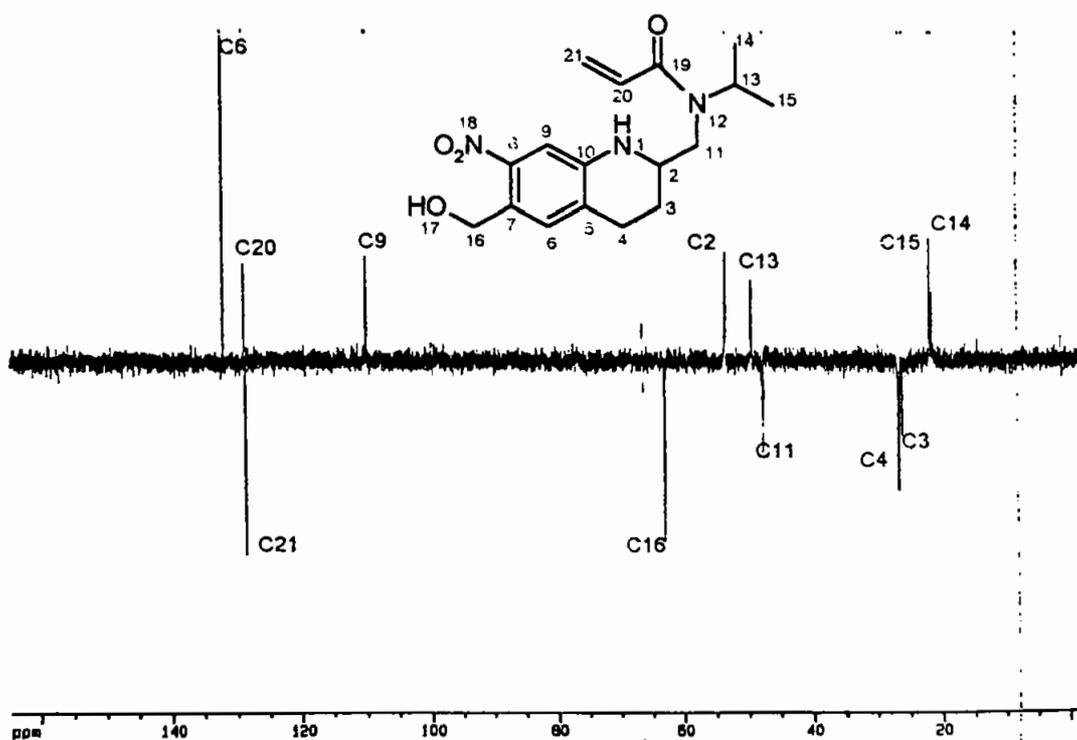
3,54 (m, 1H, H-2); 1,95 (m, 1H, H-3 equatorial); 1,68 (m, 1H, H-3' axial);
 2,82 (m, 2H, H-4); 7,20 (s, 1H, H-6); 7,21 (s, 1H, H-9); 3,55 (m, 1H, H-11);
 3,25 (t, 1H, H-11', $J_{\text{anti}}=10,5$); 4,24 (m, 1H, H-13.); 1,25 (d, 3H, H-14*,
 $J=6,7$); 1,22 (d, 3H, H-15*, $J=6,7$), 4,69 (s, 2H, H-16); 6,64 (dd, 1H, H-20,
 $J_{\text{cis}}=10,3$, $J_{\text{trans}}=16,7$); 6,36 (d, 1H, H-21, $J_{\text{trans}}=16,7$); 5,75 (d, 1H, H-21',
 $J_{\text{cis}}=10,3$)



Espectro 17 - RMN ^{13}C do monômero acrílico da oxamniquina (AC-OXA).

TABELA LIII: Atribuições de RMN ^{13}C do AC-OXA

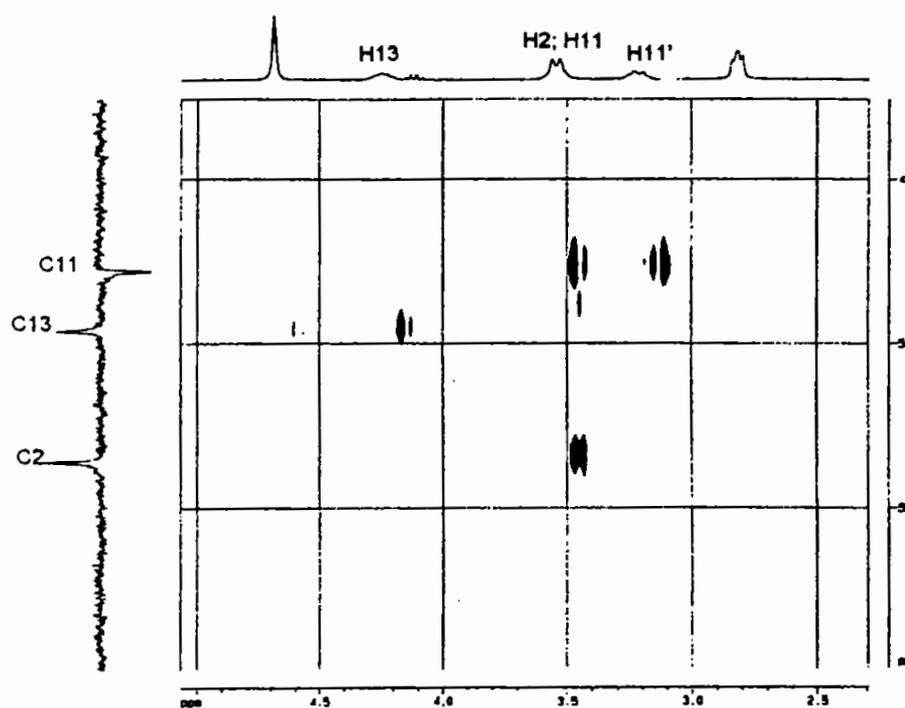
RMN - ^{13}C (DMSO- d_6 , 75MHz, δ =ppm)
53,57 (C2); 26,22 (C3); 26,77 (C4); 127,09 (C5); 131,92 (C6); 123,91 (C7); 144,92 (C8*); 109,94 (C9); 147,32 (10*); 47,77 (C11); 49,6 (C13); 21,71 (C14); 22,04 (C15); 63,16 (C16); 169,07 (C19); 128,69 (C20); 128,58 (C21)



Espectro 18 - DEPT 135° do monômero acrílico da oxamniquina.

TABELA LIV: Atribuições de DEPT 135 ° do AC-OXA

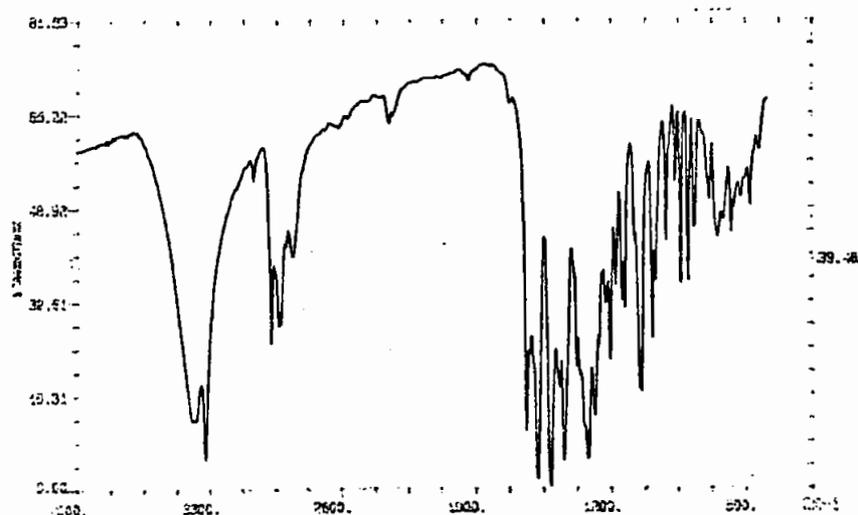
RMN - ^{13}C (DMSO- d_6 , 75MHz, δ =ppm)
53,57 (C2); 26,22 (C3); 26,77 (C4); 131,92 (C6); 109,94 (C9); 47,77 (C11); 49,6 (C13); 21,71 (C14); 22,04 (C15); 63,16 (C16); 128,69 (C20); 128,58 (C21)



Espectro 19 - HMQC do AC-OXA.

Espectrofotometria no infravermelho (IV)

A análise espectrofotométrica no IV do monômero acrílico da oxamniquina está arrolada na TABELA LV e apresentada no Espectro 20.



Espectro 20 – Espectro no IV do AC-OXA.

TABELA LV – Dados obtidos a partir da espectrofotometria no IV para o monômero acrílico da oxamniquina

ν (cm^{-1})	Estiramento/Deformação
3386	O-H
3325	N-H
2976	C-H alifático
1639	C=O amida secundária
1581	N-H amina
1515	N=O assimétrico
1323	N=O simétrico
1051	C-O álcool primário

Solubilidade

TABELA LVI– Solubilidade* do acrilato de oxamniquina

Solvente	Temperatura ambiente	Temperatura 50°C
Acetato de etila	solúvel	muito solúvel
Acetona	solúvel	muito solúvel
Água	insolúvel	insolúvel
Clorofórmio	muito solúvel	-
Diclorometano	muito solúvel	-
Etanol	pouco solúvel	solúvel
Éter	ligeiramente solúvel	-
Hexano	insolúvel	-
Isopropanol	pouco solúvel	solúvel
Metanol	solúvel	muito solúvel

* Segundo Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

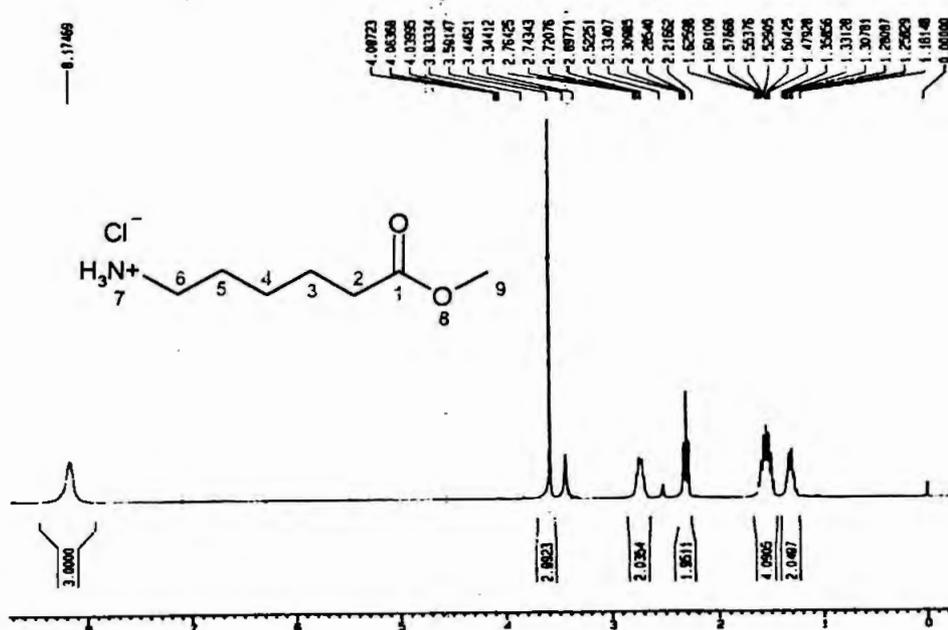
4.2.1.2 Monômeros ligados ao fármaco através de espaçantes

MÉTODO AA₁ - PRIMEIRA ETAPASÍNTESE: 12 - ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO AMINOCAPRÓICO

Rendimento: 6,4112 g (97%)

Ponto de fusão: 76-79 °C

Aspecto: sólido branco cristalino

Espectro 21 -RMN ¹H do ACA-Me.TABELA LVII: Atribuições de RMN ¹H do ACA-Me

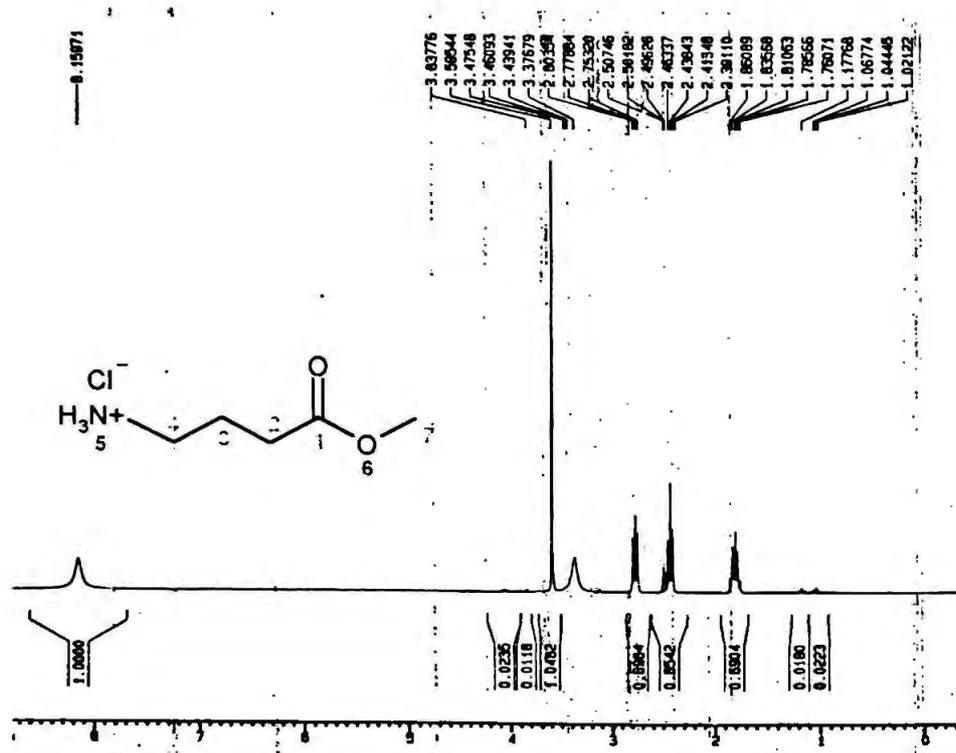
RMN - ¹ H (DMSO-d ₆ , 300MHz, δ=ppm, J=Hz)
2,30 (t, 2H, H-2, J=8,2); 1,62-1,47 (m, 4H, H-3 e H-5); 1,35-1,25 (m, 2H, H-4); 2,73 (q, 2H, H-6, J=6,2); 8,17 (slargo, 3H, H-7); 3,59 (s, 3H, H-9)

SÍNTESE: 13 - ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO

Rendimento: 4,6721 g (90%).

Ponto de fusão: 70-71 °C

Aspecto: sólido branco

Espectro 22 –RMN ¹H do GABA-Me.TABELA LVIII: Atribuições de RMN ¹H do GABA-MeRMN - ¹H (DMSO-d₆, 300MHz, δ=ppm, J=Hz)

2,46 (t, 2H, H-2, J=7,4); 1,81 (m, 2H, H-3, J=7,5); 2,77 (t, 2H, H-4, J=7,4);

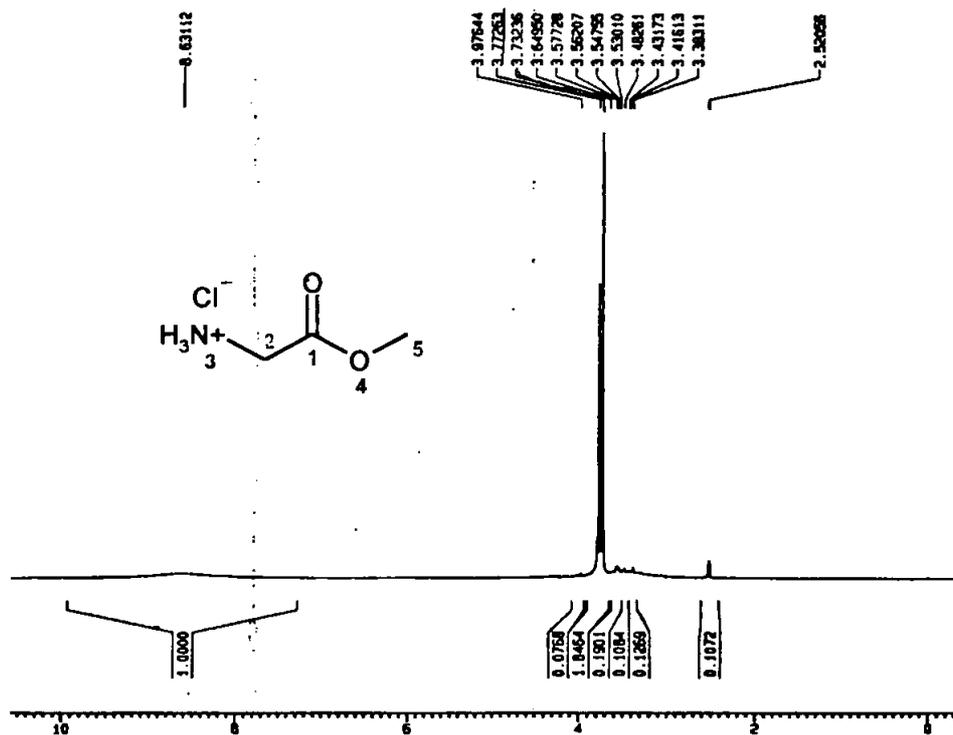
8,15 (s_{largo}, 3H, H-5), 2H, H-6, J=6,2); 3,59 (s, 3H, H-7)

SÍNTESE: 14 - ÉSTER METÍLICO DA GLICINA

Rendimento: 3,0104 g (80%).

Ponto de fusão: 39-41 °C

Aspecto: sólido branco higroscópico

Espectro 23 -RMN ¹H do Gly-Me.**TABELA LIX: Atribuições de RMN ¹H da Gly-Me**

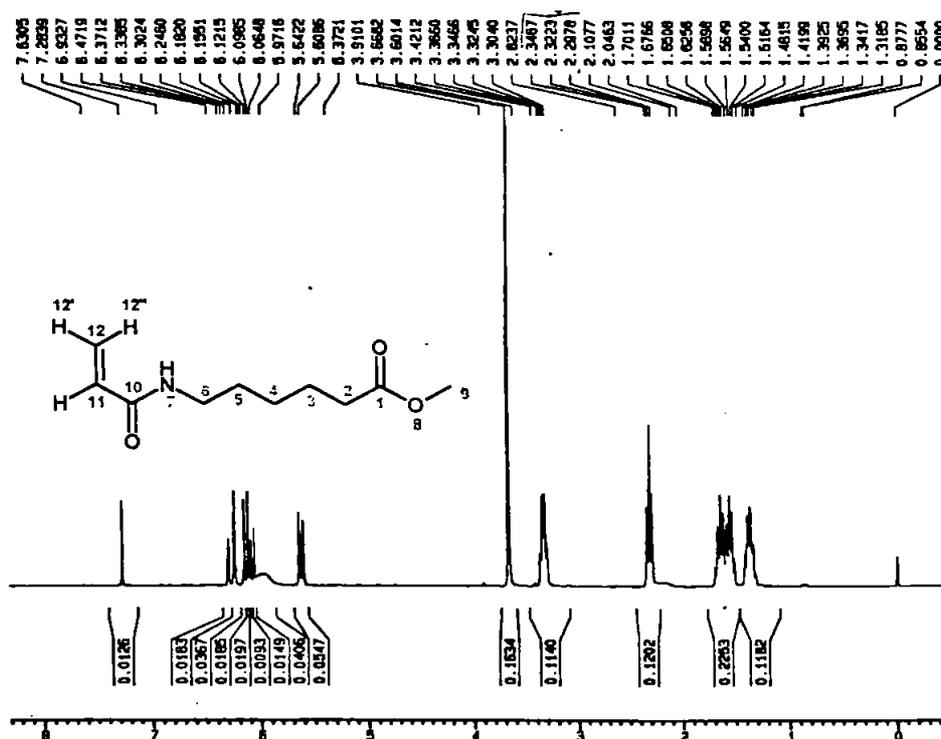
RMN - ¹ H (DMSO-d ₆ , 300MHz, δ=ppm)
3,77 (s, 2H, H-2); 8,63 (s, 3H, H-3); 3,73 (s, 3H, H-5)

A₂ - SEGUNDA ETAPA**Monômeros acrililamídicos****SÍNTESE: 15 – Síntese do AC-ACA-Me**

Rendimento: 0,8451 g (85 %)

Ponto de fusão: 58-59 °C

Aspecto: sólido branco

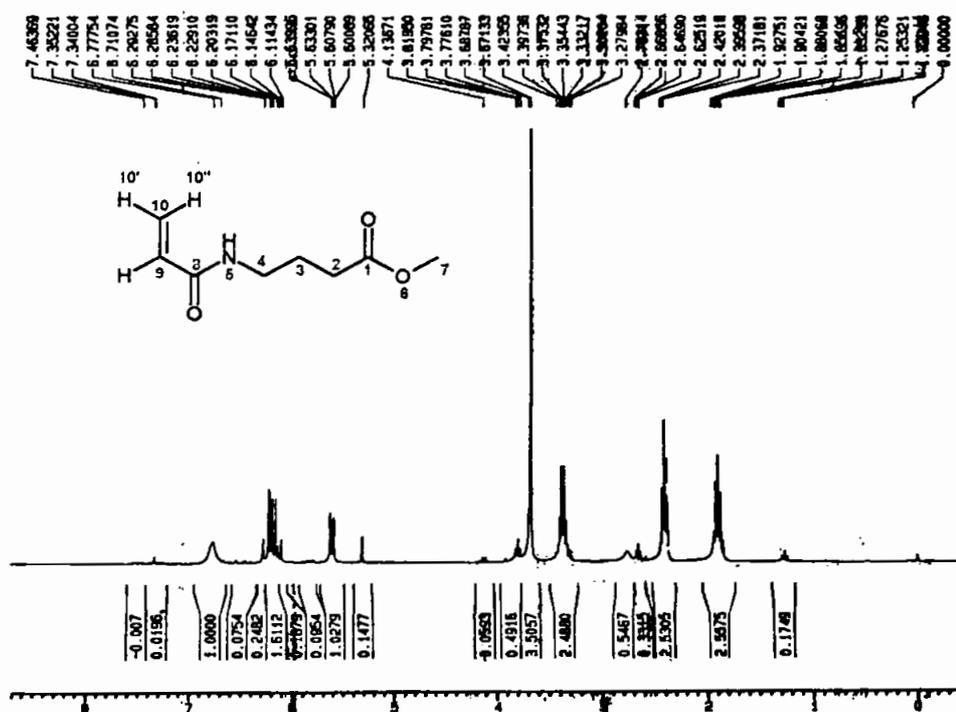
**Espectro 24 –RMN ¹H do AC-ACA-Me.****TABELA LX: Atribuições de RMN ¹H do AC-ACA-Me****RMN - ¹H (CDCl₃, 300MHz, δ=ppm, J=Hz)**

2,32 (t, 2H, H-2, J=7,3); 1,58-1,48 (m, 2H, H-3); 1,41-1,31 (m, 2H, H-4);
 1,70-1,50 (m, 2H, H-5); 3,33 (q, 2H, H-6, J=6,2); 5,97 (s_{largo}, 1H, H-7); 3,66
 (s, 3H, H-9); 6,15-6,06 (dd, 1H, H-11, J_{cis}=10,1, J_{trans}=16,9); 6,27 (d, 1H, H-
 12', J_{trans}=16,9); 5,63 (d, 1H, H-12', J_{cis}=10,1)

SÍNTESE: 16 – Síntese do AC-GABA-Me

Rendimento: 0,5421 g (63%)

Aspecto: líquido amarelo viscoso

Espectro 25 –RMN ^1H do AC-GABA-Me.**TABELA LXI: Atribuições de RMN ^1H do AC-GABA-Me**RMN - ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)

2,39 (t, 2H, H-2, J=7,3); 1,88 (m, 4H, H-3); 3,37 (q, 2H, H-4, J=6,2); 6,77 (Slargo, 1H, H-5); 3,67 (s, 3H, H-7); 6,19 (dd, 1H, H-9, $J_{\text{cis}}=9,8$, $J_{\text{trans}}=17,0$); 6,14 (d, 1H, H-10', $J_{\text{trans}}=17,0$); 5,62 (d, 1H, H-10'', $J_{\text{cis}}=9,8$)

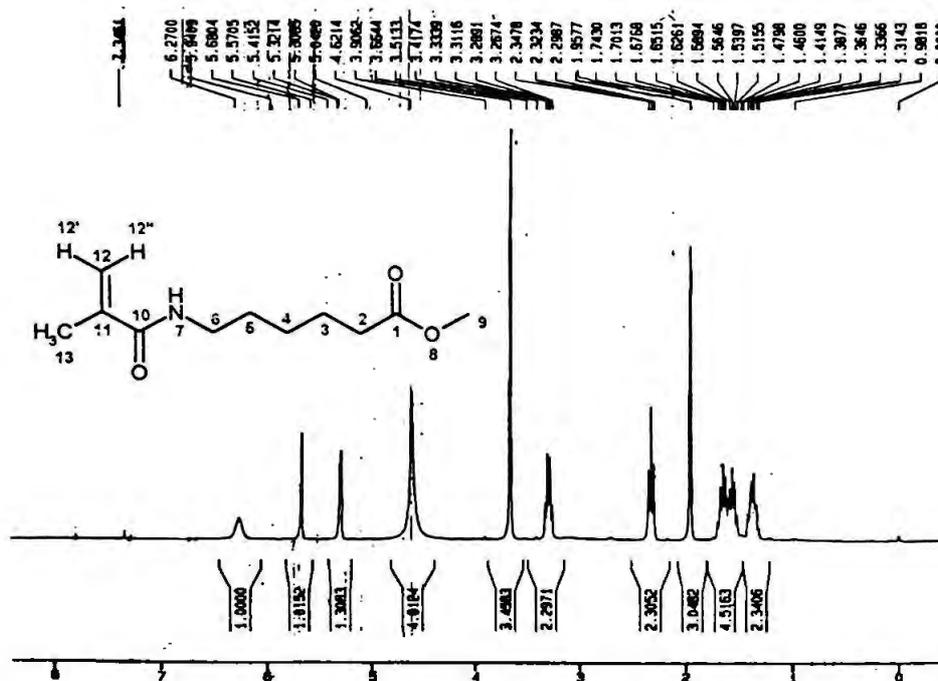
SÍNTESE: 17 – Síntese do AC-Gly-Me

O derivado AC-Gly-Me não foi obtido devido às dificuldades encontradas na extração.

Monômeros metacrililamídicos**SÍNTESE: 18 – Síntese do MA-ACA-Me**

Rendimento: 0,7045 g (66%)

Aspecto: líquido amarelo viscoso



Espectro 26 –RMN ¹H do MA-ACA-Me.

TABELA LXII: Atribuições de RMN ¹H do MA-ACA-Me

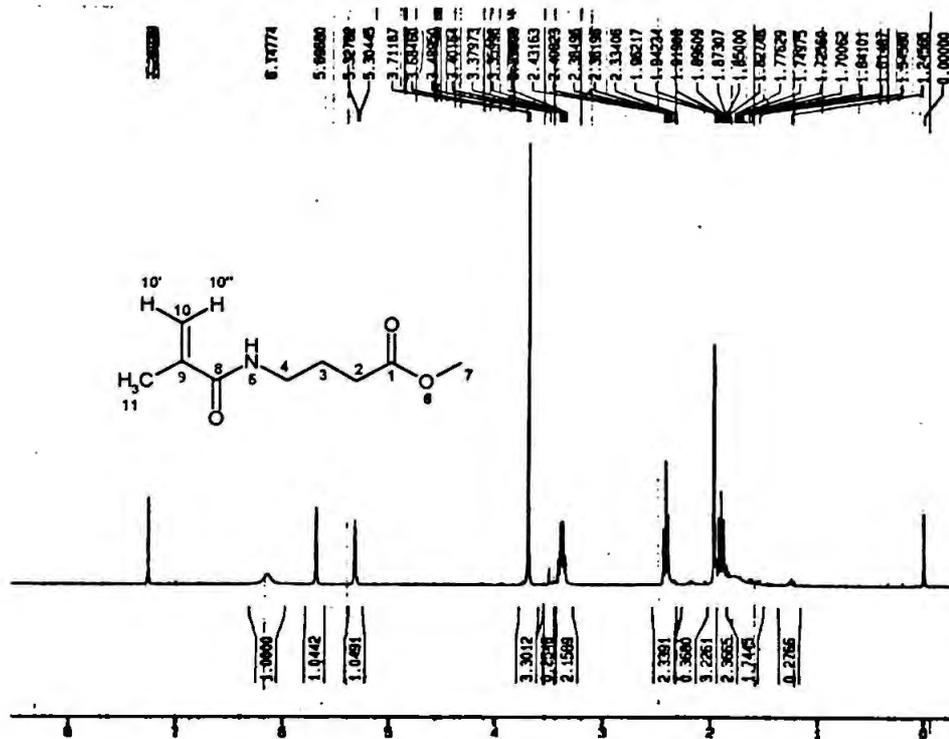
RMN - ¹H (DMSO-d₆, 300MHz, δ=ppm, J=Hz)

2,32 (t, 2H, H-2, J=7,3); 1,58-1,51 (m, 2H, H-3); 1,41-1,31 (m, 2H, H-4);
1,70-1,62 (m, 2H, H-5); 3,30 (q, 2H, H-6, J=6,8); 6,27 (t, 1H, H-7); 3,66 (s,
3H, H-9); 5,94 (s, 1H, H-12''); 5,31 (s, 1H, 12'); 1,95 (s, 1H, H-13)

SÍNTESE: 19 – Síntese do MA-GABA-Me

Rendimento: 0,4551 g (49%)

Aspecto: líquido viscoso amarelo-claro

Espectro 27 –RMN ^1H do MA-GABA-Me.TABELA LXIII: Atribuições de RMN ^1H do MA-GABA-MeRMN - ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)

2,40 (t, 2H, H-2, J=7,0); 1,87 (m, 4H, H-3); 3,36 (q, 2H, H-4, J=6,5); 6,14 (Slargo, 1H, H-5); 3,68 (s, 3H, H-7); 5,69 (s, 1H, H-10 $''$); 5,32 (s, 1H, 10'); 1,96 (s, 3H, H-11)

SÍNTESE: 20 – Síntese do MA-Gly-Me

O derivado MA-Gly-Me não foi obtido devido às dificuldades encontradas na extração.

A₃ - TERCEIRA ETAPA**A_{3.1} – HIDRÓLISE ALCALINA****Monômeros acrilóilamídicos****SÍNTESE: 21 – Hidrólise do éster metílico do derivado AC-ACA-Me**

A hidrólise do éster (AC-ACA-Me) não foi conseguida, conseqüentemente, o derivado AC-ACA-OH não foi obtido.

SÍNTESE: 22 – Hidrólise do éster metílico do derivado AC-GABA-Me

A hidrólise éster (AC-GABA-Me) também não foi conseguida, conseqüentemente, o derivado AC-GABA-OH não foi obtido.

Monômeros metacrilóilamídicos**SÍNTESE: 23 – Hidrólise do éster metílico do derivado MA-ACA-Me**

À semelhança das tentativas anteriores de hidrólise dos ésteres dos aminoácidos, quando se tratou do derivado metacrilóilamídico, a reação também não foi eficiente. O derivado MA-ACA-OH não foi obtido.

SÍNTESE: 24 – Hidrólise do éster metílico do derivado MA-GABA-Me

O éster metílico do derivado MA-GABA-Me não foi hidrolisado. O produto MA-GABA-OH não foi obtido.

A_{3.2} - TRANSESTERIFICAÇÃO**SÍNTESE: 25 – Refluxo dos reagentes à temperatura de 150 °C por 6 h****TABELA LXIV – Aspecto físico do produto e análise realizada**

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	semi-sólido/sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
B	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
C	sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
D	sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido

A cromatografia em camada delgada não mostrou qualquer substância diferente dos reagentes iniciais.

SÍNTESE: 26 – Refluxo dos reagentes utilizando catalisador**TABELA LXV – Aspecto físico do produto e análise realizada**

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	semi-sólido amarelo/ sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
B	semi-sólido amarelo/sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
C	sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
D	sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
E	semi-sólido/sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
F	semi-sólido/sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido

Pela interpretação das placas de cromatografia em camada delgada, nenhuma substância diferente dos produtos foi revelada.

SÍNTESE: 27 – Refluxo dos reagentes utilizando peneira molecular**TABELA LXVI – Aspecto físico do produto e análise realizada**

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
B	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
C	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
D	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
E	sólido alaranjado/semi-sólido amarelo	RMN ¹ H /CCD	Não obtido

A cromatografia em camada delgada não revelou nenhum produto formado.

SÍNTESE: 28 – Destilação azeotrópica (Dean Stark)**TABELA LXVII – Aspecto físico do produto e análise realizada.**

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	sólido amarelo	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
B	sólido amarelo	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
C	sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
D	sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
E	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
F	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido

As reações foram acompanhadas por CCD. Nenhum produto foi distinguido dos materiais de partida.

SÍNTESE: 29 – Microondas com *t*-BuOK**TABELA LXVIII – Aspecto físico do produto e análise realizada**

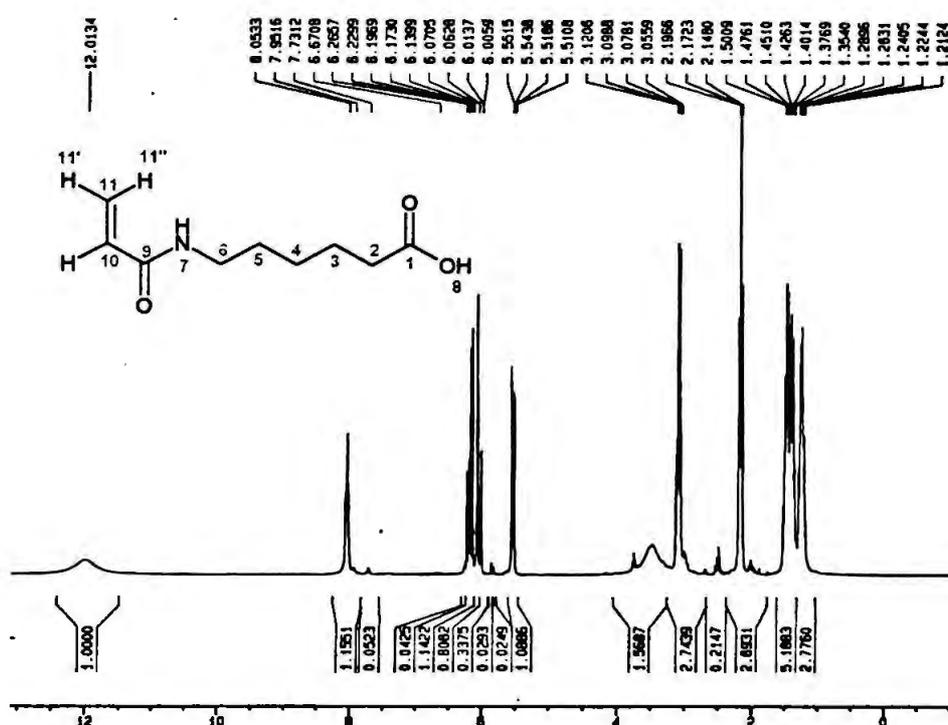
Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	sólido marrom escuro	RMN ¹ H	Não obtido
B	sólido negro	RMN ¹ H	Não obtido
C	sólido marrom	RMN ¹ H	Não obtido
D	sólido avermelhado	RMN ¹ H	Não obtido
E	sólido alaranjado	RMN ¹ H	Não obtido
F	sólido marrom	RMN ¹ H	Não obtido
G	sólido marrom	RMN ¹ H	Não obtido

MÉTODO B**B₁ – PRIMEIRA ETAPA****Monômeros acrililamídicos****SÍNTESE: 30 – Síntese do AC-ACA-OH**

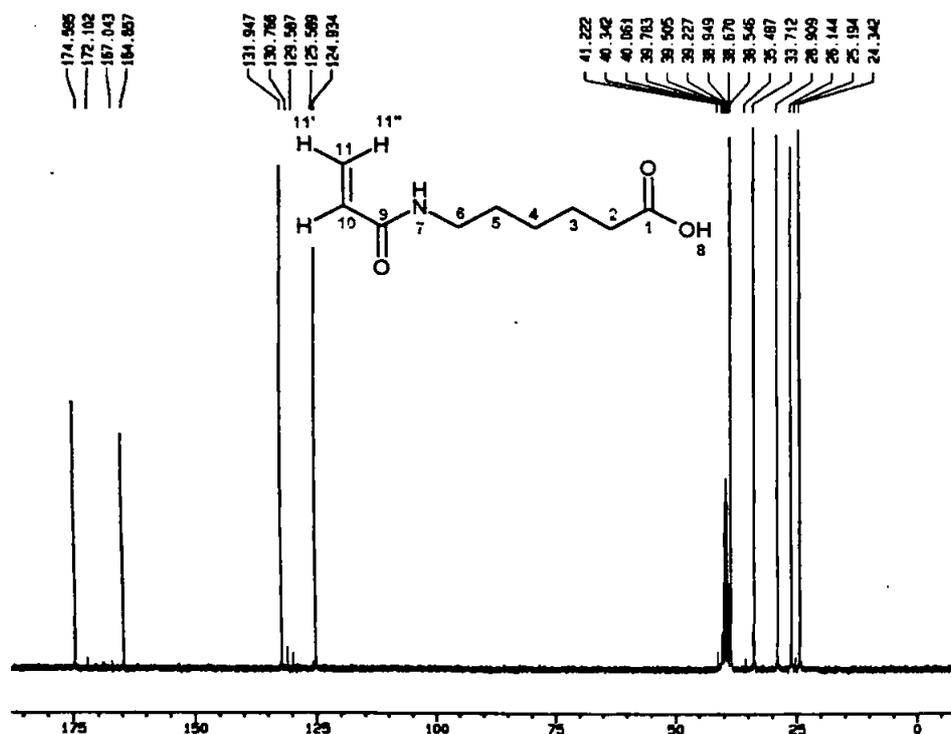
Rendimento: 0,1221 g (65%)

Ponto de Fusão: 65-66 °C

Aspecto: sólido branco

Espectro 28 – RMN ¹H do AC-ACA-OH.**TABELA LXIX: Atribuições de RMN ¹H do AC-ACA-OH****RMN - ¹H (DMSO-d₆, 300MHz, δ=ppm, J=Hz)**

2,17 (t, 2H, H-2, J=7,3); 1,52-1,45 (m, 2H, H-3); 1,28-1,21 (m, 2H, H-4);
 1,42-1,32 (m, 2H, H-5); 3,08 (q, 2H, H-6, J=6,6); 8,05 (t, 1H, H-7); 12,01
 (s largo, 1H, H-8); 6,22-6,13 (dd, 1H, H-10, J_{cis}=9,9, J_{trans}= 17,1); 6,04 (d, 1H,
 H-11', J_{trans}=17,1) 5,52 (d, 1H, H-11', J_{cis}=9,9)

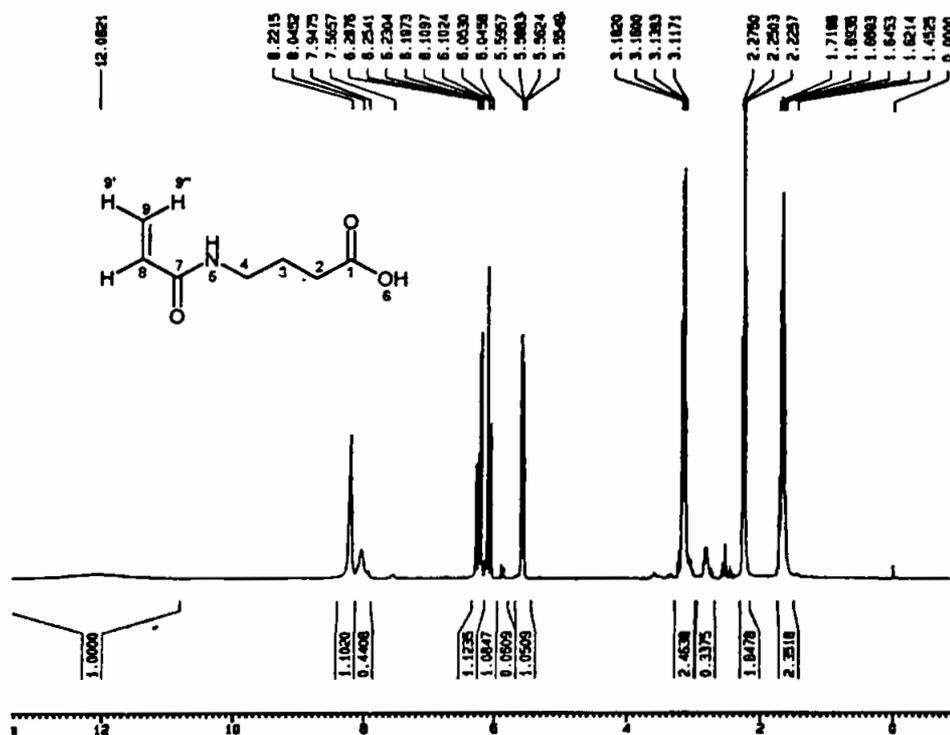
Espectro 29 – RMN ^{13}C do AC-ACA-OH.TABELA LXX: Atribuições de RMN ^{13}C do AC-ACA-OH

RMN - ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz, δ =ppm)
174,59 (C1); 33,72 (C2); 26,14 (C3); 24,34 (C4); 28,90 (C5); 38,54 (C6); 164,65 (C9); 124,93 (C10); 131,94 (C11)

SÍNTESE: 31 – Síntese do AC-GABA-OH

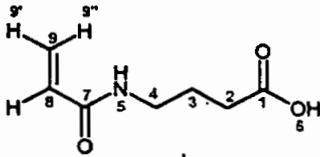
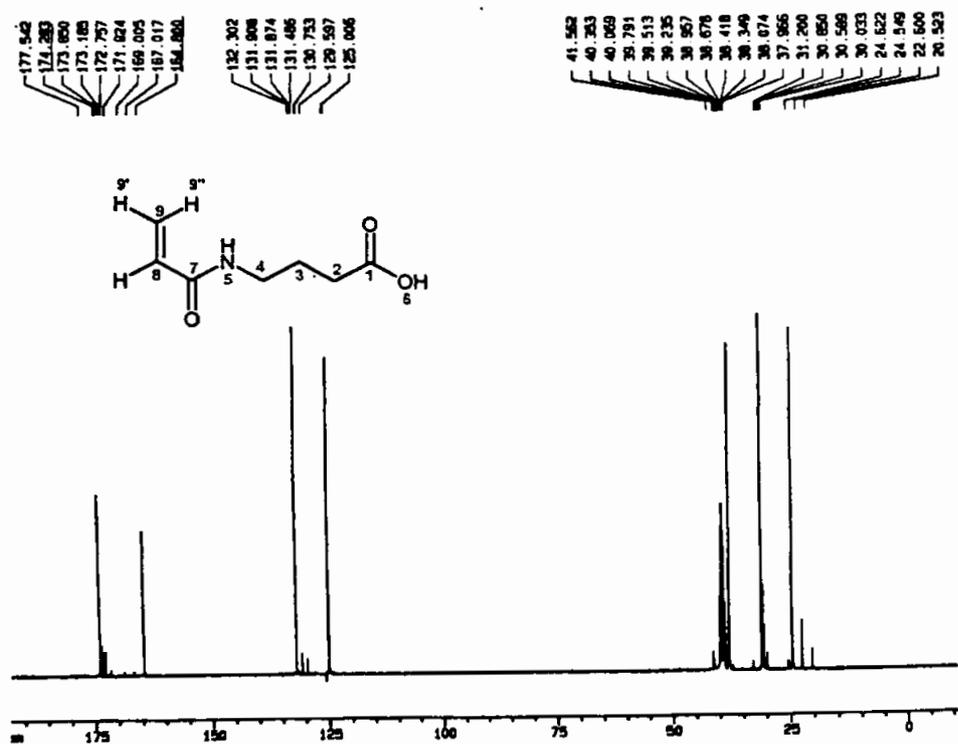
Rendimento: 0,7451 g (47 %)

Aspecto: líquido viscoso opaco

Espectro 30 – RMN ^1H do AC-GABA-OH.**TABELA LXXI: Atribuições de RMN ^1H do AC-GABA-OH****RMN - ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)**

2,25 (t, 2H, H-2, J=7,3); 1,71-1,62 (m, 2H, H-3); 3,14 (q, 2H, H-4, J=6,6);

8,22 (t, 1H, H-5); 12,08 (S_{largo} , 1H, H-6); 6,28-6,19 (dd, 1H, H-8, $J_{\text{trans}}=17,2; J_{\text{cis}}=10,1$); 6,07 (d, 1H, H-9', $J_{\text{trans}}=17,2$), 5,57 (d, 1H, H-9', $J_{\text{cis}}=10,1$)



Espectro 31 – RMN ¹³C do AC-GABA-OH.

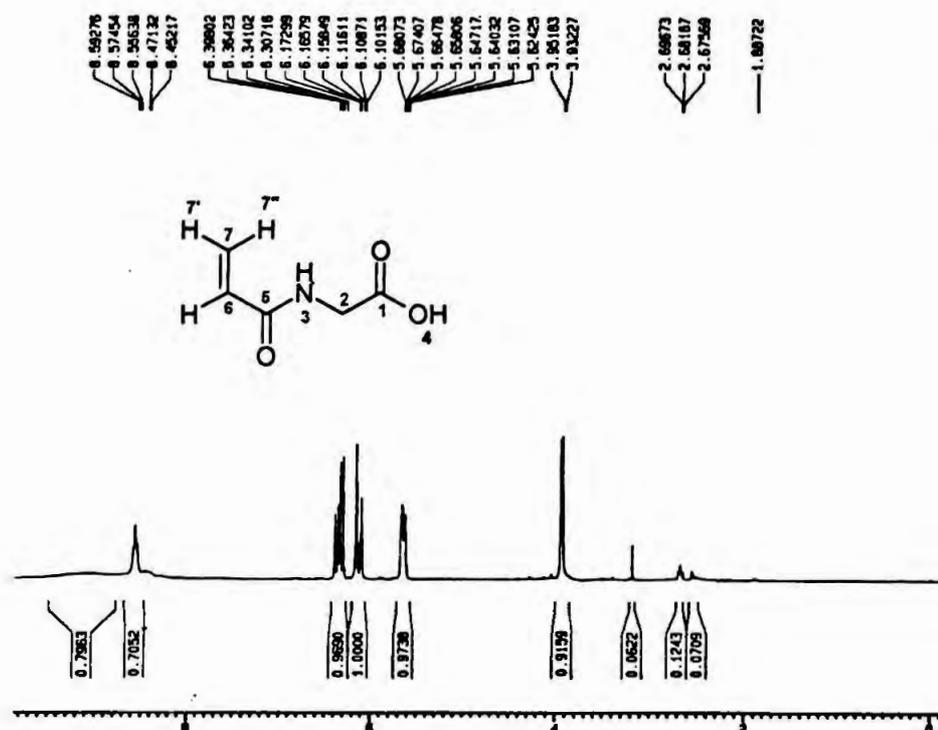
TABELA LXXII: Atribuições de RMN ¹³C do AC-GABA-OH

RMN - ¹³ C (DMSO-d ₆ , 75 MHz, δ=ppm)
174,28 (C1); 31,20 (C2); 24,62 (C3); 38,07 (C4); 164,80 (C7); 125,0 (C8);
132,30 (C9)

SÍNTESE: 32 – Síntese do AC-Gly-OH

Rendimento: 0,0132 g (10%)

Aspecto: semi-sólido viscoso

Espectro 32 –RMN ^1H do AC-Gly-OH.TABELA LXXIII: Atribuições de RMN ^1H do AC-Gly -OH

RMN - ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)
--

3,86 (d, 2H, H-2, J=5,8); 8,57 (t, 1H, H-3, J=5,4); 9,1 (S largo, 1H, H-4); 6,39-6,36 (dd, 1H, H-6, $J_{\text{cis}}=10,1$, $J_{\text{trans}}=17,1$); 5,66 (d, 1H, H-7', J=10,1); 6,13 (d, 1H, H-7'', J=17,1)
--

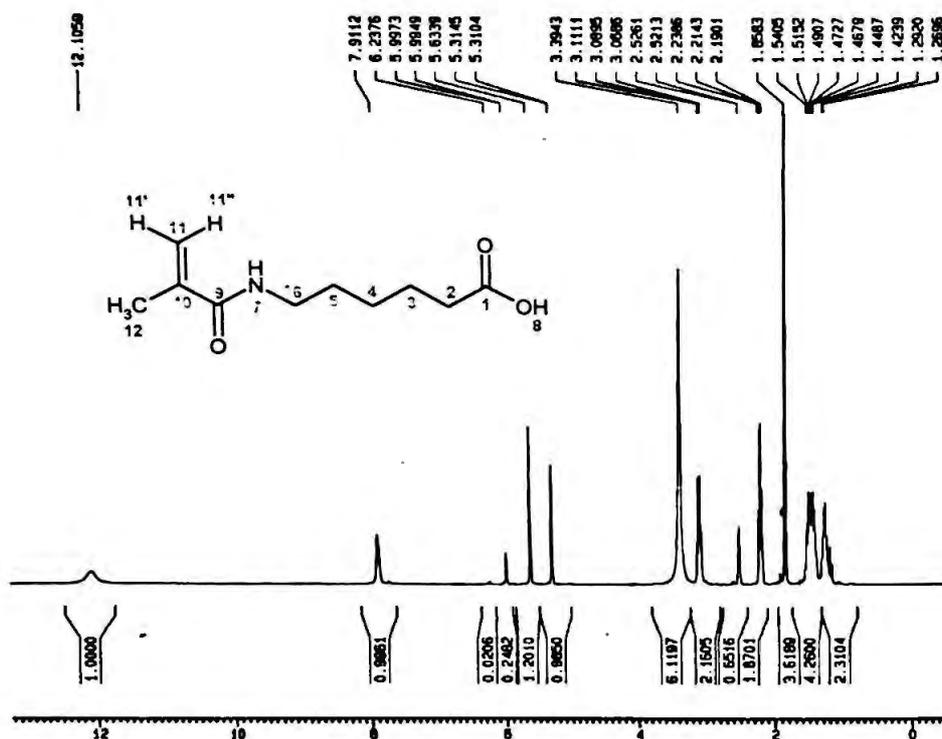
Monômeros metacrilóilamídicos

SÍNTESE: 33 – Síntese do MA-ACA-OH

Rendimento: 0,1024 g (51%)

Ponto de fusão: 50-51 °C

Aspecto: sólido branco

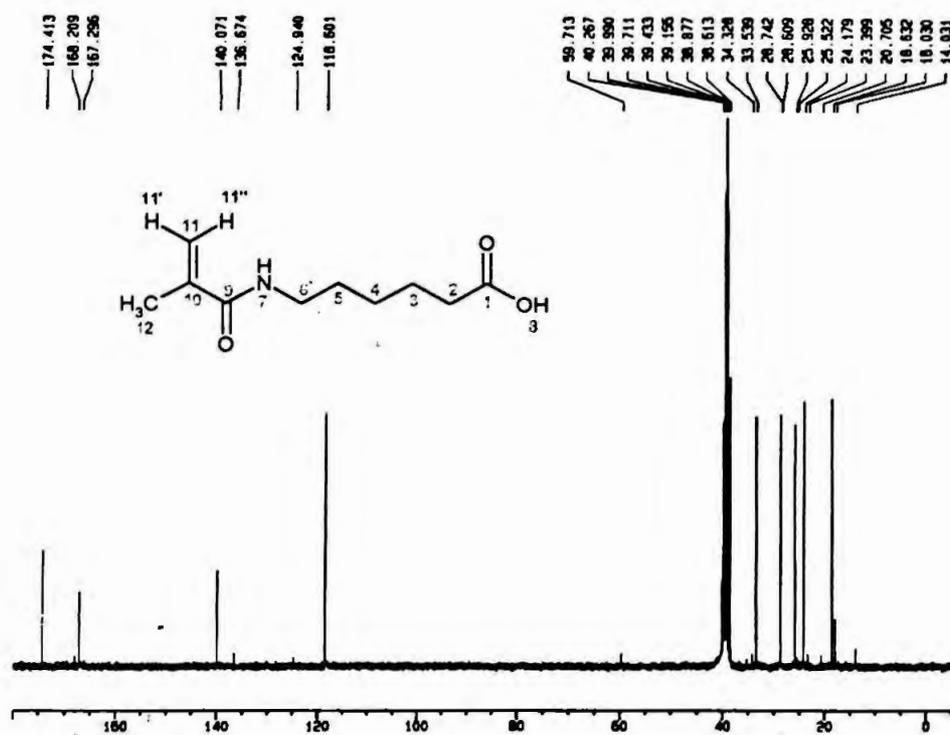


Espectro 33 –RMN ^1H do MA-ACA-OH.

TABELA LXXIV: Atribuições de RMN ^1H do MA-ACA-OH

RMN - ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)

2,21 (t, 2H, H-2, J=7,3); 1,49-1,40 (m, 2H, H-3); 1,31-1,24 (m, 2H, H-4);
1,56-1,49 (m, 2H, H-5); 3,09 (q, 2H, H-6, J=6,9); 7,91 (t, 1H, H-7); 12,10
(Siargo, 1H, H-8); 5,63 (s, 1H, H-11''); 5,31 (s, 1H, H-11'); 1,85 (s, 3H, H-12)

Espectro 34 – RMN ^{13}C do MA-ACA-OH.TABELA LXXV: Atribuições de RMN ^{13}C do MA-ACA-OH

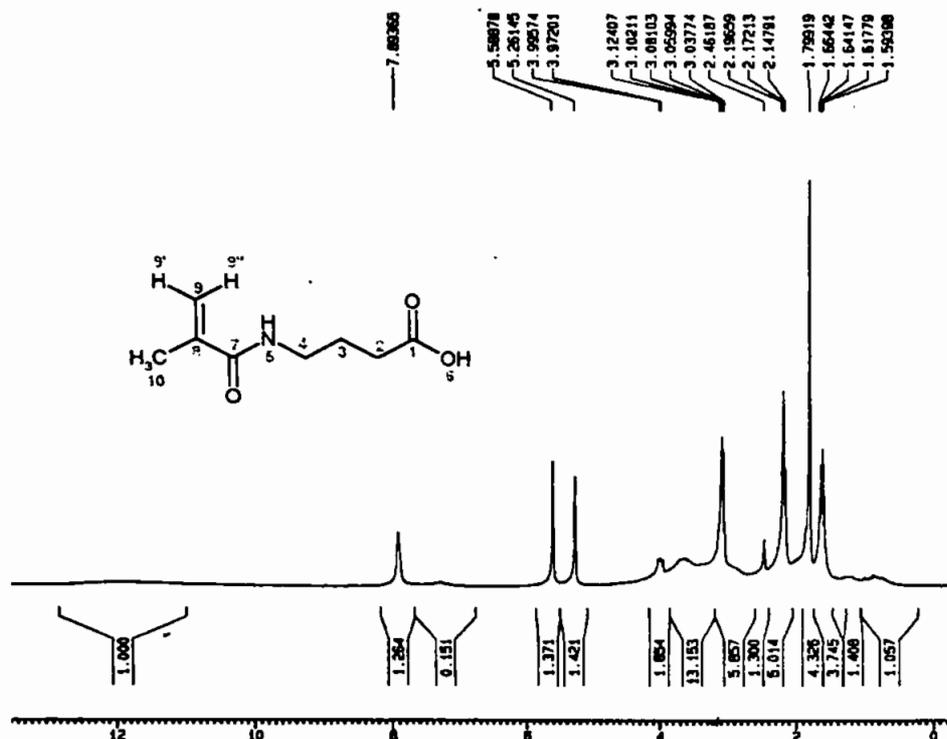
RMN - ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz, δ =ppm)
174,41 (C1); 33,53 (C2); 25,92 (C3); 24,17 (C4); 28,07 (C5); 38,61 (C6); 167,29 (C9); 140,07 (C10); 118,60 (C11); 18,63 (C12)

SÍNTESE: 34 – Síntese do MA-GABA-OH

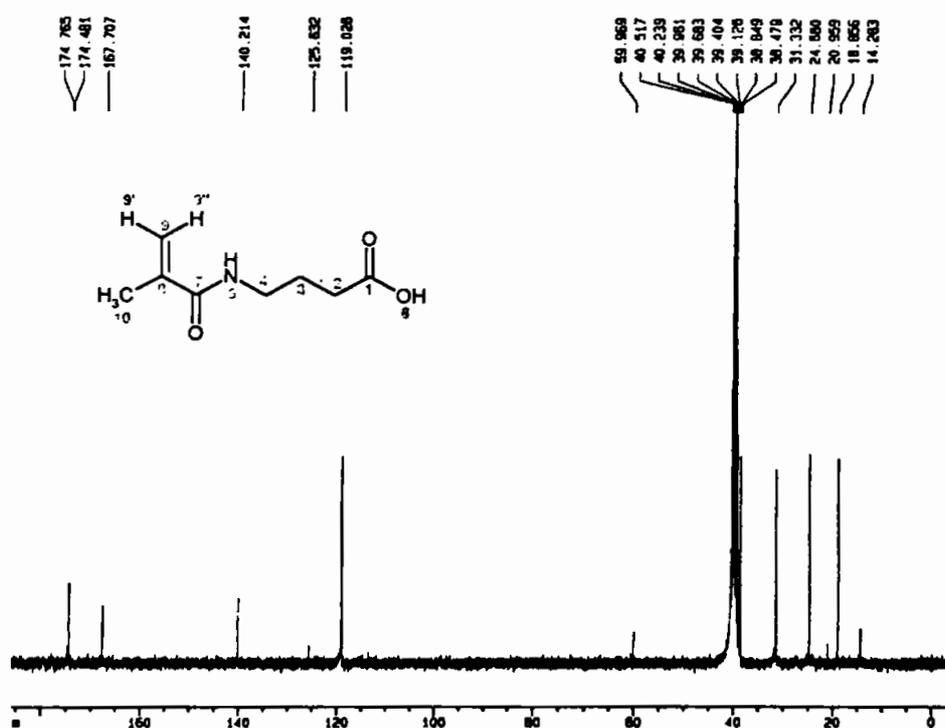
Rendimento: 0,0512 g (29 %)

Ponto de fusão: 105-107 °C

Aspecto: sólido branco-amarelado

**Espectro 35 – RMN ¹H do MA-GABA-OH.****TABELA LXXVI: Atribuições de RMN ¹H do MA-GABA-OH****RMN - ¹H (DMSO-d₆, 300MHz, δ=ppm, J=Hz)**

2,17 (t, 2H, H-2, J=7,3); 1,66-1,56 (m, 2H, H-3); 3,06 (q, 2H, H-4, J=6,5);
 7,89 (t, 1H, H-5); 12,03 (s_{largo}, 1H, H-6); 5,58 (s, 1H, H-9^a), 5,26 (s, 1H, H-9^b);
 1,79 (s, 3H, H-10)

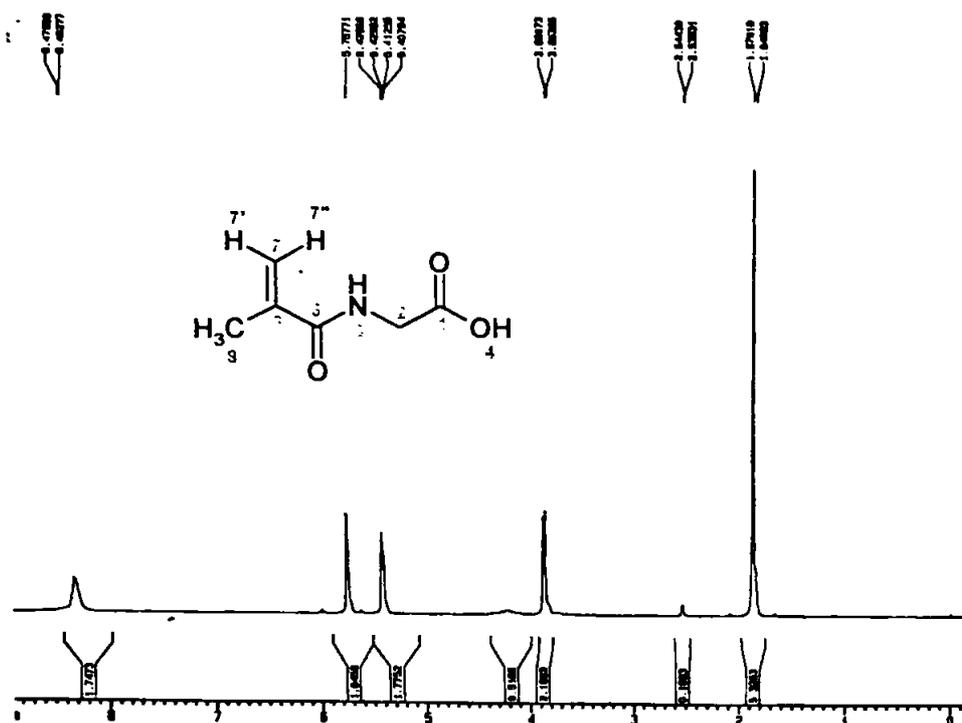
Espectro 36 – RMN ^{13}C do MA-GABA-OH.TABELA LXXVII: Atribuições de RMN ^{13}C do MA-GABA-OH

RMN - ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz, δ =ppm)
174,76 (C1); 31,33 (C2); 24,68 (C3); 38,47 (C4); 167,70 (C7); 140,21 (C8); 119,02 (C9); 18,85 (C10)

SÍNTESE: 35 – Síntese do MA-Gly-OH

Rendimento: 0,0115 g (8 %)

Aspecto: semi-sólido branco

Espectro 37 – RMN ¹H do MA-Gly-OH.TABELA LXXVIII: Atribuições de RMN ¹H do MA-Gly -OH

RMN - ¹ H (DMSO-d ₆ , 300MHz, δ=ppm, J=Hz)
3,86 (d, 2H, H-2, J=5,1); 5,42 (s, 1H, H-7'); 5,75 (s, 1H, H-7''); 1,87 (s, 3H, H-8)

B₂ – SEGUNDA ETAPA**B_{2.1} ESTERIFICAÇÃO****SÍNTESE: 36 – Esterificação utilizando carbodiimidias (DCC)****TABELA LXXIX – Aspecto físico do produto e análise realizada**

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
B	semi-sólido amarelo/sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
C	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
D	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
E	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
F	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
G	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
H	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
I	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
J	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
L	semi-sólido amarelo/sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
M	semi-sólido alaranjado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido

Todas as reações foram acompanhadas por CCD. Nenhuma mostrou a formação de produto.

SÍNTESE: 37 – Esterificação utilizando carbodiimidias (EDC)**TABELA LXXX – Aspecto físico do produto e análise realizada**

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	semi-sólido amarelo claro	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
B	semi-sólido amarelo claro	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
C	semi-sólido amarelo claro	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
D	semi-sólido amarelo claro	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
E	semi-sólido amarelo claro	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
F	semi-sólido amarelo claro	RMN ¹ H /CCD	Não obtido

Todas as reações foram acompanhadas por CCD. Nenhuma mostrou a formação de produto.

SÍNTESE: 38 – Esterificação utilizando resina de troca iônica**TABELA LXXXI – Aspecto físico do produto e análise realizada**

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	líquido amarelado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
B	semi-sólido amarelo	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
C	semi-sólido amarelo	RMN ¹ H /CCD	Não obtido

As três reações foram acompanhadas por CCD. Nenhuma mostrou a formação de produto.

SÍNTESE: 39 – Esterificação utilizando cloreto de tionila**TABELA LXXXII – Aspecto físico do produto e análise realizada**

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	líquido negro	RMN ¹ H	Não obtido
B	semi-sólido marrom	RMN ¹ H	Não obtido

SÍNTESE: 40 – Esterificação utilizando tribrometo de fósforo

A esterificação do AC-ACA-OH com a oxamniquina não foi conseguida, possivelmente devido a problemas de reatividade do fármaco em estudo.

SÍNTESE: 41 – Esterificação direta utilizando ácido sulfúrico

Ao contrário do que se esperava, a esterificação em meio ácido não originou o produto desejado (AC-ACA-OXA).

SÍNTESE: 42 – Esterificação direta utilizando ácido sulfúrico (Dean Stark)

Os resultados obtidos a partir da tentativa de esterificação direta da oxamniquina utilizando ácido sulfúrico como catalisador em aparelho de Dean Stark, estão arrolados na TABELA LXXXIII

TABELA LXXXIII – Aspecto físico do produto e análise realizada

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	líquido amarelado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
B	semi-sólido amarelo	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
C	semi-sólido amarelo	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
D	semi-sólido avermelhado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
E	semi-sólido viscoso avermelhado	RMN ¹ H /CCD	Não obtido

SÍNTESE: 43 – Formação de cloreto de oxamniquina

A TABELA LXXXIV– mostra os resultados obtidos quando se tentou transformar a hidroxila benzílica da oxamniquina em cloreto de alquila.

TABELA LXXXIV – Aspecto físico do produto e análise realizada

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	sólido marrom	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
B	semi-sólido negro	RMN ¹ H /CCD	Não obtido
C	semi-sólido negro	RMN ¹ H /CCD	Não obtido

SÍNTESE: 44 – Formação de brometo de oxamniquina

Os resultados das reações de bromação da oxamniquina estão apresentados na TABELA a seguir.

TABELA LXXXV – Aspecto físico do produto e análise realizada

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	sólido marrom-amarelado	RMN ¹ H	Não obtido
B	Sólido avermelhado	RMN ¹ H	Não obtido

SÍNTESE: 45 – Formação de alcóxido de oxamniquina

Os resultados das reações de formação de alcóxido de oxamniquina, com o uso de metais como Lítio e Sódio metálicos, estão arrolados na TABELA a seguir.

TABELA LXXXVI – Aspecto físico do produto e análise realizada

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado
A	Não isolado	-	Não reagiu
B	Não isolado	-	Não reagiu
C	Não isolado	-	Não reagiu
D	Não isolado	-	Não reagiu

A reação é observada quando o metal é totalmente consumido. Neste caso, o esperado não ocorreu.

SÍNTESE: 46 – Formação de alcóxido de oxamniquina (NaH)

A tentativa de formação de alcóxido de oxamniquina, utilizando NaH, não foi bem sucedida. O produto desejado não foi obtido e houve formação de subprodutos complexos, os quais não se conseguiu separar e isolar de maneira eficiente.

SÍNTESE: 47 – Redução do grupo nitro da oxamniquina

O análogo amínico da oxamniquina não foi obtido, ou seja, a redução do grupo nitro até amino não foi conseguida. No entanto, um derivado cíclico (Barberato *et al.*, 2002) foi obtido por mecanismo totalmente inédito. Os resultados a seguir são referentes ao derivado cíclico da oxamniquina, representado por OXA-cíclica.

TABELA LXXXVII – Aspecto físico do produto e análise realizada

Ensaio	Aspecto	Análise	Resultado/Rendimento
A	sólido marrom claro	RMN ¹ H /CCD	Derivado cíclico (reação rápida)/ 51%
B	sólido marrom claro	RMN ¹ H /CCD	Derivado cíclico (reação rápida)/ 65%
C	sólido marrom claro	RMN ¹ H /CCD	Derivado cíclico (reação rápida)/ 60%
D	sólido marrom claro	RMN ¹ H /CCD	Derivado cíclico (reação lenta)/ 35%

O produto obtido foi analisado por ponto de fusão, análise elementar, e ressonância magnética nuclear ¹H, ¹³C, HETCOR. O produto apresenta-se sob a forma sólida, de coloração marrom clara. O melhor rendimento obtido foi pela reação B, 65%.

Cromatografia em camada delgada

Pela CCD, observou-se o consumo de oxamniquina e a formação de do produto em distância significativa (*R_f* de 0,7) em relação à mancha do fármaco. Embora outras manchas tenham aparecido, elas foram facilmente separadas por cromatografia em coluna.

Cromatografia em coluna

O sistema eluente utilizado foi acetato de etila/metanol (7:3). Este sistema mostrou-se adequado para a separação e purificação do produto obtido.

Ponto de fusão

OXA-cíclica, após purificação e secagem, apresentou ponto de fusão entre 140 a 142 °C.

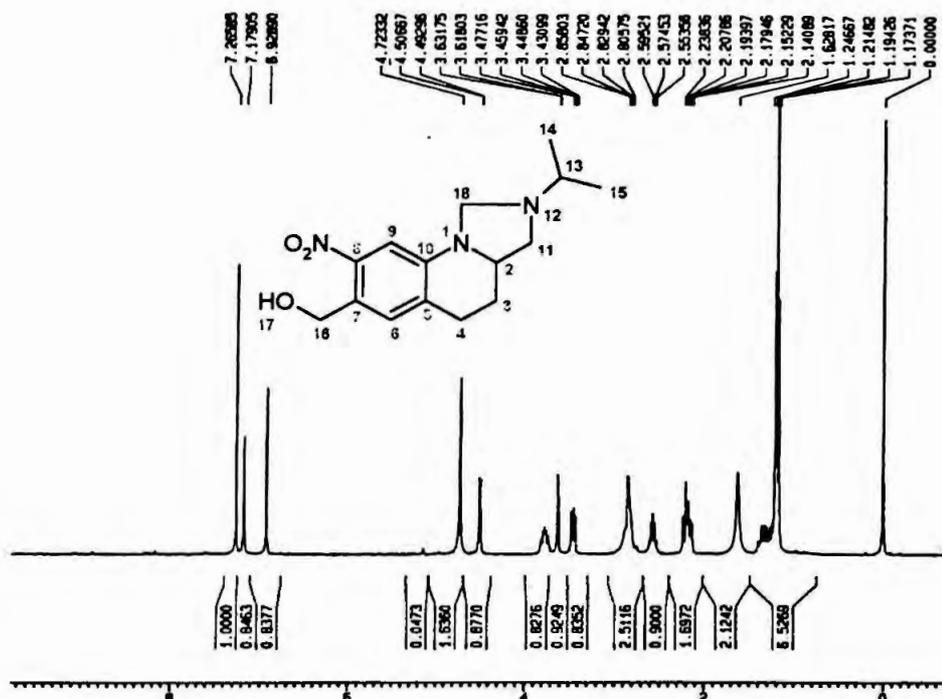
Análise elementar

A TABELA LXXXVIII apresenta os percentuais de cada elemento na fórmula molecular do derivado cíclico da oxamniquina. Estão relacionados os valores calculados e os determinados experimentalmente.

TABELA LXXXVIII – Dados obtidos pela análise elementar do derivado cíclico da oxamniquina

DERIVADO CÍCLICO DA OXAMNIQUINA		
Fórmula empírica: C₁₅H₂₁N₃O₃ Peso molecular: 291,35		
ANÁLISE	Calculado	Experimental
Carbono	61,84%	62,31%
Hidrogênio	7,27%	7,21%
Nitrogênio	14,42%	14,85%

A seguir estão apresentados os espectros de RMN de ¹H, ¹³C e HETCOR do derivado OXA-cíclica.

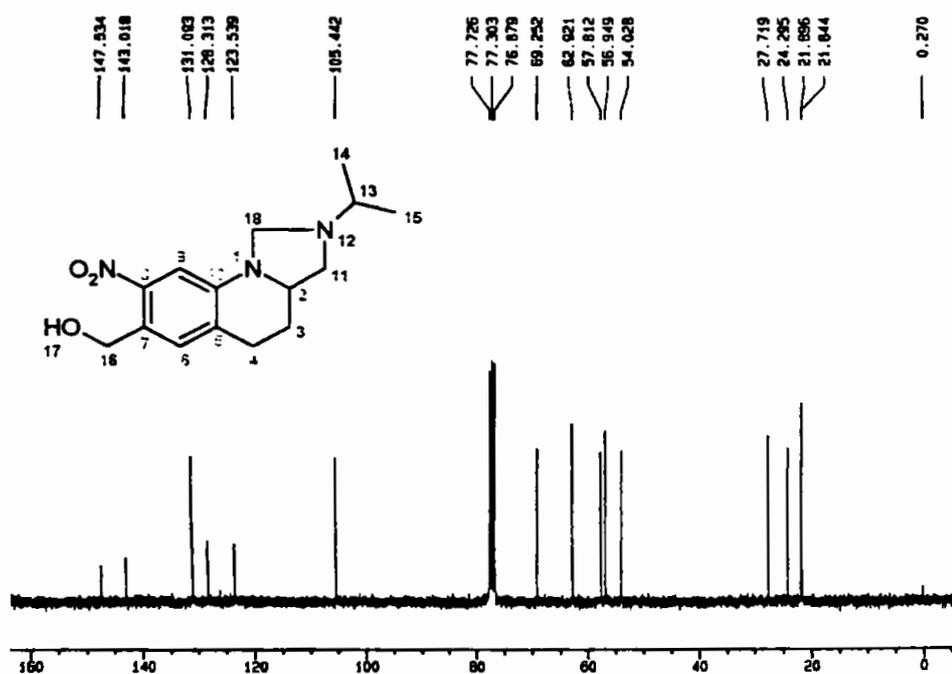
Espectro 38 – RMN ¹H da OXA-cíclica.TABELA LXXXIX: Atribuições de RMN ¹H da OXA-cíclicaRMN - ¹H (DMSO-d₆, 300MHz, δ=ppm, J=Hz)

3,81-3,71 (m, 1H, H-2 pseudoaxial); 2,20-2,14 (m, 1H, H-3 equatorial);
 1,41-1,25 (m, 1H, H-3' axial); 2,85-2,80 (m, 2H, H-4); 6,92 (s, 1H, H-6); 7,17
 (s, 1H, H-9); 3,47-3,43 (dd, 1H, H-11 gauche, J=8,5); 2,23-2,17 (t, 1H, H-11'
 anti, J=8,5); 2,59-2,55 (m, 1H, H-13); 1,20 (d, 3H, H-14*, J=6,2); 1,18 (d,
 3H, H-15*, J=6,1); 4,72 (s, 2H, H-16); 4,5 (d, 1H, H-18, J=4,1); 3,62 (d, 1H,
 H-18' protegido fenila, J=4,1)

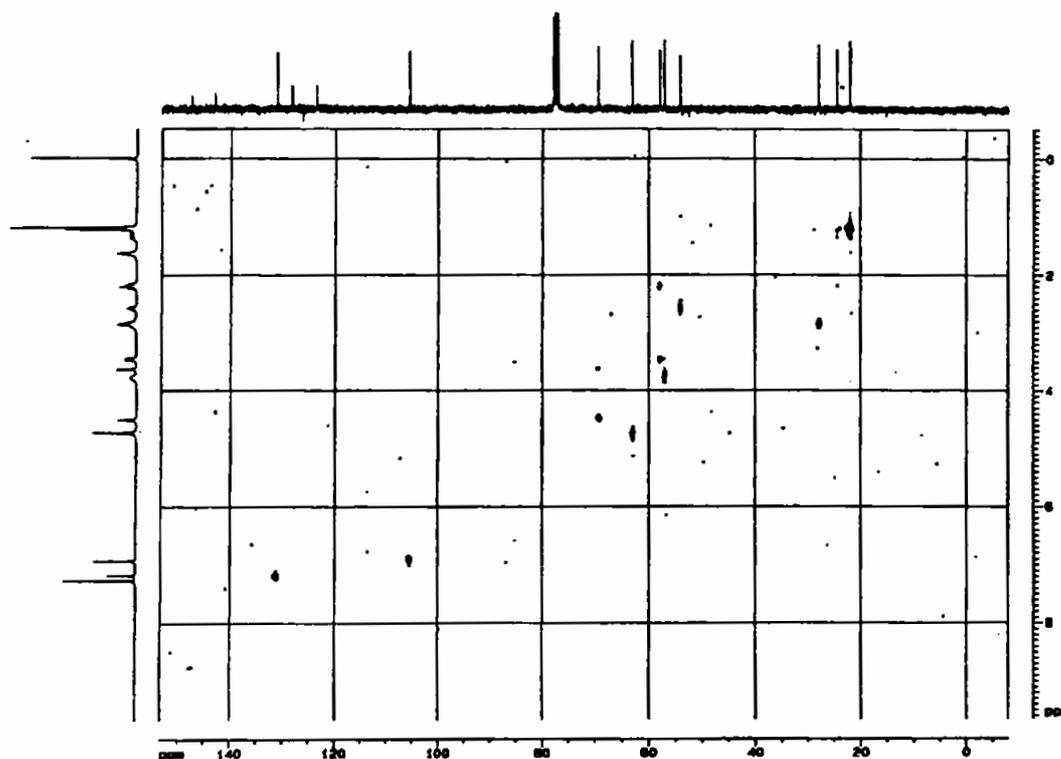
* podem estar trocados

BIBLIOTECA
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Universidade de São Paulo

Roberto Parise Filho

Espectro 39 – RMN ^{13}C da OXA-cíclica.TABELA XC: Atribuições de RMN ^{13}C da OXA-cíclica

RMN - ^{13}C (DMSO- d_6 , 75MHz, δ =ppm)
56,94 (C2); 24,29 (C3); 27,71 (C4); 128,31 (C5); 131,09 (C6); 123,53 (C7); 143,02 (C8); 105,44 (C9); 147,53 (C10); 57,81 (C11); 54,02 (C13); 21,89 (C14); 21,84 (C15); 62,92 (C16); 69,25 (C18)



Espectro 40 - HETCOR da OXA-cíclica.

SÍNTESE: 48 – Síntese do *N*-(hidroxipropil) metacrilamida (HPMA)

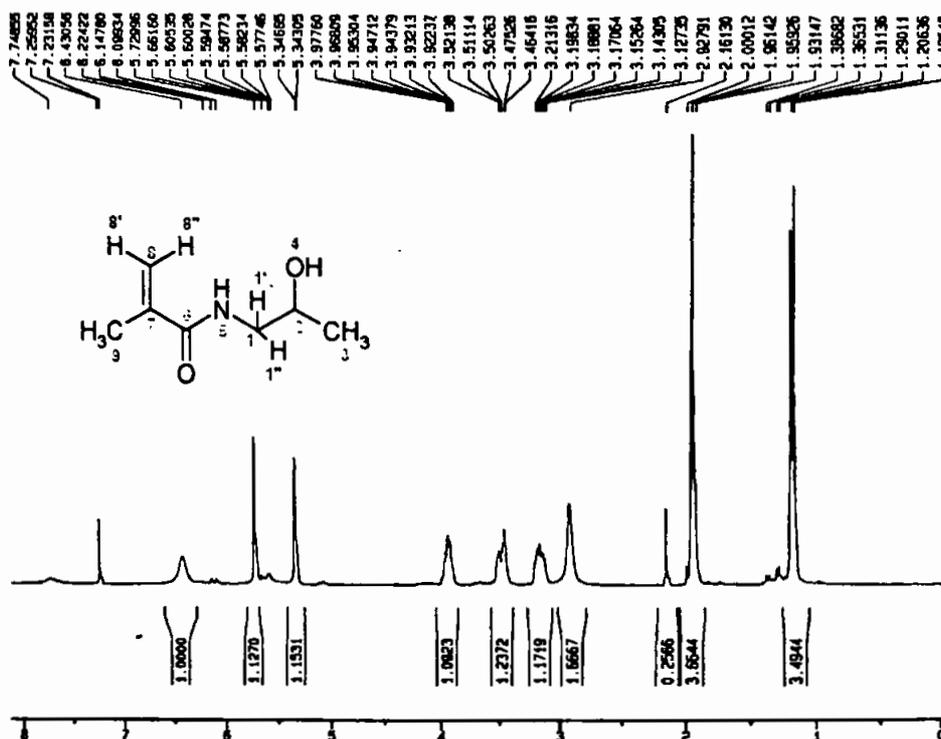
O produto não foi obtido. Cristais do cloridrato de 1-amino-2-propanol foram separados em abundância. Estes cristais, juntamente com resíduos de bicarbonato prejudicaram a extração do produto.

SÍNTESE: 49 – Síntese do HPMA

Rendimento: 2,5530 g (59%)

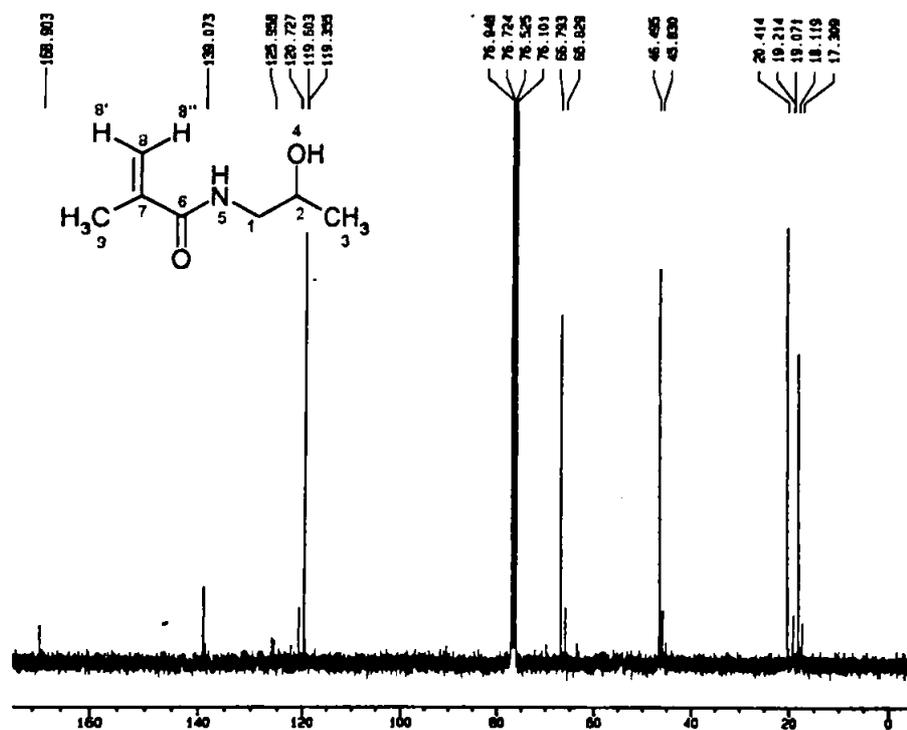
Ponto de fusão: 67-68 °C

Aspecto: sólido translúcido

Espectro 41 – RMN ¹H do HPMA.**TABELA XCI: Atribuições de RMN ¹H do HPMA**

RMN - ¹H (DMSO-d₆, 300MHz, δ=ppm, J=Hz)

3,52-3,47 (m, 1H, H-1'-gauche); 3,21-3,12 (m, 1H, H-1"-anti); 3,99-3,90 (m, 1H, H-2); 1,19 (d, 3H, H-3, J=6,2); 2,92 (s largo, 1H, H-4); 6,43 (t, 1H, H-5); 5,72 (s, 1H, H-8"); 5,34 (s, 1H, H-8'); 1,96 (s, 3H, H-9)

Espectro 42 –RMN ¹³C do HPMA.TABELA XCII: Atribuições de RMN ¹³C do HPMA

RMN - ¹³ C (DMSO-d ₆ , 75MHz, δ=ppm)
46,49 (C1); 66,70 (C2); 20,41 (C3); 168,90 (C6); 139,07 (C7); 119,60 (C8); 18,11 (C9)

4.1.3 Polimerização

A seguir relata-se a caracterização do copolímero por análise térmica e espectrofotometria de absorção na região do infravermelho.

SÍNTESE: 50 – Polimerização com solvente

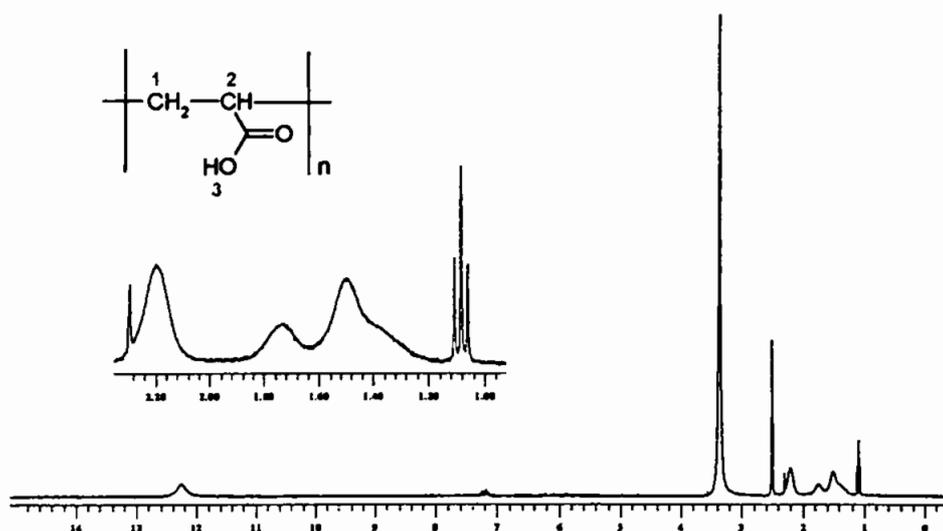
A técnica foi aplicada aos ácidos acrílico e metacrílico. Não foram obtidos os polímeros esperados. O método não foi aplicado ao monômero metacrílico da oxamniquina.

SÍNTESE: 51 – Polimerização sem solvente

Esta técnica foi utilizada para a polimerização dos ácidos acrílico e metacrílico. Obteve-se o ácido polimetacrílico sob forma de pó fino e branco. O ácido poliacrílico apresentou-se sob forma de sólido rígido. Não foi possível a purificação total dos polímeros. Apesar de os resultados serem satisfatórios, esta reação mostrou ser muito exotérmica e violenta. Não será aplicada aos derivados da oxamniquina.

SÍNTESE: 52 – Polimerização na ausência de oxigênio

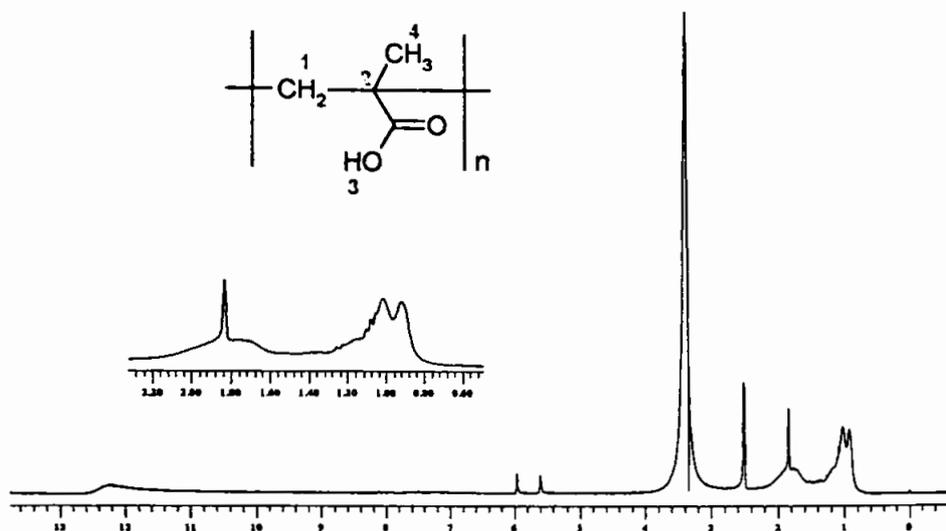
Esta técnica foi aplicada aos ácidos acrílico e metacrílico. A polimerização foi conseguida, o que pode ser comprovada pelos espectros 43 e 44 para os ácidos poliacrílico e polimetacrílico, respectivamente.



Espectro 43 - RMN ^1H do ácido poliacrílico.

TABELA XCIII: Atribuições de RMN ^1H do ácido poliacrílico

RMN - ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)
2,30-2,10 (m, 2H, H-1); 1,90-1,20 (m, 1H, H-2); 12,10 (S_{targo} , 1H, H-3)

Espectro 44 - RMN ^1H do ácido polimetacrílico.TABELA XCIV: Atribuições de RMN ^1H do ácido polimetacrílico

RMN - ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz, δ =ppm, J=Hz)
2,15-1,60 (m, 2H, H-1); 1,20-0,80 (m, 3H, H-4); 12,32 (Slargo, 1H, H-3)

SÍNTESE: 53 – Polimerização do monômero metacrílico da oxamniquina

O produto polimetacrilato de oxamniquina não foi obtido pelo uso da técnica proposta. A reação não se processou satisfatoriamente. Quando se tentou precipitar, apenas houve uma turvação do meio, dando indícios de que a polimerização tivesse ocorrido. Após análise, constatou-se que era apenas o monômero metacrílico da oxamniquina.

SÍNTESE: 54 - Copolimerização do metacrilato de oxamniquina e ácido metacrílico

Esta técnica foi aplicada ao ácido metacrílico e ao metacrilato de oxamniquina. A copolimerização foi conseguida, resultando no ácido poli(metacrílico-co-metacrilato de oxamniquina). O produto obtido apresentou-se sob a forma de pó amarelo-claro, bem fino e insolúvel na maioria dos solventes, exceto pelo fato de ser ligeiramente solúvel em DMF. Tendo em vista sua baixa solubilidade nos solventes comumente utilizados nas análises espectrométricas de ressonância magnética nuclear, o produto foi submetido à análise térmica, espectrofotometria no IV e difração por raios X para fins de comparação com o ácido polimetacrílico.

Análise térmica

A análise térmica vem sendo amplamente empregada na caracterização de materiais poliméricos. A seguir estão apresentadas as curvas termogravimétricas (TG) e curvas térmicas diferenciais (DTA) para o copolímero (PMOXA), oxamniquina (OXA), ácido polimetacrílico (PMA) e mistura física (OXA+PMA).

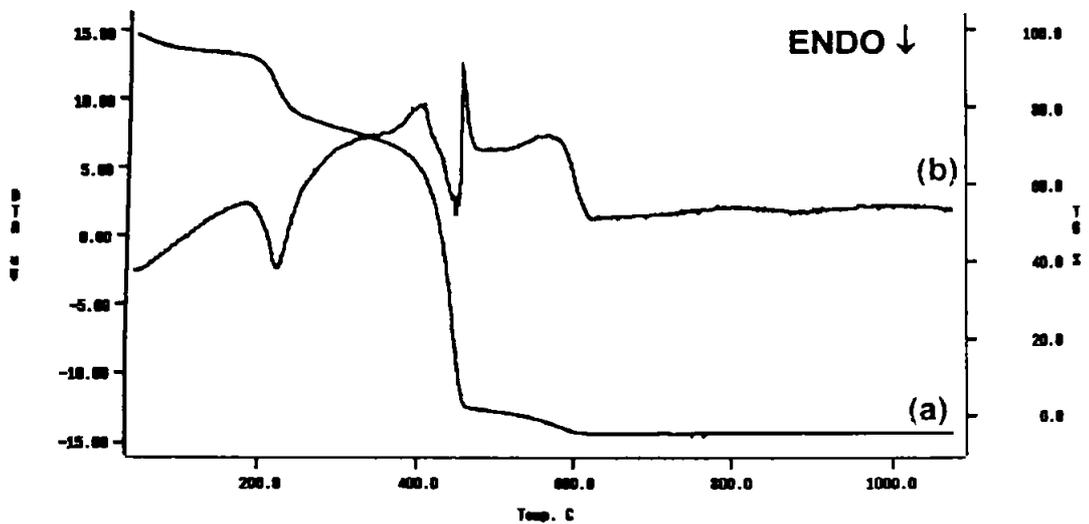


FIGURA 17 – (a) Curva TG para o ácido polimetacrílico (PMA); (b) Curva DTA do ácido polimetacrílico (PMA).

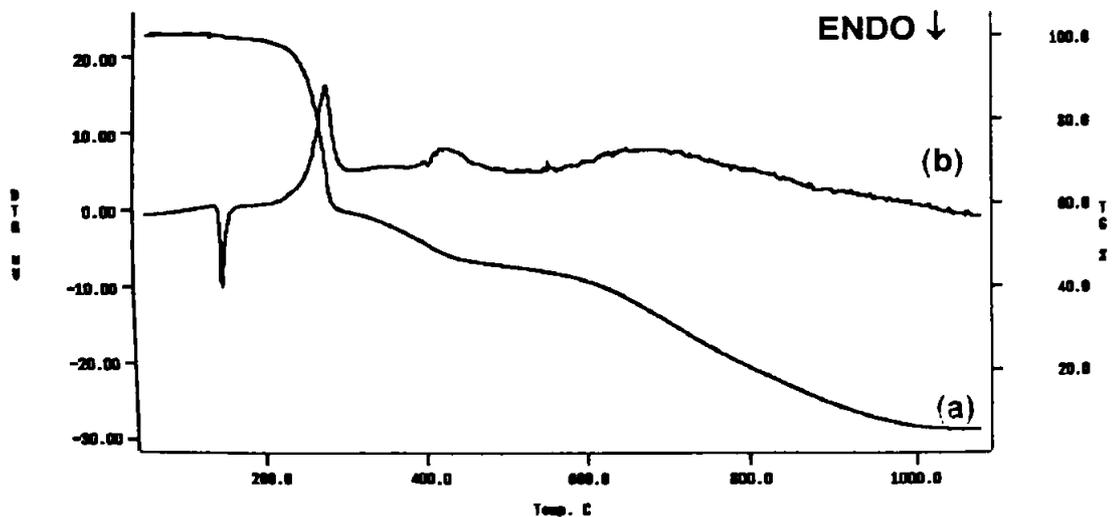


FIGURA 18 – (a) Curva TG para a oxamniquina (OXA); (b) Curva DTA para a oxamniquina (OXA).

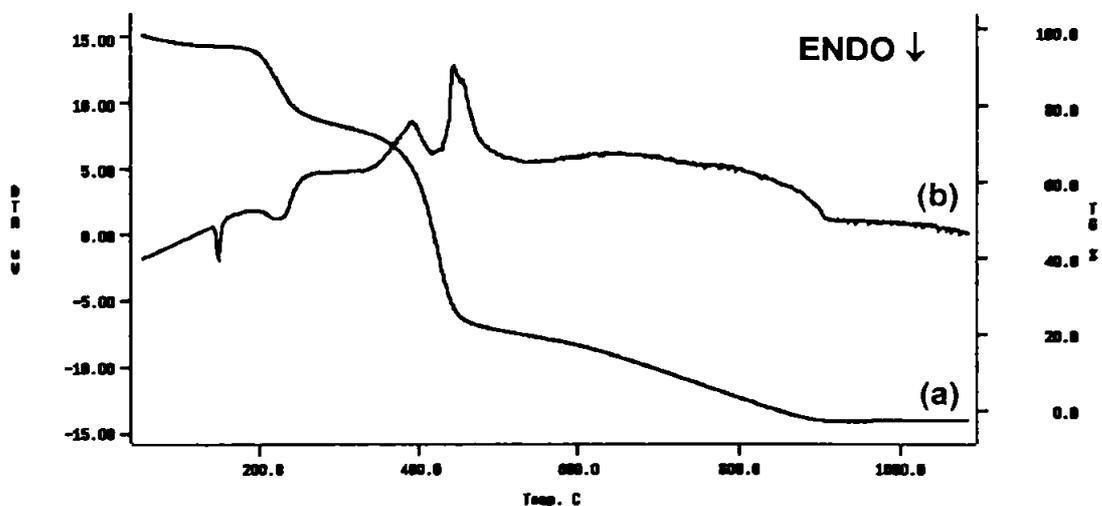


FIGURA 19 – (a) Curva TG para a mistura física entre a oxamniquina (OXA) e o ácido polimetacrílico (PMA); (b) Curva DTA para a mistura física entre a oxamniquina (OXA) e o ácido polimetacrílico (PMA).

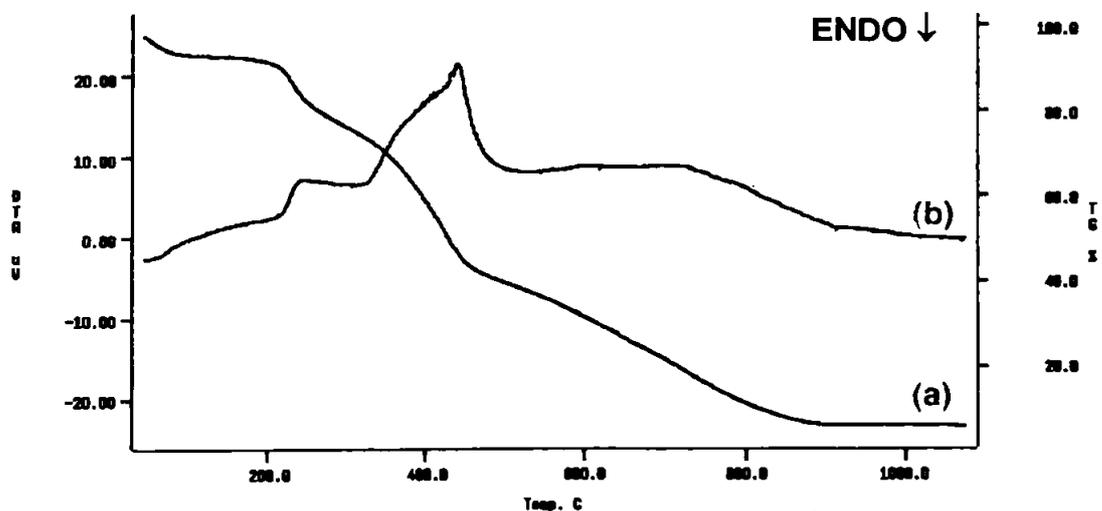
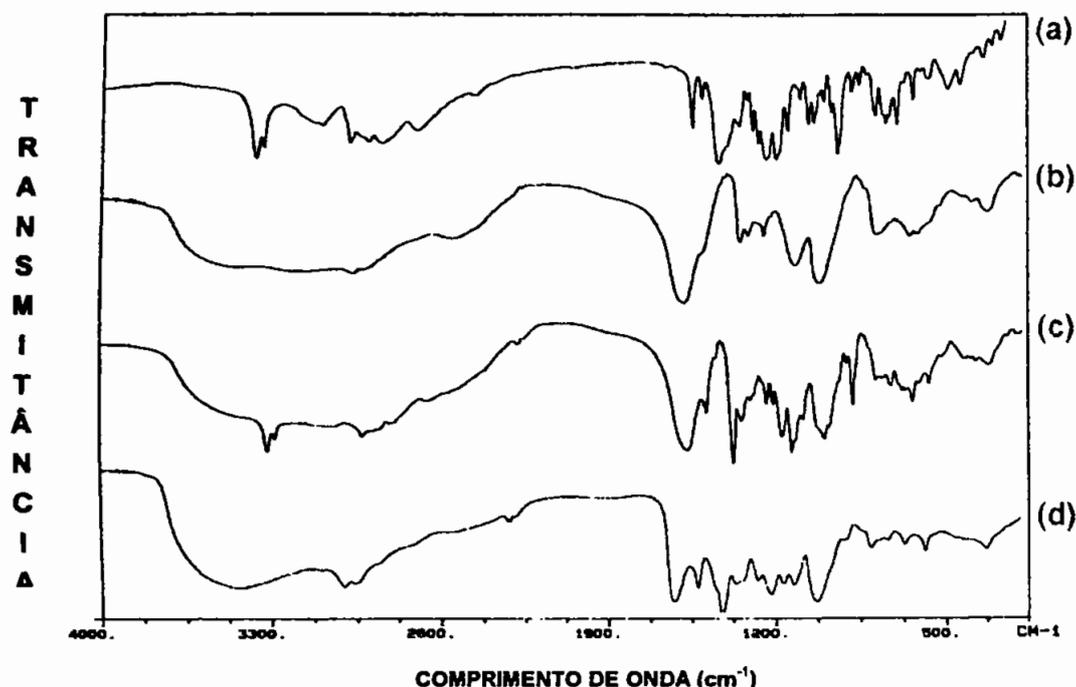


FIGURA 20 - (a) Curva TG para o pró-fármaco polimérico PMOXA; (b) Curva DTA para pró-fármaco polimérico PMOXA.

Espectrofotometria no infravermelho



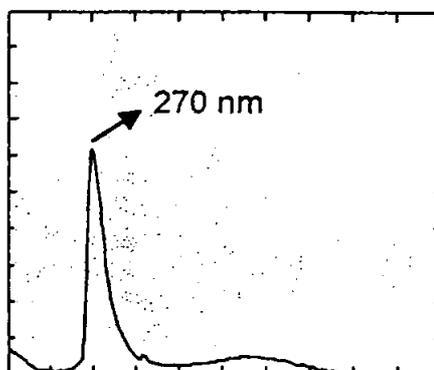
Espectro 45 – Espectro de absorção na região do infravermelho para os compostos (a) OXA, (b) PMA, (c) mistura física e (d) PMOXA.

TABELA XCV – Dados obtidos pelo espectro de infravermelho do a) OXA, (b) PMA e (d) PMOXA

(a)	(b)	(d)
v 3324 – (N-H) amina secundária	v 3500-3200 – (OH) ácido carboxílico (devido às ligações de hidrogênio)	v 3500, 3000 – (OH) ácido carboxílico
v 2880 – (C-H) alifático	v 1706 – (C=O) ácido carboxílico	v 3000, 2900 – (C-H) alifático
v 1620, 1580 – (C=C) aromático	v 1391 – (C=O) carbonila de ácido, deformação no plano	v 1712 – (C=O) ácido carboxílico
v 1508 – combinação (NO ₂ assimétrico e insaturação C=C)	v 1174 – (C-O) carbonila	v 1625 – (C=C) aromático
v 1329 – (NO ₂ simétrico)	v 948 – (C=O) carbonila de ácido, deformação fora do plano	v 1525, 1343 – (NO ₂) assimétrico e simétrico
v 1385, 1362 – (CH ₃ geminais)		v 1160 – (C-O) ácido
v 1050 – (C-O) álcool primário		

Determinação do grau de substituição do copolímero

a) Varredura espectral



Espectro 46 - Espectro de absorção no UV da oxamniquina (10 µg/mL) em DMF.

b) Padronização do método (Curva de calibração)

Os valores utilizados nos cálculos para traçar a curva de calibração estão expostos na TABELA XCVI. A FIGURA 18 apresenta a curva correspondente. Os resultados do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva encontram-se na TABELA XCVII.

TABELA XCVI – Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão para oxamniquina em DMF, a 270 nm.

CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (µg/mL)	ABSORBÂNCIA	CONCENTRAÇÃO REAL (µg/mL)
1	0,0121	0,877
2	0,0504	1,716
3	0,1072	2,961
4	0,151	3,922
5	0,1951	4,887
6	0,2373	5,813
7	0,2794	6,736
8	0,3338	7,929
9	0,3928	9,222
10	0,4373	10,19
11	0,5268	12,15
12	0,5689	13,08
13	0,6101	13,98
14	0,6571	14,89
15	0,6932	14,90
16	0,7342	15,70

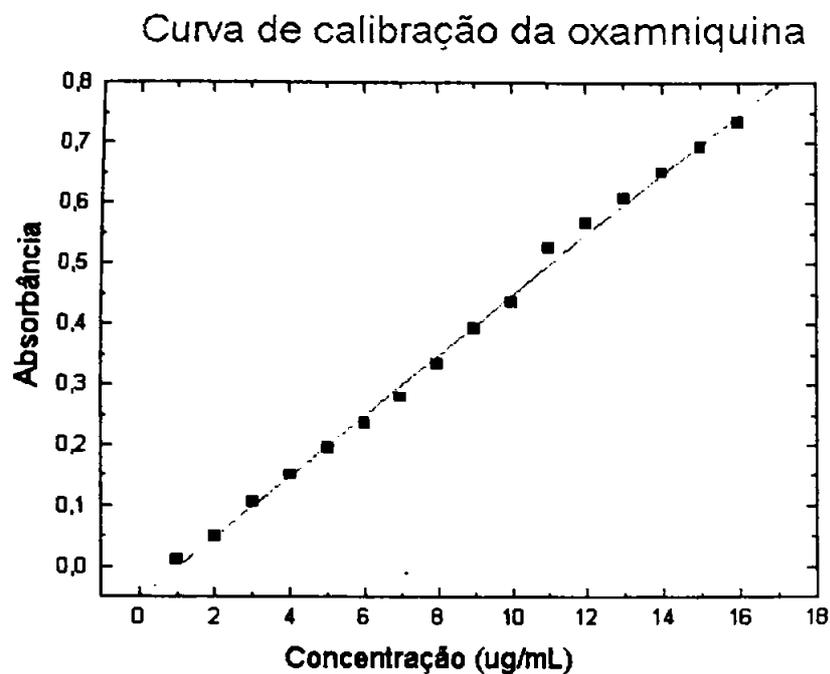


FIGURA 21 – Curva de calibração da oxamniquina em 270 nm.

TABELA XCVII – Resultados estatísticos dos valores obtidos na determinação da curva de calibração da oxamniquina em DMF, a 270 nm.

PARÂMETROS	VALORES
Valor de a	0,04986
Valor de b	-0,04999
r (coeficiente de correlação)	0,99839
s (desvio padrão)	0,01397
n (número de amostras)	16

A partir dos valores calculados, pode-se escrever a equação da reta,

$$\text{Absorbância} = 0,04986(\text{Concentração}-\mu\text{g/mL}) - 0,04999$$

c) Determinação do grau de substituição do copolímero

A absorvância relativa ao copolímero foi determinada em triplicata e os valores estão descritos a seguir:

$$\left. \begin{array}{l} 1) 0,1974 \\ 2) 0,2006 \\ 3) 0,2040 \end{array} \right\} \text{ Média: } 0,2006$$

Substituindo na equação:

$$0,2006 = 0,04986 (C) - 0,04999$$

$$C = 5,02 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{GRAU DE SUBSTITUIÇÃO} = \frac{\text{CONCENTRAÇÃO CALCULADA DE OXAMNIQUINA}}{\text{CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DO COPOLÍMERO}}$$

$$\text{G.S.} = \frac{5,02}{10} \therefore 50,2\%$$

10

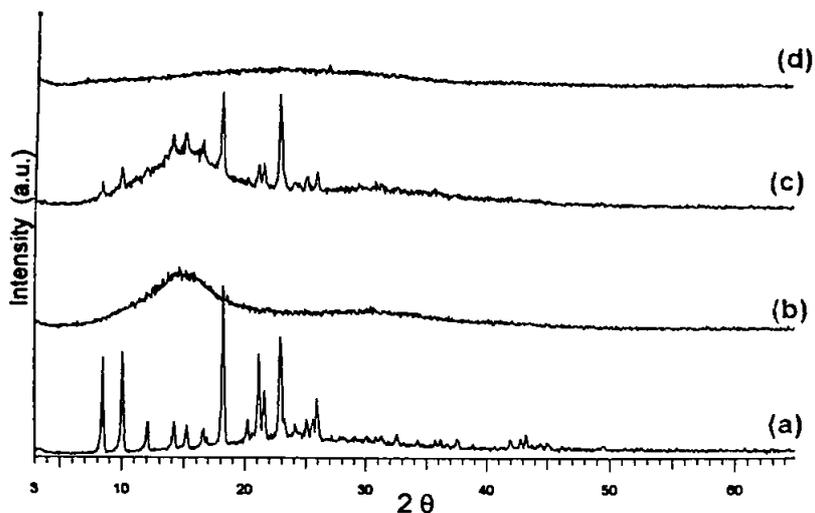
Difração de Raios-X

FIGURA 22 - Difratogramas de raios X da OXA (a), PMA (b), mistura física (c) e PMOXA (d).

SÍNTESE: 55 - Polimerização do monômero acrílico da oxamniquina

O produto poliacrilato de oxamniquina não foi obtido pelo uso da técnica proposta. A reação não se processou satisfatoriamente. Quando se tentou precipitar, apenas houve uma turvação do meio, dando indícios de que a polimerização tivesse ocorrido. Após análise, constatou-se que era apenas o monômero acrílico da oxamniquina.

SÍNTESE: 56 - Copolimerização do *N*-acrilóil derivado de oxamniquina (AC-OXA) com ácido acrílico

O copolímero desejado não foi obtido pelo uso da técnica proposta. A reação não se processou satisfatoriamente. Após análise, não se conseguiu identificar a copolimerização. Acredita-se que apenas o ácido acrílico polimerizou, enquanto o monômero acrílico da oxamniquina permaneceu inalterado na solução.

4.1.4 Ensaios biológicos

As TABELAS XCVIII a CIX apresentam os resultados do oograma e de vermes recuperados em cada um dos grupos avaliados. As FIGURAS 23 a 34 representam graficamente os resultados do oograma em cada grupo.

TABELA XCVIII – Oograma quantitativo do grupo não tratado

Animal	Estágio dos ovos								Vermes
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	
1	22	14	12	7	45	0	0	0	9
2	13	7	25	16	39	0	0	0	15
3	5	18	32	12	33	0	0	0	13
4	13	12	12	11	52	0	0	0	8
5	12	9	24	9	46	0	0	0	14
6	2	12	40	8	38	0	0	0	11
7	12	12	31	14	31	0	0	0	7
8	20	12	15	12	41	0	0	0	11
9	20	14	29	12	25	0	0	0	16
10	14	22	31	6	27	0	0	0	15
11	18	7	15	13	47	0	0	0	2
12	12	22	29	8	29	0	0	0	28
13	19	14	25	9	33	0	0	0	20
14	17	9	32	7	35	0	0	0	13
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	14,2	13,1	25,1	10,2	37,2	0	0	0	13

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias

Mortalidade: 6,6%

**TABELA XCIX – Oograma quantitativo do grupo tratado com oxamiquina
(100 mg/kg)**

Animal	Estágio dos ovos								Vermes
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	
1	0	0	0	0	97	2	0	1	0
2	0	0	0	0	2	4	0	0	0
3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	0	0	0	0	8	19	0	2	0
5	0	0	0	0	2	1	1	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	12	7	2	3	0
8	0	0	0	0	17	4	2	0	0
9	0	0	0	0	8	0	1	1	0
10	0	0	0	0	24	2	3	1	0
11	0	0	0	0	8	0	2	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	13	3	1	3	0
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	0	0	0	0	14,6	3,23	0,92	0,85	0

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias

Mortalidade: 13,3%

TABELA C – Oograma quantitativo do grupo veículo

Animal	Estágio dos ovos								
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	Vermes
1	0	0	88	0	12	0	0	0	4
2	9	6	2	19	64	0	0	0	11
3	7	21	27	11	34	0	0	0	7
4	10	16	24	4	41	5	0	0	10
5	24	12	14	2	48	0	0	0	14
6	10	16	56	0	13	0	0	0	9
7	14	28	10	4	44	0	0	0	6
8	6	26	16	4	48	0	0	0	10
9	12	10	22	2	54	0	0	0	7
10	8	16	6	6	64	0	0	0	4
11	16	8	16	4	56	0	0	0	5
12	10	22	38	4	26	0	0	0	13
13	8	32	10	0	50	0	0	0	6
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	13,1	16,3	25,4	5,01	52,0	0,38	0	0	8,15

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias

Mortalidade: 13,3%

TABELA CI – Oograma quantitativo do grupo ácido polimetacrílico (50 mg/kg)

Animal	Estágio dos ovos								
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	Vermes
1	6	13	14	5	60	1	1	0	13
2	11	18	15	5	50	0	1	0	11
3	16	15	20	7	42	0	1	0	11
4	9	13	17	10	50	1	0	0	7
5	6	26	29	6	33	0	0	0	5
6	22	11	25	3	39	0	0	0	8
7	31	21	33	0	15	0	0	0	8
8	3	13	8	7	69	0	0	0	8
9	16	24	7	1	51	1	0	0	7
10	15	12	26	14	30	3	0	0	4
11	11	22	7	5	55	0	0	0	6
12	3	20	19	7	49	2	0	0	12
13	16	18	12	9	45	0	0	0	6
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	12,7	15,0	16,6	6,07	43,6	0,61	0,15	0	8,15

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias

Mortalidade: 13,3%

TABELA CII – Oograma quantitativo do grupo monômero B (50mg/kg)

AVALIAÇÃO: 10 DIAS

Animal	Estágio dos ovos								
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	Vermes
1	0	0	0	0	20	0	0	0	3
2	0	0	1	0	60	5	2	0	0
3	0	0	1	0	10	19	2	2	4
4	0	0	0	0	22	0	2	0	0
5	0	0	0	0	67	18	4	0	2
6	0	0	0	1	69	4	1	0	0
7	0	1	0	0	6	0	1	0	0
8	0	0	0	0	45	0	5	0	2
9	0	0	0	0	30	1	0	1	0
10	0	0	0	0	37	12	0	0	5
11	0	0	0	0	96	6	2	0	2
12	0	0	0	0	53	1	1	0	4
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	0	0,08	0,16	0,08	42,9	5,5	1,66	0,25	1,83

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias

Mortalidade: 20%

TABELA CIII – Oograma quantitativo do grupo monômero B (50 mg/kg)

AVALIAÇÃO: 20 DIAS

Animal	Estágio dos ovos								
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	Vermes
1	0	0	0	0	25	1	1	0	2
2	0	1	1	0	47	4	1	0	0
3	0	0	1	0	11	21	1	2	2
4	0	0	0	0	23	0	2	0	0
5	0	0	0	0	61	25	2	0	1
6	0	0	1	1	60	1	1	0	0
7	0	0	0	0	5	0	1	0	0
8	0	0	0	0	35	0	3	0	1
9	0	0	0	0	31	1	0	1	0
10	0	0	0	0	34	11	0	0	2
11	0	0	0	0	80	5	2	0	1
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	0	0,09	0,27	0,09	37,45	6,27	1,27	0,27	0,81

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias

Mortalidade: 26,6%

**TABELA CIV – Oograma quantitativo do grupo tratado com oxamniquina (50mg/kg)
AVALIAÇÃO: 10 DIAS**

Animal	Estágio dos ovos								
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	Vermes
1	0	0	0	0	50	0	0	0	0
2	0	0	0	0	62	4	4	10	0
3	0	0	0	0	50	30	5	15	0
4	0	0	0	0	68	24	8	0	0
5	0	0	0	0	40	0	10	0	0
6	0	0	0	0	74	18	8	0	0
7	0	0	0	0	50	0	0	0	1
8	0	0	0	0	66	20	8	6	2
9	0	0	0	0	78	10	4	8	0
10	0	0	0	0	50	0	5	5	0
11	0	0	0	0	62	11	0	1	0
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	0	0	0	0	59,09	10,63	4,72	4,09	0,27

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias

Mortalidade: 26,6%

**TABELA CV – Oograma quantitativo do grupo tratado com oxamniquina (50mg/kg)
AVALIAÇÃO: 20 DIAS**

Animal	Estágio dos ovos								
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	Vermes
1	0	0	0	0	64	4	32	0	3
2	0	0	0	0	68	0	20	12	0
3	0	0	0	0	50	2	42	6	0
4	0	0	0	0	58	2	30	15	0
5	0	0	0	0	62	0	38	0	0
6	0	0	0	0	60	8	32	0	0
7	0	0	0	0	38	6	48	6	2
8	0	0	0	0	50	6	36	8	3
9	0	0	0	0	68	0	28	4	3
10	0	0	0	0	66	6	26	2	2
11	0	0	0	0	56	6	32	6	0
12	0	0	0	0	40	16	32	12	0
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	0	0	0	0	56,66	4,66	33	5,91	1,08

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias

Mortalidade: 20%

TABELA CVI – Oograma quantitativo do grupo monômero A (50 mg/kg)
AVALIAÇÃO: 10 DIAS

Animal	Estágio dos ovos								
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	Vermes
1	0	0	0	0	30	10	0	0	8
2	0	0	1	0	72	24	2	20	5
3	0	0	1	0	84	8	8	0	12
4	0	0	0	0	84	8	4	4	11
5	0	0	0	0	95	5	0	0	1
6	0	0	0	1	84	6	10	0	4
7	0	1	0	0	90	2	0	8	2
8	0	0	0	0	78	4	4	0	4
9	0	0	0	0	80	2	0	1	1
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	0	0,11	0,22	0,11	77,4	7,66	3,11	3,66	5,33

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias
 Mortalidade: 40%

TABELA CVII – Oograma quantitativo do grupo monômero A (50 mg/kg)
AVALIAÇÃO: 20 DIAS

Animal	Estágio dos ovos								
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	Vermes
1	0	0	0	0	60	0	0	6	4
2	0	1	1	0	40	4	4	4	2
3	0	0	1	0	60	2	6	4	1
4	0	0	0	0	66	0	2	4	3
5	0	0	0	0	30	10	6	2	9
6	0	0	1	1	48	6	0	4	3
7	0	0	0	0	34	4	8	8	0
8	0	0	0	0	68	8	1	6	0
9	0	0	0	0	68	0	2	4	17
10	0	0	0	0	50	0	2	10	0
11	0	0	0	0	45	0	0	8	0
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	0	0,09	0,27	0,09	51,72	3,09	2,27	5,45	3,54

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias
 Mortalidade: 26,6%

TABELA CVIII – Oograma quantitativo do grupo copolímero (50 mg/kg)

AVALIAÇÃO: 10 DIAS

Animal	Estágio dos ovos								
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	Vermes
1	22	20	26	0	32	0	0	0	24
2	8	2	28	0	36	4	4	2	23
3	4	0	34	6	52	0	0	4	6
4	12	10	6	8	58	2	2	4	17
5	12	4	16	6	60	0	2	0	12
6	18	34	10	2	30	6	0	0	14
7	10	4	4	2	72	4	0	4	12
8	14	10	10	4	64	0	0	0	18
9	38	34	6	0	18	4	0	0	16
10	12	18	16	4	50	0	0	0	24
11	18	26	22	2	32	0	0	0	17
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	15,27	14,72	16,18	3,09	45,81	1,81	0,72	1,27	16,63

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias

Mortalidade: 26,6%

TABELA CIX – Oograma quantitativo do grupo copolímero (50 mg/kg)

AVALIAÇÃO: 20 DIAS

Animal	Estágio dos ovos								
	1°	2°	3°	4°	5°	IM	MM	CV	Vermes
1	16	8	16	8	42	2	0	0	10
2	10	6	36	4	42	2	0	2	9
3	8	6	16	24	42	0	2	2	11
4	18	6	12	6	56	2	0	0	21
5	2	10	34	12	42	0	0	0	16
6	2	10	18	10	58	2	0	0	27
7	2	24	22	18	32	2	0	2	11
8	4	8	16	16	24	0	0	0	11
9	2	6	10	10	42	2	0	0	9
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	7,11	9,33	20	12	42,22	1,33	0,22	0,66	13,88

IM – ovos mortos imaturos; MM – ovos mortos maduros; CV – cascas vazias

Mortalidade: 40%

10 dias

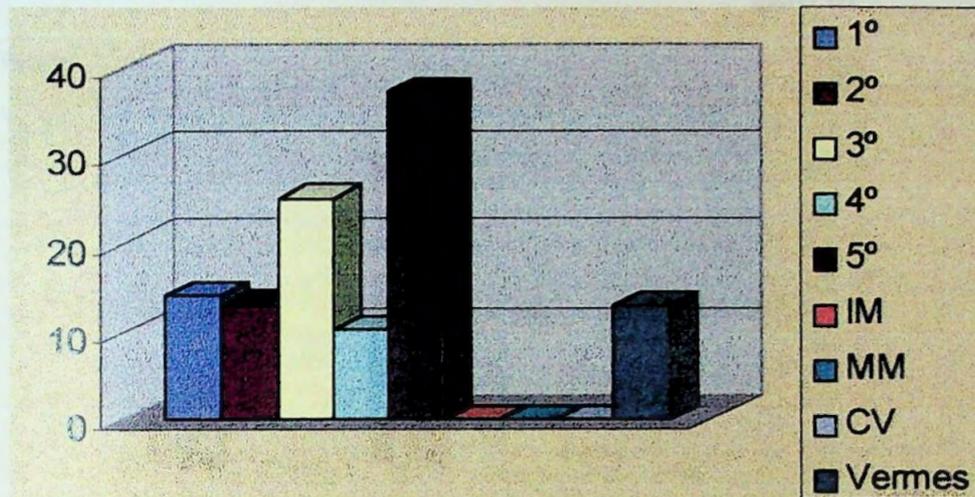


FIGURA 23 - Oograma quantitativo do grupo não tratado.

20 dias

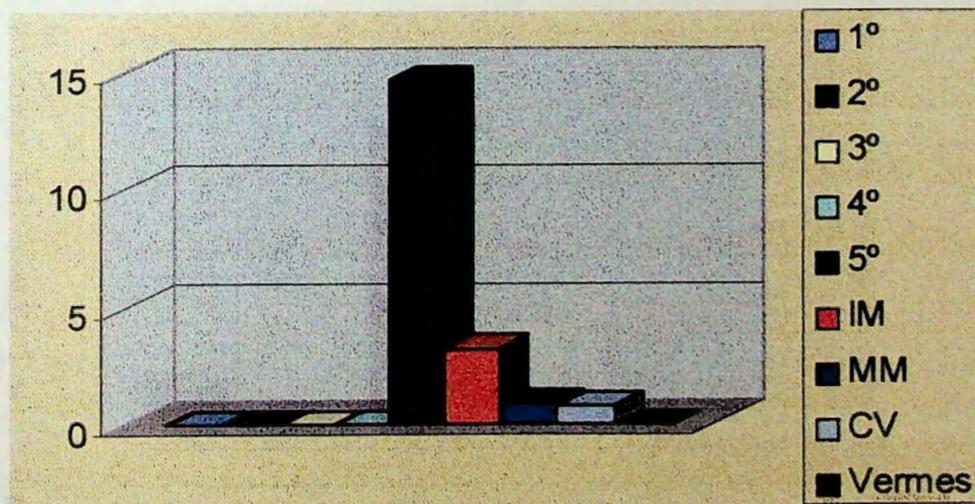


FIGURA 24 - Oograma quantitativo do grupo tratado com oxamniquina (100 mg/kg).

10 dias

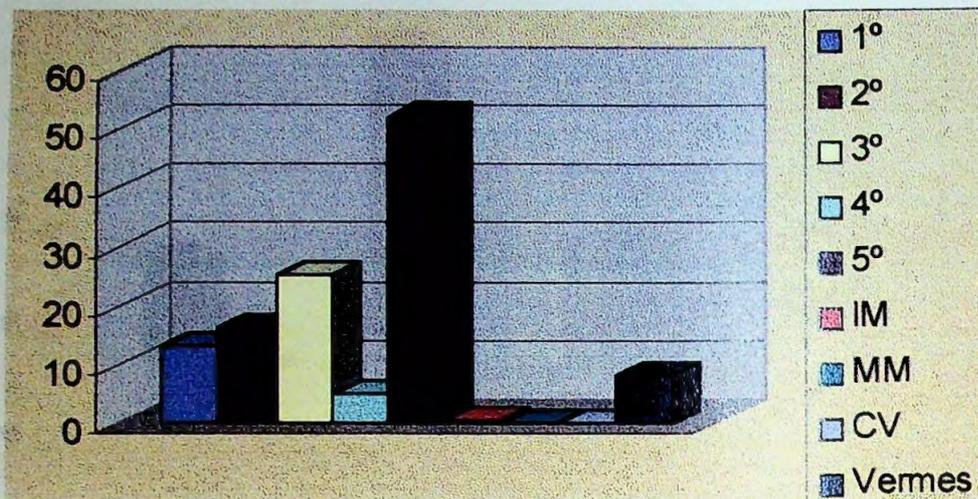


FIGURA 25 - Oograma quantitativo do grupo veículo.

20 dias

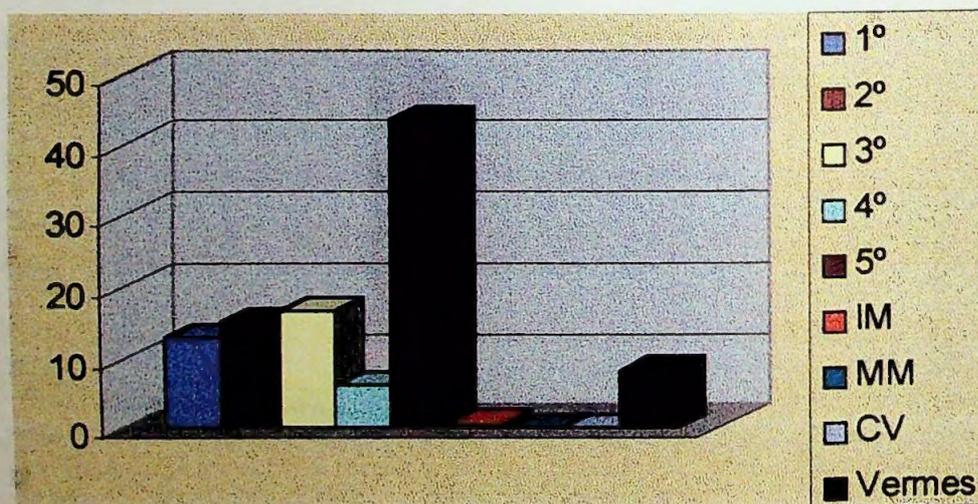


FIGURA 26 - Oograma quantitativo do grupo ácido polimetacrílico(50 mg/kg).

10 dias

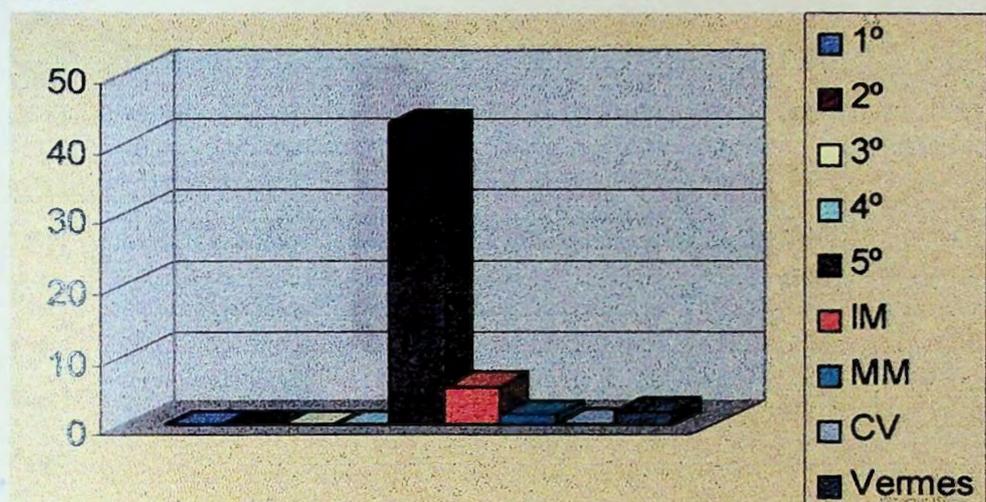


FIGURA 27 - Oograma quantitativo do grupo monômero B (50 mg/kg).
Avaliação 10 dias

20 dias

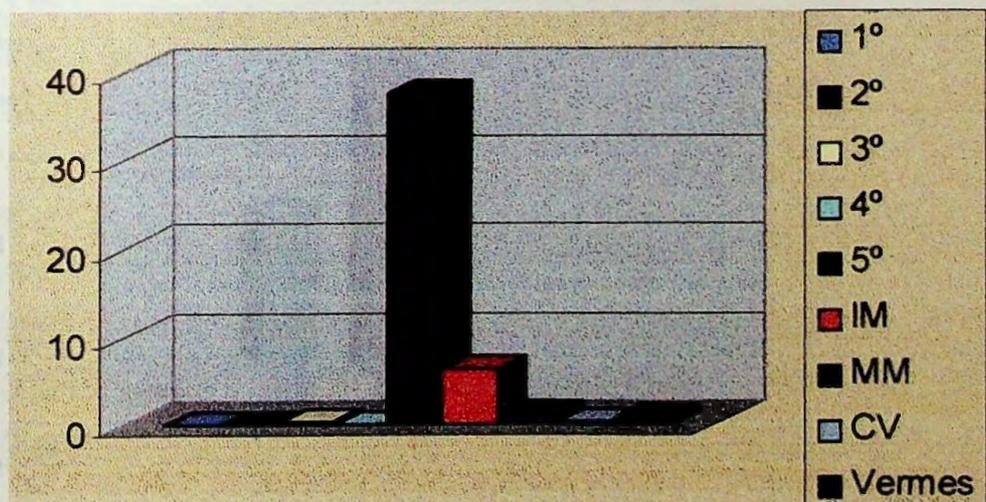


FIGURA 28 - Oograma quantitativo do grupo monômero B (50 mg/kg).
Avaliação 20 dias

10 dias

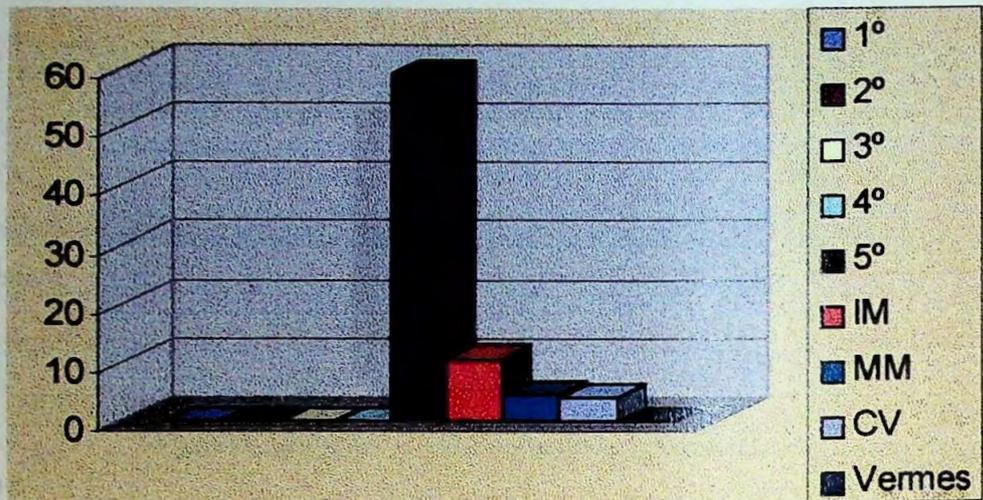


FIGURA 29 - Oograma quantitativo do grupo tratado com oxamniquina (50 mg/kg). Avaliação 10 dias

20 dias

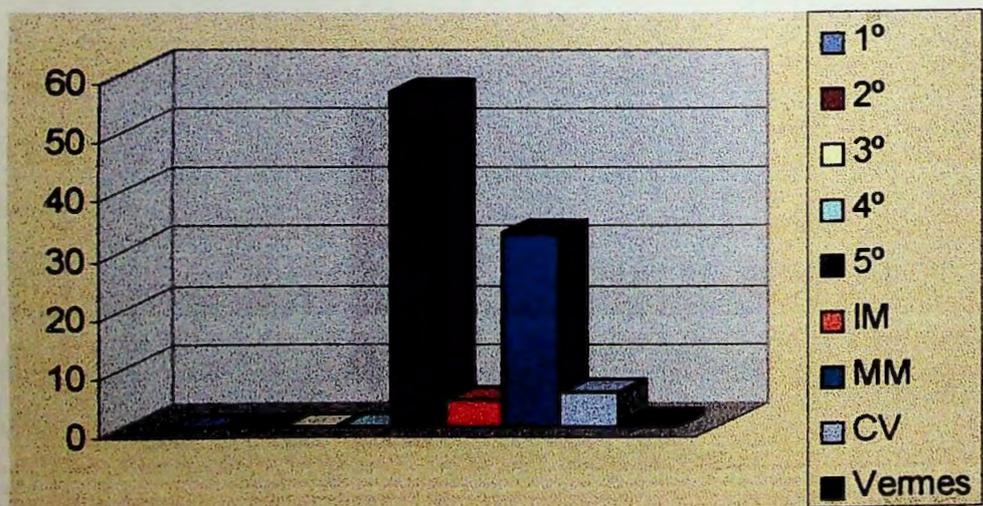


FIGURA 30 - Oograma quantitativo do grupo tratado com oxamniquina (50 mg/kg). Avaliação 20 dias

10 dias

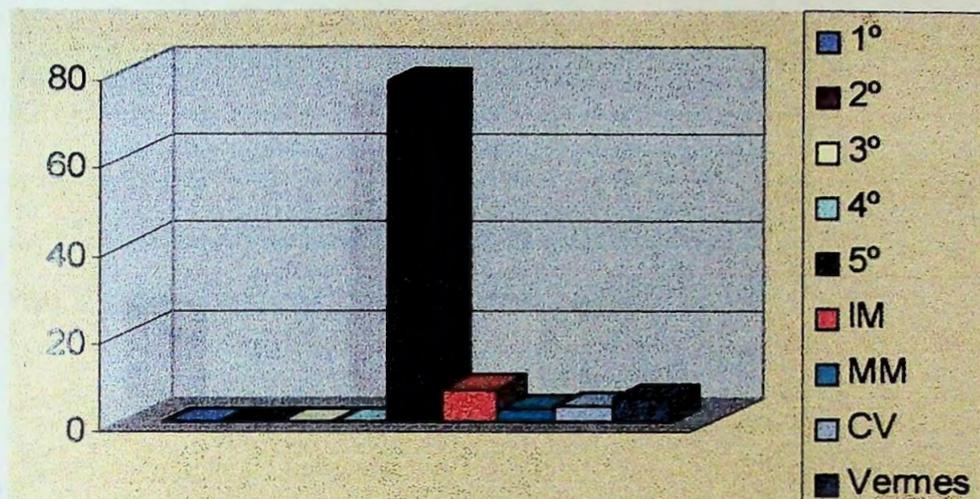


FIGURA 31 - Oograma quantitativo do grupo monômero A (50 mg/kg).
Avaliação 10 dias

20 dias

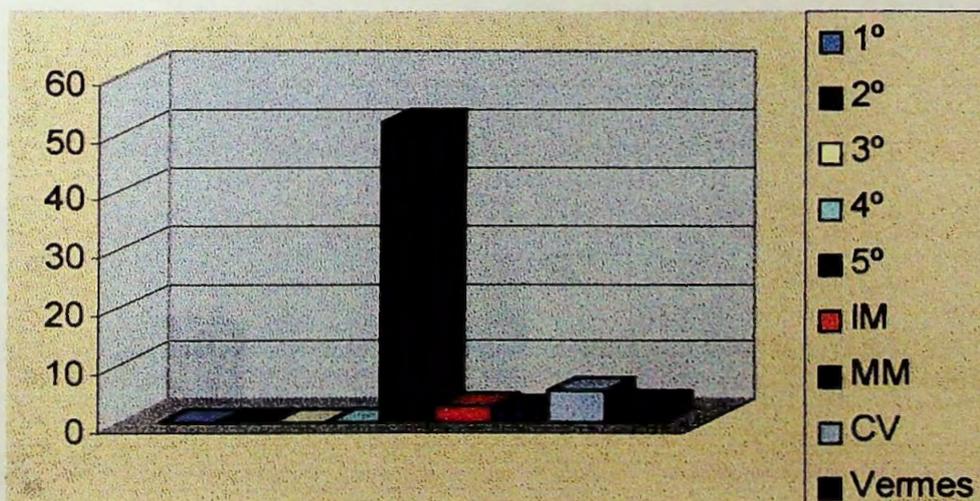


FIGURA 32 - Oograma quantitativo do grupo monômero A (50 mg/kg).
Avaliação 20 dias

10 dias

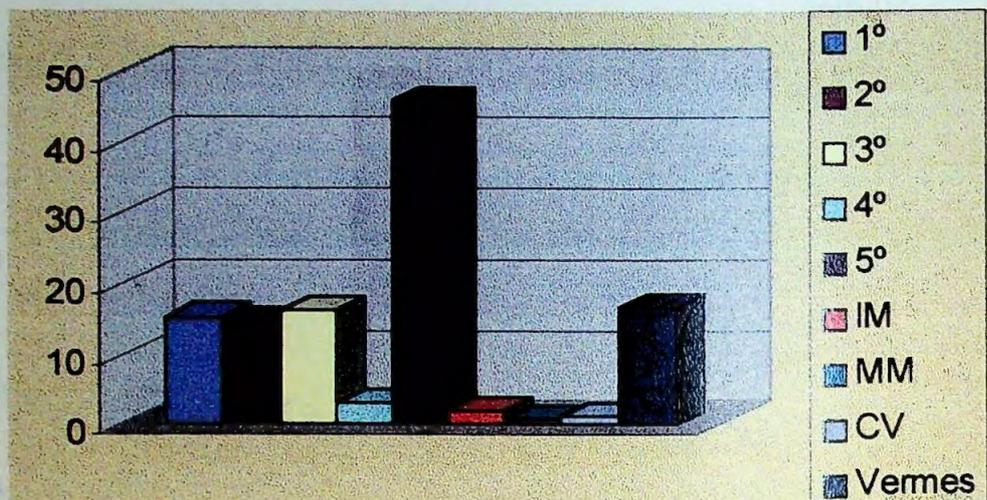


FIGURA 33 - Oograma quantitativo do grupo copolímero (50 mg/kg).
Avaliação 10 dias

20 dias

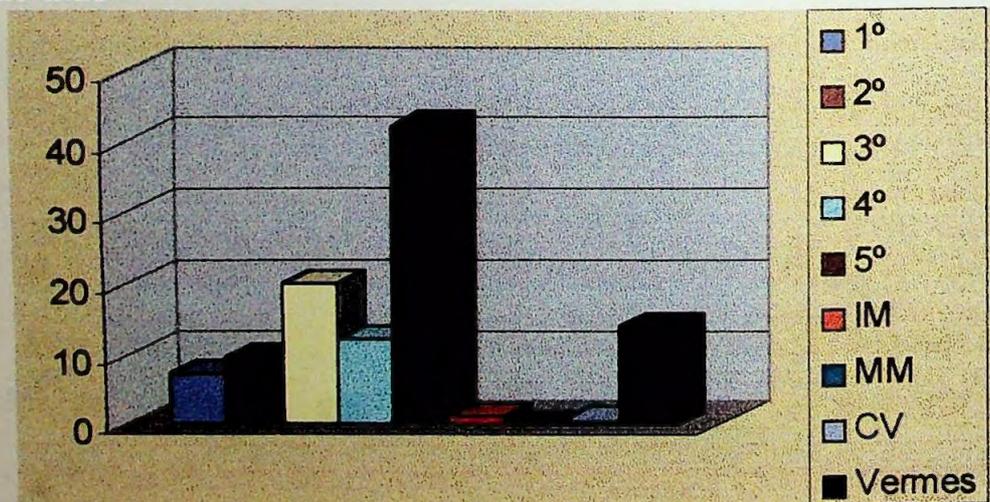


FIGURA 34 - Oograma quantitativo do grupo copolímero (50 mg/kg).
Avaliação 20 dias

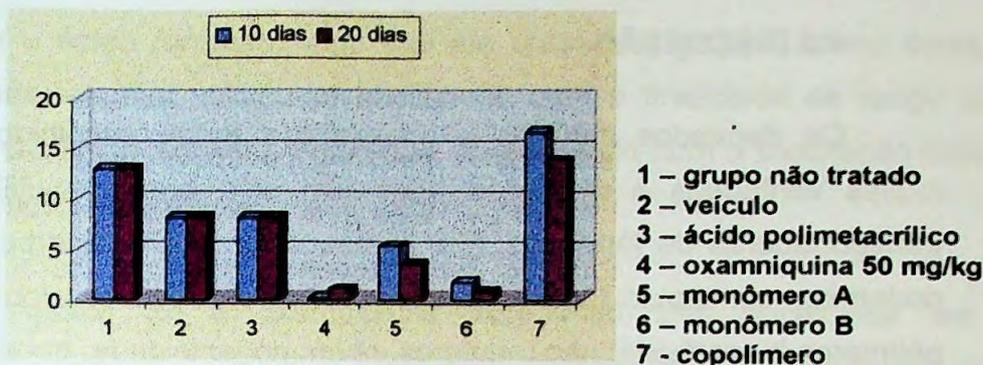


FIGURA 35 – Carga parasitária para os compostos avaliados no período de 10 e 20 dias.

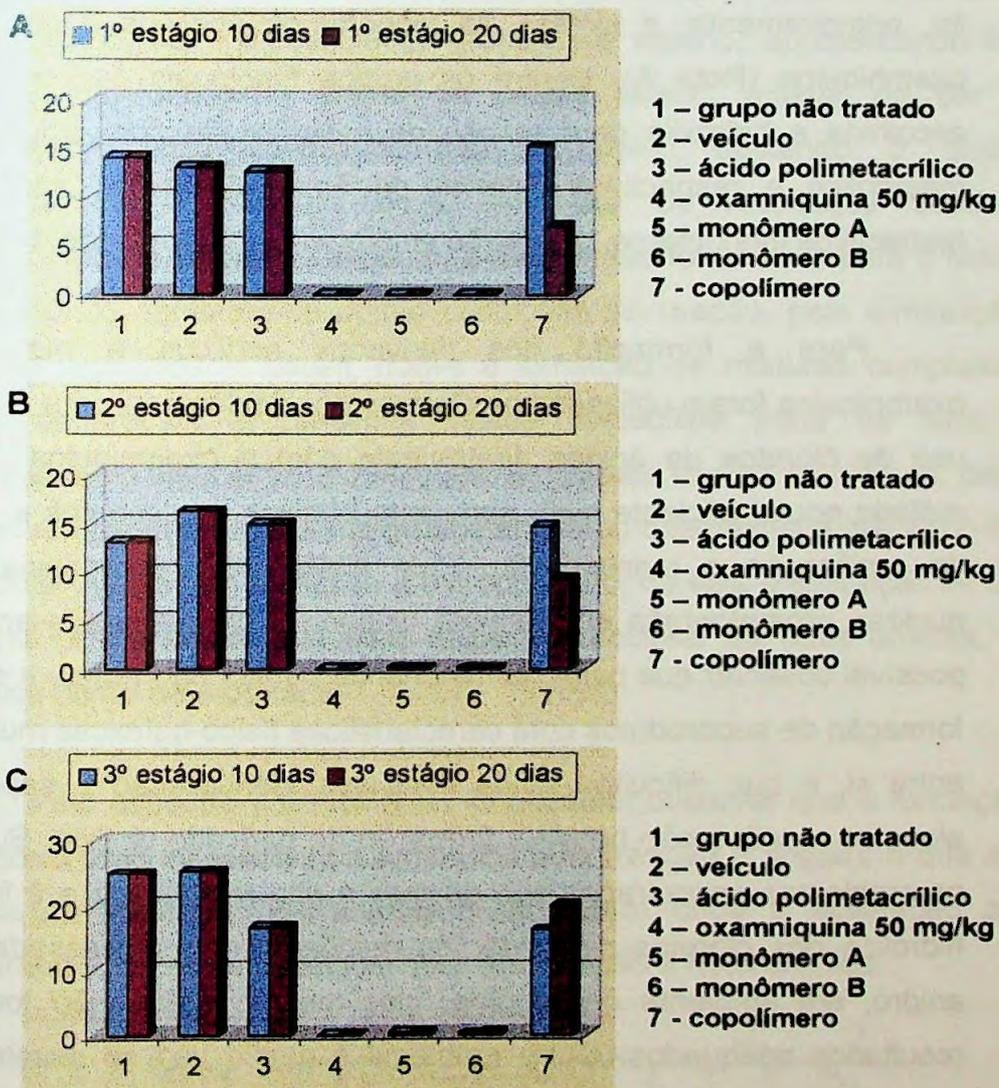


FIGURA 36 – Atividade dos compostos avaliados frente aos ovos de 1º (a), 2º (b) e 3º (c) estágios.

4.2 DISCUSSÃO

Os derivados acrílicos e metacrílicos foram escolhidos devido às muitas vantagens e utilidades. Eles têm sido bastante utilizados como transportadores de fármacos. Por apresentarem grupos carboxílicos livres, podem-se conseguir facilmente ligações do tipo éster e/ou amida. São polímeros bioestáveis, não-indutores de imunogenicidade, baixa toxicidade e de fácil eliminação pelo organismo.

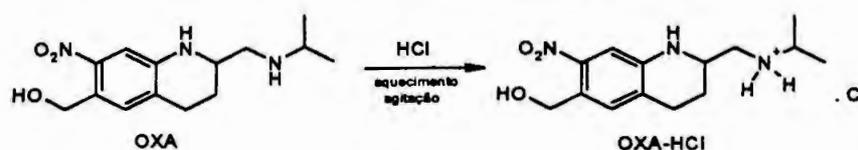
A técnica escolhida para formação destes pró-fármacos poliméricos foi, primeiramente, a síntese de monômeros acrílicos e metacrílicos da oxamniquina (Rota A). Dentre os grupos funcionais da oxamniquina foi escolhida a hidroxila para reação de esterificação com ácidos acrílico e metacrílico e respectivos cloretos de ácido. Dessarte, são obtidos os respectivos monômeros, que serão empregados na obtenção dos polímeros.

Para a formação dos derivados acrílicos e metacrílicos da oxamniquina foram utilizados os cloretos dos ácidos acrílico e metacrílico. O uso de cloretos de ácidos diretamente com a oxamniquina mostrou ser método pouco eficiente, pois apresentou baixos rendimentos e dificuldades de purificação e manipulação. Pela análise de ressonância magnética nuclear, cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna foi possível observar que parte do material de partida não reagiu e que houve a formação de subprodutos com características físico-químicas muito similares entre si, o que dificultou ainda mais sua identificação e separação. Em algumas reações não houve a formação do derivado vinílico. Supõe-se que os problemas encontrados são devidos à alta reatividade e à facilidade de hidrólise dos cloretos de ácido. As reações foram processadas em meio anidro, em ambiente de argônio, mas mesmo assim não foram obtidos resultados adequados. Outro problema é que o uso de cloretos de ácido promove a formação de ácido clorídrico. Este, pode influenciar no sentido que o equilíbrio de reação fique deslocado para o lado dos reagentes, ou seja, hidrolisando o éster formado. Acredita-se que o próprio fármaco possa

captar o ácido formado, visto que ele apresenta grupos amino livres. Em algumas reações utilizou-se trietilamina com a finalidade de reagir com o ácido clorídrico formado. Problemas relacionados com a separação limitaram a obtenção do produto.

Apesar de a oxamniquina apresentar três nucleófilos em sua molécula, por considerações estereo-eletrônicas esperava-se que a reação ocorresse somente no nucleófilo de oxigênio. De fato, a hidroxila apresenta-se bem mais livre estericamente que os dois grupos amino. Segundo estudos de relação estrutura-atividade (Patrick, 2001), a amina do anel heterocíclico, sofre influência do grupo nitro vizinho, apresentando menor caráter nucleofílico. A amina da cadeia lateral, apesar de ser mais nucleofílica, está ligada a uma isopropila, deixando o ambiente estericamente impedido. Tendo em vista os resultados obtidos, e contrariamente ao que foi exposto, a reação não foi seletiva para a hidroxila. Diante disto, tentaram-se outras condições de reação, pela diminuição da temperatura. Mesmo assim, houve a formação de misturas complexas de difícil separação. A presença destes nucleófilos pode ter sido fator importante no insucesso das reações. Em virtude destes problemas, pensou-se em realizar a proteção dos grupos amino da oxamniquina deixando livre a hidroxila. *A priori*, foi realizada a hidroclicação, ou seja a formação de sal de amônio. Esperava-se, por esta reação, hidroclicar as duas aminas, tanto alifática como heterocíclica.

Pelo espectro 7 de RMN ^1H foi possível observar que a formação do cloridrato ocorreu apenas na amina alifática (reação a seguir), o que reflete dados da literatura (El-Hamouly *et al*, 1988) onde a acetilação ocorre preferencialmente na cadeia alifática em relação à heterocíclica.



Segundo o espectro, não houve alteração no padrão de acoplamento dos prótons vizinhos à amina heterocíclica (especialmente os prótons H-2), e na região entre 9,15 a 8,89 ppm aparecem apenas dois prótons típicos de sal de amônio, quando o esperado é um total de quatro prótons (visualização pela integral). Embora a reação não tenha se processado como esperado, houve a formação de sal de amônio no grupo amino alifático. Para saber se realmente a oxamniquina foi hidrociorada, procedeu-se ensaio de solubilidade em água. A oxamniquina é praticamente insolúvel em meio aquoso, já o produto obtido (cloridrato de oxamniquina) é muito solúvel, confirmando a formação de sal. A partir do composto protegido procedeu-se a reação com os cloretos de ácidos. Esperava-se pronta ligação com os cloretos de ácido, contudo não houve formação do composto desejado.

Como segunda tentativa de proteção dos grupos amínicos foi realizado método descrito na literatura (Carrol, 1974), que consiste na acetilação tanto de grupos hidroxilas como os grupos amino de determinada molécula e posterior hidrólise seletiva da ligação éster. Embora houvesse dúvidas se a reação se processaria nos três nucleófilos do fármaco, as condições de reação favoreceram a obtenção do produto desejado. A reação mostrou ser método promissor e apresentou rendimento de 68%. Pelos espectros 8 e 9 de RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente, pôde-se comprovar, primeiramente, a formação do composto triacetilado. A estreita faixa obtida na determinação do ponto de fusão (133-136 °C) demonstra pureza do produto. Foram feitos também ensaios de solubilidade do produto em diversos solventes e em duas temperaturas, com o intuito de avaliar-se o melhor agente para recristalização. Os solventes isopropanol e etanol foram os que apresentaram melhores resultados. No espectro 8 de RMN ^1H , há a revelação de três novos sinais em relação à oxamniquina pura, 2,21, 2,17 e 2,15 ppm. Nota-se também que o sinal dos prótons H-16 foi deslocado para campo mais baixo, 5,48 ppm, sugerindo a formação de ligação do tipo éster. O padrão de acoplamento entre os prótons vizinhos às aminas também foi afetado. Houve abertura dos sinais e a grande maioria foi deslocada para

campo mais baixo do espectro. Pelo espectro 9 de RMN ^{13}C , pôde-se observar a presença de três carbonilas em 170,60, 170,76 e 171,98 ppm e três novas metilas em 20,66, 20,75 e 21,74 ppm, confirmando a triacetilação. Apesar de os impedimentos estéricos observados na oxamniquina, acredita-se que a temperatura e maior concentração do substrato favorecem a maior nucleofilicidade dos grupos amino, simplificando a acilação.

A segunda etapa foi hidrolisar seletivamente o éster, liberando novamente a hidroxila da oxamniquina (Vogel, 1989). A reação mostrou ser eficiente para hidrólise do éster, apresentando rendimento de 51%. Obteve-se pó fino, de coloração alaranjada e ponto de fusão entre 162-167 °C. Foram feitos também ensaios de solubilidade do produto em diversos solventes e duas temperaturas visando encontrar melhor agente para recristalização. Os espectros 10 e 11 de RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente, comprovam a formação do derivado diacetilado, mas o produto ainda encontrava-se impuro. No espectro 10 de RMN ^1H observam-se agora apenas dois sinais em relação ao derivado triacetilado (espectro 8), correspondendo às duas metilas 2,14 e 2,18 ppm. O sinal dos prótons H-16 foi deslocado para campo mais alto 4,93 ppm, sugerindo a quebra da ligação éster com posterior retorno à forma alcóolica. O padrão de acoplamento dos demais prótons mostra-se similar ao derivado triacetilado, evidenciando que as duas amins ainda permanecem protegidas. Pelo espectro 11 de RMN ^{13}C , observou-se a presença de apenas duas carbonilas em 170,45 e 171,9 ppm e o desaparecimento de uma metila, confirmando o composto diacetilado. A reação de esterificação do derivado diacetilado com os cloretos de ácidos também não foi bem sucedida.

Devido aos problemas e dificuldades encontrados com a utilização dos cloretos, fez-se o uso dos ácidos acrílico e metacrílico. Neste caso, melhores resultados foram obtidos. Deve-se ressaltar ainda algumas vantagens dos ácidos em relação aos cloretos, vantagens estas descobertas

durante a realização deste trabalho: (1) facilidade de manuseio; (2) condições brandas de reação; e (3) maior estabilidade. A reação de estenificação direta utilizando DCC como agente ativador das carboxilas dos ácidos e DMAP como catalisador da reação mostrou ser o método mais efetivo. Para este caso, o acompanhamento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada, demonstrando que as reações processam-se rápida e continuamente, em cerca de 3-6 horas. O monômero metacrílico da oxamniquina foi obtido com sucesso. Realizaram-se ensaios de solubilidade com o intuito de obter-se solvente adequado para recristalização. O melhor resultado aconteceu com o isopropanol, mas não se conseguiu a purificação total. O grande problema encontrado nestas reações foi a purificação do produto. É típico das reações com carbodiimidias a formação de subprodutos no meio reacional, que o torna impuro. No caso do DCC, o derivado formado é o DCU. Este DCU, quando formado, precipita-se no meio reacional. Mas vestígios deste composto ainda são encontrados em solução, tornando-se impureza persistente. Para a purificação do monômero metacrílico da oxamniquina, apenas a filtração não foi suficiente. Foi necessária a separação do produto por cromatografia em coluna. Em algumas reações, foi necessária a passagem da amostra pela coluna mais de uma vez. Dos sistemas eluentes testados, o que apresentou melhor resultado foi o acetato de etila/metanol (7:3). A separação e purificação foram completas. A reação de síntese do monômero metacrílico da oxamniquina processou-se eficazmente, obtendo-se após exaustivas purificações, rendimento ótimo de 69%. Os espectros 12, 13 e 14 de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT, respectivamente, mostram a formação do composto esperado e com grau de pureza satisfatório. No primeiro, um singlete em 1,95 ppm, correspondente a metila e outros dois singletos em 6,11 e 5,57 ppm, típicos de prótons vinílicos, são observados. Nota-se também no produto, deslocamento dos prótons do CH_2 (H-16) em relação ao CH_2 (H-16) da oxamniquina (Espectro 1) de 4,69 ppm para 5,37 ppm. Este deslocamento caracteriza a ligação do monômero metacrílico à oxamniquina. Pelo espectro 13 de RMN ^{13}C , observou-se o aparecimento

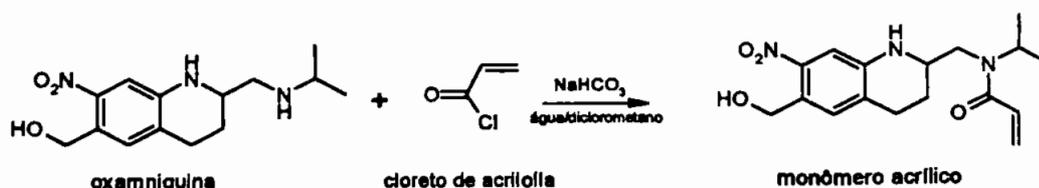
de um sinal em 18,68 ppm, representando a metila vinílica. Em 167,46 ppm, observa-se o aparecimento de uma carbonila, confirmando a ligação éster. Outros métodos analíticos foram realizados, auxiliando a confirmação da estrutura do monômero. Pelos resultados obtidos na análise elementar e na determinação do ponto de fusão, observou-se que o derivado estava puro e dentro das especificações relativas à fórmula molecular. O espectro obtido pela análise no infravermelho (Espectro 14) revela sinal característico para a identificação do tipo de ligação formada. A presença do sinal de carbonila em 1715 cm^{-1} , confirma a formação da ligação do tipo éster. Acrescenta-se ainda o sinal fino em 3589 cm^{-1} , referente ao estiramento NH. A ausência de sinal largo na região acima de 3000 cm^{-1} , demonstra que a hidroxila foi eliminada.

É interessante a observação de que a reação direta entre a oxamniquina e o ácido metacrílico resultou no monômero proposto de forma satisfatória, sem haver a ligação do ácido aos outros nucleófilos. Isto pode ser explicado por considerações estéricas. O DCC é molécula grande e, ao ativar a carbonila do ácido, forma molécula maior ainda. Os dois grupos amina da oxamniquina apresentam problemas estéricos. Já a hidroxila está bem mais livre e com maior mobilidade. Assim, a facilidade com que se liga o conjugado DCC-ácido à hidroxila é muito maior do que em relação às aminas. Comparando-se o ácido acrílico ao metacrílico, outro ponto a ser discutido é que o próprio ácido metacrílico promove impedimento estérico em virtude da metila em alfa. A presença deste grupo torna mais difícil o acesso em posições que estejam estericamente impedidas, como no caso das aminas da oxamniquina. Além destas considerações estéricas, os fatores eletrônicos que regem estas diferenças foram analisados. Para isto e com o objetivo de melhor avaliar a reatividade dos ácidos acrílico e metacrílico, estudo de modelagem molecular, foi realizado e descrito no *Apêndice*. Segundo os dados obtidos, existe diferença de reatividade entre os acrílico e metacrílico. Diferença esta, que pode ter influenciada na obtenção dos produtos desejados. Segundo os dados, o monômero acrílico

apresenta menor reatividade quando comparado ao monômero metacrílico. Isso pode explicar por que apenas o derivado O-metacrilóil foi obtido. Mais detalhes podem ser avaliados no *Apêndice*.

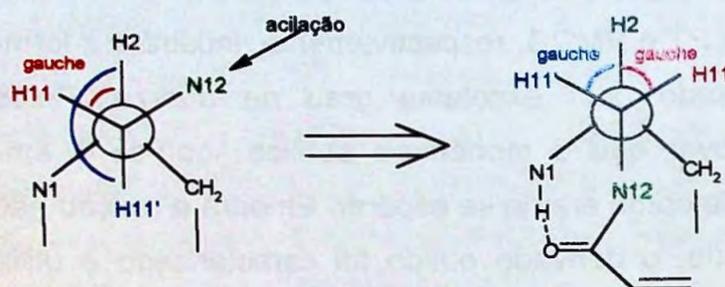
Em relação ao monômero acrílico, esperava-se que as reações de esterificação pelo método direto proceder-se-iam de forma normal e similar àquelas para o ácido metacrílico. Contudo, não foram obtidos resultados convincentes da formação do monômero acrílico da oxamniquina. Tendo em vista os resultados insatisfatórios obtidos com os cloretos de ácido, amplamente discutido anteriormente, quando se fez uso do método de esterificação direta, os resultados ora obtidos foram mais animadores. Em algumas reações houve a formação do monômero acrílico, mas a sua separação e purificação não foram completas. Como no caso dos cloretos, formaram-se compostos com propriedades físico-químicas muito parecidas (por exemplo, um éster e uma amida), o que impossibilitou a separação dos compostos. Em alguns casos, não houve reação entre a oxamniquina e o ácido, o que pôde ser comprovado pela não formação do produto de degradação do DCC, o DCU. Outro problema foi a grande quantidade de impurezas formadas nas reações. Ainda não se conseguiu método eficiente de purificação do derivado acrílico, assim ele não pôde ser caracterizado devidamente.

Após várias tentativas de síntese (tanto pelo método direto, como pelo uso de cloretos de ácido) mal sucedidas, o monômero acrílico da oxamniquina foi obtido segundo técnica relatada por Mank *et al.*, 1988. Ao contrário do que se imaginava, a reação não se processou na hidroxila e sim na amina da cadeia lateral, como pode ser visualizado pela reação a seguir.

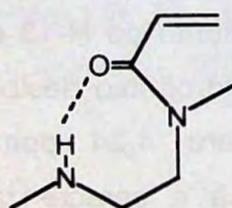


A técnica relatada por Mank *et al.*, 1988 é procedimento bastante conhecido e trata-se de reações por transferência de fase. A técnica foi aplicada à oxamniquina e obteve-se o *N*-acrilóil derivado de oxamniquina (AC-OXA) com bom rendimento (52%) e ótimo grau de pureza, como observado pela estreita faixa de fusão, 109 -110 °C. A purificação do composto foi realizada por cromatografia em coluna utilizando sistema eluente acetato de etila, o que resultou em fácil separação do composto desejado. Realizaram-se ensaios de solubilidade com o intuito de se obter solvente adequado para cristalização. Dentre os solventes ensaiados, o melhor resultado foi conseguido com etanol, mas a solubilidade parcial do composto tornou a recristalização pouco eficiente. Os espectros 15, 16, 17 e 18, de RMN ¹H, ¹³C, DEPT e HMQC, respectivamente, mostram a formação de um composto inesperado com excelente grau de pureza. Pelos espectros pode-se comprovar que o monômero acrílico ligou-se à amina alifática e não à hidroxila como era de se esperar. Embora a reação não tenha ocorrido como esperado, o derivado obtido foi caracterizado e utilizado na obtenção do acrilóil derivado polimérico da oxamniquina. No espectro 15 de RMN ¹H, observam-se três sinais em 6,64 ppm (H-20), 6,36 ppm (H-21) e 5,75 ppm (H-21') correspondendo aos hidrogênios vinílicos. Observa-se também pelo espectro, um deslocamento do H-13 em relação ao mesmo hidrogênio no fármaco protótipo. O hidrogênio deslocou-se de 2,81 ppm, no espectro do fármaco protótipo, para 4,24 ppm no espectro do produto. Este deslocamento evidencia e caracteriza a ligação de um grupo acila no nitrogênio 12 da cadeia lateral. Pelo espectro 16 de RMN ¹³C, observou-se o aparecimento de um sinal em 169,07 representando a carbonila da ligação amídica. O DEPT foi utilizado para definir alguns carbonos da estrutura do monômero. Com esta técnica conseguiu-se diferenciar os carbonos vinílicos C20 e C21, além do carbono 11. Outra dificuldade encontrada na identificação do composto foi em relação aos hidrogênios 11, 11' e 2. Pelo espectro de próton e carbono não foi possível distinguir o hidrogênio 11 do hidrogênio 2. Utilizando-se a técnica de HMQC, observou-se que o hidrogênio 2 (multipeto) estava sobreposto ao hidrogênio 11 (dupeto). Outro

problema solucionado foi em relação ao hidrogênio 11'. Ele apresentava padrão de acoplamento diferente do que era esperado. Esperava-se que o sinal referente a este próton fosse um tripleto, mas o aspecto do sinal e a constante de acoplamento não correspondiam a um tripleto (Duplo duplete). O seu acoplamento estava muito parecido com um dublete, sinal similar ao hidrogênio 11. Acredita-se que com a acilação da amina, ocorreu alteração conformacional na molécula de modo que esta nova conformação tenha ocasionado dois eventos: a) os hidrogênios 11 e 11' que na oxamniquina eram *anti* e *gauche*, no produto, houve uma mudança para *gauche* e *gauche*, respectivamente. Isto pode ser explicado pela projeção de Newman:



b) Esta nova conformação pode ter sido estabilizada pela formação de ligação de hidrogênio entre a amina heterocíclica e a carbonila:



Ligação de hidrogênio

Outros métodos de caracterização ajudaram na confirmação da estrutura do monômero acrílico. Pelos resultados obtidos na análise elementar e na determinação do ponto de fusão, observou-se que o derivado estava puro e dentro das especificações relativas à fórmula molecular. O espectro obtido pela análise espectrofotométrica na região do IV (Espectro 19) revela sinal característico para a identificação do tipo de ligação formada. A presença do sinal em 1640 cm^{-1} revela a deformação da carbonila de amida secundária. Acrescenta-se ainda o sinal fino em 3325

cm^{-1} referente à deformação N-H da amina heterocíclica. A presença de sinal largo em 3386 cm^{-1} e de um sinal fino em 1051 cm^{-1} (C-O de álcool primário), demonstra que a hidroxila ainda está presente confirmando que o tipo ligação ocorrido foi a amídica.

É interessante a observação de que a reação direta da oxamniquina e o ácido metacrílico, resultou no monômero proposto de forma satisfatória, sem ocorrer a ligação do ácido aos outros nucleófilos. Com o monômero acrílico ocorreu o contrário. Ele se liga facilmente à amina alifática, não ocorrendo reação com a hidroxila benzílica. Dois pontos podem ser discutidos acerca desta diferença: 1) a nucleofilicidade da amina é maior do que a da hidroxila, fazendo com que aquele grupo tenha elétrons mais disponíveis para a ligação e; 2) o monômero metacrílico promove impedimento estérico em virtude do grupo metílico. A presença deste grupo torna mais difícil o acesso a outras posições que estejam mais impedidas estericamente, como no caso das duas aminas da oxamniquina. O monômero acrílico possui apenas o hidrogênio como substituinte, grupo pouco volumoso que não promove o impedimento estérico observado em relação à metila. Apesar de a amina ser mais nucleofílica do que a hidroxila benzílica (que ainda possui um grupo nitro em *orto*), o monômero metacrílico não consegue ser atacado por questões estéricas. Com o monômero acrílico é diferente. O composto é bem pequeno e não provoca impedimento estérico. O estudo de modelagem molecular (*Apêndice*) ajudou a esclarecer este fato e juntamente com resultados de densidade eletrônica obtidos com este estudo, corroborou os argumentos aqui mencionados. Apesar de a ligação não ter se processado como desejado, um composto inédito foi formado que possibilitou a obtenção de várias conclusões interessantes.

Outra proposta deste trabalho era sintetizar monômeros e os respectivos derivados poliméricos da oxamniquina com a introdução de unidades espaçantes. A unidade espaçante tem a função de aumentar a distância entre o fármaco e a matriz polimérica, a fim de melhorar a

acessibilidade enzimática e facilitar a liberação do agente terapêutico. Os grupos espaçantes escolhidos foram o ácido aminocaprílico (ACA), o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a glicina (Gly). Todos os aminoácidos escolhidos apresentam grupos funcionais adequados para a síntese orgânica e são compatíveis com o sistema biológico. A escolha destes três aminoácidos foi em função do tamanho da cadeia carbônica de cada um. Isto proporciona uma avaliação acerca de qual espaçante seria mais adequado para a hidrólise enzimática. O GABA também foi escolhido por suas ações inibitórias no sistema nervoso central, o que pode ser útil no caso dos tratamentos dos efeitos adversos do fármaco em estudo.

Em princípio, a síntese do monômero da oxamniquina com espaçante partiu da síntese primordial entre os monômeros acrílico e metacrílico e o grupo espaçante. Isto foi devido às características dos grupos espaçantes. Estes aminoácidos são muito pouco solúveis em solventes orgânicos, restando sua solubilidade apenas em água e em outros solventes polares, como o metanol. A reação direta destes aminoácidos com a oxamniquina é inviável devido a estes problemas de solubilidade. Partindo-se deste preceito e associando o conceito de proteção de grupos funcionais, foi decidido que a reação entre os monômeros acrílico e metacrílico e o aminoácido foi mais viável para aquele momento. O primeiro passo foi encontrar na literatura um meio de como proceder este tipo de reação. Segundo Mank *et al.*, 1988, para se conseguir a reação é necessária a prévia proteção do grupo carboxílico com o objetivo de se evitar o ataque intermolecular dos aminoácidos. A primeira opção foi promover a esterificação do grupo carboxílico dos aminoácidos com álcool metílico, objetivando a proteção daquele grupo. Todos os aminoácidos foram submetidos à esterificação, como pode ser comprovado pelos espectros 20, 21 e 22. A visão do espectro 20 mostra a formação do éster metílico do ACA pelos seguintes sinais: um singlete em 3,59 ppm revela a metila do grupo éster. A amina, agora na forma de cloridrato, revela seus três prótons pelo singlete largo em 8,17 ppm. O éster foi obtido com ótimo rendimento e grau de pureza

satisfatório, o que pode ser comprovado pelo ponto de fusão. O éster metílico do GABA também foi obtido com rendimento ótimo e sua formação foi comprovada por RMN ^1H . Pelo espectro 21 é possível observar a metila em 3,59 ppm e os três prótons da amina em 8,15 ppm. O derivado metilado da glicina também foi obtido com bom rendimento e grau de pureza satisfatório. Pelo espectro 22 é possível observar os três prótons da amina em 8,63 ppm e o singlete da metila em 3,73 ppm. Os três produtos foram identificados e caracterizados apenas por ponto de fusão e RMN ^1H , sem haver a necessidade de métodos mais aprofundados, como por exemplo RMN ^{13}C .

Obtidos os ésteres metílicos dos aminoácidos passou-se para a segunda etapa que é o acoplamento dos monômeros acrílicos e metacrílicos aos derivados recém-obtidos. O método utilizado foi aquele descrito por Mank *et al.*, 1988, em que os derivados são obtidos por transferência de fase. O interessante é que o próprio aminoácido derivado, por ser uma espécie catiônica, ou seja, carregado positivamente, funciona como agente de transferência de fase (Esquema a seguir).

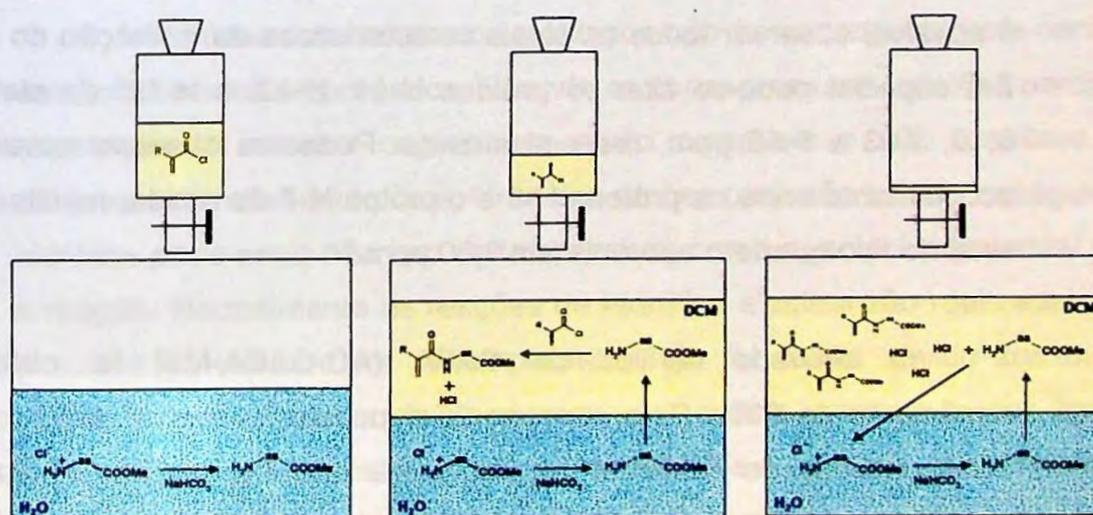


FIGURA 37 – Esquema do mecanismo de transferência de fase.

O aminoácido metilado na forma de cloridrato, quando colocado em solução aquosa de bicarbonato de sódio, é convertido na forma livre. A medida que a solução de cloreto de ácido em diclorometano é gotejada na solução aquosa. O aminoácido na forma livre, mais apolar, tende a passar para a fase orgânica e reage simultaneamente com o cloreto de ácido formando o *N*-acil derivado. Juntamente com a formação do *N*-acil derivado, há a liberação de ácido clorídrico ao meio. Novas moléculas de aminoácido livre vão para a fase orgânica e captam o ácido formado, transformando-se no cloridrato novamente. Este, por ser muito polar, volta para a fase aquosa, reiniciando o ciclo.

O derivado acrílico do ACA (AC-ACA-Me) foi obtido com rendimento de 85% e grau de pureza ótimo (58-59 °C). Pelo espectro 24 é possível observar três pontos de comprovação de estrutura: a) os prótons olefínicos na região de 6,5 a 5,5 ppm; b) um singleto largo em 8,17 ppm, correspondendo ao próton da amida; e c) o sinal em 3,33 ppm, um quarteto, referente ao acoplamento com os dois prótons do carbono vizinho H-5 e um próton do nitrogênio vizinho H-7. O derivado metacrílico do ACA (MA-ACA-Me) também foi obtido com rendimento satisfatório (66%). Pelo espectro 26 é possível observar todos os sinais característicos da formação do produto. Em especial pode-se citar os prótons H-11, H-12' e H-12" da olefina, em 6,10, 5,63 e 5,95 ppm, respectivamente. Podemos observar novamente o acoplamento entre os prótons H-6 e o próton H-7 da amida, resultando num sinal do tipo quarteto aparente em 3,30 ppm.

O derivado acrílico de GABA (AC-GABA-Me) foi obtido com rendimento de 63%. Pelo espectro 25 é possível observar todos os sinais característicos do GABA e alguns sinais que comprovam a ligação do monômero acrílico ao derivado metilado do GABA. O sinal limitante é o quarteto em 3,37 ppm que confirma o acoplamento com o próton H-5 da amida e o próprio sinal da amida, um tripleto em 7,28 ppm. O derivado metacrílico do GABA (MA-GABA-Me) também foi obtido com rendimento

satisfatório (49%). Pelo espectro 27 observam-se os sinais típicos do GABA e aparecem agora os sinais relativos aos prótons H-10", H-10' e H-11 da olefina em 5,69, 5,32 e 1,96 ppm, respectivamente. Mais uma vez, o quarteto em 3,36 ppm é observado comprovando o acoplamento com o hidrogênio H-5 da amida.

O método empregado, para obtenção dos derivados acrililamídicos e metacrililamídicos, foi eficaz para dois dos três aminoácidos: ACA e GABA. Os derivados da glicina não foram obtidos devido à dificuldade de extração deste composto do meio aquoso. Sua característica polar, mesmo após a reação de acoplamento, tornou o isolamento deste derivado difícil e demorado. Os derivados acrililamídicos e metacrililamídicos do éster metílico da glicina não foram obtidos.

Após a obtenção apenas dos derivados acrililamídicos e metacrililamídicos dos aminoácidos ACA e GABA, partiu-se para terceira etapa. Esta consiste de dois passos: 1) promoção da hidrólise do éster dos aminoácidos ou; 2) promoção da transesterificação com a oxamniquina.

A hidrólise dos compostos metilados não foi conseguida para nenhum dos aminoácidos empregados. Quando se conseguia uma hidrólise parcial, a separação da mistura original era muito complexa e não resultava em compostos diretamente puros. Uma das razões para não se ter conseguido a hidrólise pode ser o não uso da temperatura como agente fundamental para a reação. Normalmente as reações de hidrólise alcalina são realizadas com o auxílio da temperatura. A temperatura não foi usada devido aos outros grupos químicos presentes na molécula. A amida, apesar de ser ligação mais estável que o éster, pode sofrer hidrólise também. A temperatura ambiente foi usada pensando em não hidrolisar este grupo funcional. Outro ponto é a dupla ligação. A temperatura alta pode acarretar em iniciação da polimerização deste grupo. Apesar de não se ter agentes químicos iniciadores dentro da solução, o próprio oxigênio, na forma de radical pode

atuar como este tipo de agente químico. A hidrólise não foi conseguida em nenhum dos derivados metilados dos aminoácidos.

Com estes resultados, a segunda alternativa foi promover a transesterificação deste grupo metílico pela hidroxila benzílica da oxamniquina. A transesterificação (Otera, 1993) é uma das reações orgânicas clássicas que possui inúmeras aplicações industriais e usos laboratoriais. Em algumas ocasiões, transesterificação é mais vantajosa que a esterificação entre ácidos carboxílicos e álcool. Por exemplo, alguns ácidos carboxílicos são ligeiramente solúveis em solventes orgânicos e isto torna difícil sua utilização em esterificação homogênea, enquanto ésteres são comumente solúveis na maioria dos solventes orgânicos. Pensando nisso, os derivados acrilamídicos e metacrilamídicos dos ésteres de aminoácidos foram submetidos à transesterificação. Na verdade apenas o derivado acrilamídico do ACA (AC-ACA-Me) foi submetido à transesterificação. Este foi utilizado para se obter técnica padrão que fosse viável para a aplicação aos outros derivados. A primeira tentativa foi a de promover a reação por refluxo dos reagentes à temperatura de 150 °C por 6 horas, segundo método descrito por Bader *et al.*, 1952. A reação não se processou mesmo aumentando a quantidade do componente alcoólico. A reação foi realizada em condições anidras, mas a provável explicação para o insucesso das reações é a baixa reatividade da hidroxila benzílica da oxamniquina. Uma segunda alternativa foi a utilização de catalisador para promover a transesterificação. O DMAP é catalisador bastante utilizado nas sínteses de ésteres e amidas, e foi utilizado nesta reação segundo método descrito por Taber *et al.*, 1985. A reação não se processou eficazmente e o produto não foi obtido. A terceira tentativa foi pelo uso de peneira molecular a fim de capturar o metanol formado a partir da reação de transesterificação. O método descrito por Otera, 1993 em seu artigo parecia ser método bastante efetivo inclusive para álcoois com problemas de reatividade. A reação também não rendeu resultados satisfatórios e mais uma vez acredita-se que seja por problemas de reatividade do fármaco utilizado. Como quarta

tentativa foi utilizada metodologia descrita por Christoffers, Õnal, 2000, a qual relata sobre transesterificação por destilação azeotrópica do componente alcoólico. Na verdade, é método para se tentar deslocar o equilíbrio da reação de transesterificação para a direção dos produtos, conjugando a captura do álcool formado a partir da reação. Várias condições de reação foram testadas para este tipo de metodologia, mas em nenhuma delas se conseguiu obter os derivados da oxamniquina. A última alternativa de transesterificação foi a catálise básica com auxílio de microondas. Segundo Varma, Naicker, 1999, é método simples, eficiente, rápido e de fácil manipulação para a preparação de amidas e ésteres. Várias condições foram testadas, incluindo diferentes potências e tempos de reação. Todas as reações apresentaram subprodutos de reação, provavelmente devido à destruição dos anéis da oxamniquina. Segundo técnicas de CCD, não se observou a formação do produto, apenas misturas complexas e indefinidas de subprodutos. A catálise básica em microondas, para este experimento, não se mostrou método eficiente, além de resultar em misturas complexas de difícil separação.

A transesterificação mostrou ser método ineficiente para este tipo de compostos. A provável dificuldade encontrada foi a reatividade da hidroxila benzílica da oxamniquina. Em virtude do grupo nitro em *orto* exercer significativa influência, aquela hidroxila encontra-se pouco nucleofílica, dificultando as reações. O próximo passo foi tentar sintetizar os derivados acrililamídicos e metacrililamídicos dos aminoácidos na forma ácido-livre. Pensava-se que talvez pela esterificação direta, a reação se processaria mais eficientemente. Após várias pesquisas bibliográficas um método bastante interessante foi encontrado. O método de Schotten-Baumann de acilação com cloretos de acila em meio aquoso alcalino (Drobník *et al.*, 1976). Vários relatos na literatura foram encontrados sobre a eficiência deste método na síntese, em especial, de derivados de aminoácidos (Kopeček, 1977; Rejmanová *et al.*, 1977). A técnica é rápida, simples e requer apenas cuidado com a temperatura, sendo mantida abaixo de - 5 °C. Os derivados

acrilamídicos dos aminoácidos (Espectros 28, 30 e 32) foram obtidos com bons rendimentos, exceto para o derivado de glicina. Pelo espectro 28 de RMN ^1H do derivado AC-ACA-OH, é possível observar os sinais característicos do ACA e os sinais que comprovam a ligação amídica entre o aminoácido e o monômero acrílico. Em 12,01 ppm, observa-se um singlete largo referente ao hidrogênio H-8, confirmando o grupo ácido carboxílico livre. O quarteto em 3,08 ppm, referente aos prótons H-6, confirma a ligação amídica pelo acoplamento destes prótons com o hidrogênio H-7 da amida. O próprio hidrogênio H-7, em 8,05 ppm, mostra o acoplamento com os dois prótons H-6, pois seu sinal é um tripeto. Os prótons olefínicos, na região de 5,5 a 6,5 ppm, confirmam a estrutura acrílica. Pelo espectro 6 de RMN ^{13}C , observa-se a presença de dois sinais na região de 164-174 ppm. Um deles, em 174,59 ppm, referente à carbonila do ácido e outro, em 164,59 ppm, referente à carbonila da amida. Estas duas carbonilas, associadas aos outros sinais de carbono característicos da estrutura do ACA, confirmam a estrutura do derivado AC-ACA-OH.

O derivado MA-ACA-OH também foi obtido com rendimento satisfatório (60%) e grau de pureza ótimo (p.f.: 50-51 °C). Pelo espectro 33 de RMN ^1H , observam-se os sinais típicos do ACA e os da região olefínica. Em 5,63 e 5,31 ppm, estão os prótons H-11" e H-11', respectivamente. Um singlete largo em 12,10 ppm confirma o ácido carboxílico livre. A amida pode ser mais uma vez comprovada pelo quarteto em 3,09 ppm, referente ao próton H-6 e seu acoplamento com o próton H-7 da amida. Este próton H-7, em 7,91 ppm, é um tripeto relativo ao seu acoplamento com os dois prótons H-6. A metila H-12 em 1,85 ppm, também confirma a obtenção do produto metacrilamídico. Pelo espectro 34 de RMN ^{13}C , observam-se os sinais característicos do ACA, além dos sinais que confirmam a estrutura metacrilamídica. Em 174,41 ppm, encontra-se um sinal referente à carbonila do ácido carboxílico e em 167,29 ppm, o sinal da carbonila de amida, que é mais baixo que o do ácido, pode ser observado. O carbono C11 da olefina é

observado em 118,60 ppm, enquanto a metila, apresenta deslocamento de 18,63 ppm.

O próximo composto sintetizado foi o derivado acrilamídico do GABA. O derivado AC-GABA-OH foi obtido com bom rendimento (47%) e sua estrutura foi confirmada pelas análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C . Pelo espectro 30 de RMN ^1H , observam-se os sinais relativos ao GABA e ao grupo acrilóila. Em 12,08 ppm, um singlete largo é encontrado, referente à porção carboxílica livre do derivado. Os prótons olefínicos H-8, H-9" e H-9' são observados em 6,24, 6,07 e 5,57 ppm, respectivamente. O quarteto em 3,14 ppm, referente ao próton H-4, mostra que a amina foi transformada em amida. Isto pode ser confirmado pelo próprio próton H-5, um tripleto, em 8,22 ppm. Pelo espectro 31 de RMN ^{13}C , observam-se os quatro carbonos do GABA, incluindo o carbono (C1) carbonílico do ácido, em 174,28 ppm. O carbono (C7) da carbonila amídica encontra-se em 164,80 ppm. E os carbonos C8 e C9 da olefina podem ser observados em 132,30 e 125,0 ppm, respectivamente.

O derivado MA-GABA-OH foi obtido com rendimento de 29%. Este rendimento baixo é devido ao processo de purificação do derivado metacrilamídico. Uma das impurezas é o éster metílico deste derivado, isto devido ao processo de extração ser realizado com solvente metanol. O meio ácido e temperatura promovem a esterificação do derivado. O método de separação utilizado foi a coluna cromatográfica e o sistema eluente, acetato de etila. O derivado MA-GABA-OH foi separado eficientemente o que pode ser comprovado pelos espectros 35 e 36. Pelo espectro 35 de RMN ^1H , os sinais característicos do GABA são observados. Em adição, encontram-se os sinais dos prótons H-4 e H-5, em 3,06 e 7,89 ppm, respectivamente, que confirmam o derivado metacrilamídico obtido. Os prótons olefínicos H-9" e H-9' também podem ser observados em 5,58 e 5,26 ppm, além da metila em 1,79 ppm. Pelo espectro 36 de RMN ^{13}C , observam-se os quatro carbonos do GABA, incluindo o carbono (C1) da carbonila do ácido em 174,6 ppm. Os

carbonos C8 e C9 também confirmam a porção olefínica, pelos deslocamentos em 140,21 e 119,02 ppm. O carbono (C10) da metila pode ser confirmada pelo sinal presente em 18,85 ppm.

O derivado AC-Gly-OH foi obtido com rendimento 10%. Embora o rendimento tenha sido bastante baixo quando comparado com o dos outros monômeros, a difícil separação entre o produto e a impureza (éster metílico) se deve ao fato da baixa solubilidade do derivado AC-Gly-OH em outros solventes que não o metanol. A separação e purificação foram realizadas em coluna cromatográfica acoplada a bomba de pressão, utilizando sílica flash e metanol como fase móvel. A primeira fração obtida era o derivado éster metílico (AC-Gly-Me) e a segunda fração era o ácido livre (AC-Gly-OH). Analisando o espectro 32 de RMN ^1H , os dados referente à pureza do ácido livre são confirmados. Em 8,57 ppm, um tripleto, relativo ao acoplamento do próton (H-3) com os prótons (H-2) é visualizado. Isto indica que a glicina, anteriormente com grupo amino primário livre, foi transformado na amida derivada. Os sinais relacionados aos prótons olefínicos são percebidos na região de 5,66 a 6,39 ppm, caracterizando a formação do derivado *N*-acilamídico da glicina (AC-Gly-OH). A hidroxila do ácido pode ser observada por sinal largo em aproximadamente 9,1 ppm, indicando que o derivado apresenta-se na forma livre. Dados de RMN ^{13}C não foram coletados.

Com relação ao derivado metacriloilamídico da glicina (MA-Gly-OH), ele apresentou os mesmos problemas relacionados ao derivado AC-Gly-OH. Problemas de extração e o próprio aspecto físico do composto impediram a purificação adequada, resultando em rendimento extremamente baixo, cerca de 8%. Este rendimento foi obtido após purificação em coluna cromatográfica utilizando bomba de pressão e sistema solvente, metanol. Verificando o espectro 37 de RMN ^1H , novamente o composto desejado pode ser identificado pelo tripleto em 8,46 ppm, o que comprova a formação de ligação amídica. Os sinais relativos aos dois prótons olefínicos e à metila podem ser vistos em 5,75 ppm, 5,42 ppm e 1,87 ppm, respectivamente.

Embora não se observe o próton (H-4) da hidroxila do ácido, acredita-se que ela esteja na forma livre, visto que nenhum outro sinal referente à metila de éster, foi visualizado. Espectro de RMN ^{13}C do MA-Gly-OH também não foi adquirido.

O método utilizado para obtenção dos derivados acrilóilamídicos e metacrilóilamídicos foi bastante eficaz e resultou em bons rendimentos, exceto para os derivados de glicina. A próxima etapa foi promover a esterificação destes derivados com o fármaco oxamniquina. Esta etapa foi a limitante para obtenção dos monômeros da oxamniquina.

O derivado AC-ACA-OH foi o único utilizado para as tentativas de obtenção do derivado da oxamniquina. Isto foi feito tendo em vista a sua melhor solubilidade em solventes orgânicos mais apolares e também para estabelecer método de síntese que pudesse ser aplicado aos outros derivados acrilóilamídicos e metacrilóilamídicos dos aminoácidos. A primeira tentativa de se obter o derivado AC-ACA-OXA foi pelo uso de agentes acoplantes como as carbodiimidas (DCC e EDC). Isto porque bons resultados foram conseguidos com o DCC na obtenção do derivado MA-OXA, previamente comentado. O DCC foi utilizado em várias concentrações buscando a melhor condição reacional. Em nenhuma delas o derivado foi conseguido, nem mesmo quando se utilizou método descrito por Khorana, 1999, quando foi formado primeiramente o anidrido do ácido e posterior tentativa de esterificação. A utilização de co-solventes, descrito por Rakowitz *et al.*, 2002, parecia ser método interessante, pois foram utilizados dois solventes, um bastante polar (DMF), e outro com polaridade intermediária (DCM) e em maior proporção. A utilização apenas de DMF não resultou em reações bem sucedidas e é conhecido que o DCM sempre foi solvente adequado para reações de acoplamento, pois diminui o risco de formação de derivados de uréia. Haja visto que o ácido não se solubilizou no DCM, a razão para se usar a DMF era que ela funcionaria como co-solvente para o DCM, solubilizando facilmente o ácido. A utilização deste método não

resultou nos derivados desejados. O EDC foi utilizado visando a diminuição das impurezas formadas quando se utilizava DCC. A uréia derivada do EDC, diferente daquela derivada do DCC, é solúvel em água e não requer várias purificações. Todas as tentativas de acoplamento com EDC também não resultaram nos compostos esperados, mesmo quando a técnica descrita por Rakowitz *et al.*, 2002 foi utilizada.

Outro método proposto foi o uso de resina ácida como catalisador para a reação de esterificação, procedimento típico para estes tipos de reações. Em nenhuma das condições ensaiadas obtiveram-se resultados satisfatórios. Pela CCD, não se observava formação de compostos mais apolares que os próprios materiais de partida. A resina foi previamente tratada, mas acredita-se o tratamento não foi eficaz. E isto pode ser comprovado pela grande quantidade de água recolhida. Este é provável motivo para o insucesso das reações.

Outro método utilizado foi a transformação do ácido carboxílico nos respectivos haletos de ácido, cloreto e brometo. Nas reações para a formação do cloreto de ácido, o reagente utilizado foi o usual cloreto de tionila. As reações não resultaram no derivado proposto AC-ACA-OXA. Pensou-se então em fazer o brometo de ácido do composto em virtude de o bromo ser melhor grupo abandonador que o cloro. A reação também não forneceu resultados convincentes de formação do composto.

Tendo em vista a dificuldade na obtenção dos derivados da oxamniquina, decidiu partir para elaboração de reações clássicas de esterificação, como a esterificação em meio ácido. Ácido sulfúrico foi utilizado como catalisador da reação. Duas metodologias foram empregadas, uma em que os reagentes eram submetidos apenas ao refluxo e outra em que os reagentes eram colocados sob refluxo com destilação azeotrópica de água (Dean Stark), provocando deslocamento do equilíbrio

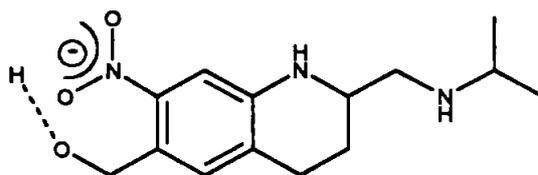
químico da reação. As duas metodologias utilizavam condições bastante drásticas, o que possivelmente inviabilizou a obtenção dos produtos.

Até o momento havia se pensado em como proceder a esterificação sem alterar a estrutura da oxamniquina. Entretanto, com os resultados negativos obtidos nas tentativas de esterificação, a modificação de determinados grupos funcionais da estrutura química do fármaco tornou-se alvo de estudo. A primeira tentativa foi transformar a hidroxila benzílica da oxamniquina em haleto de alquila. Em princípio trabalhou-se com formação de cloreto e logo em seguida utilizou-se o brometo, visto que este é bem mais reativo (melhor grupo abandonador) que o primeiro. A razão para se realizar este tipo de reação foi que na forma de haleto de alquila, o grupo metilênico funcionaria como agente alquilante, atacando os derivados ácidos acrilóilamídicos e metacrilóilamídicos (na forma de carboxilato), resultando em O-alkilação e formando o éster derivado. Como não se conseguiu sintetizar o haleto, a esterificação não foi realizada.

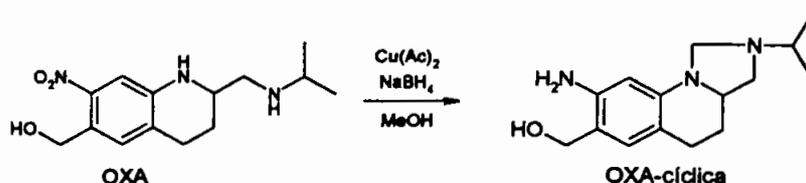
Visando ainda a obtenção de derivados da oxamniquina mais reativos, optou-se pela formação de alcóxidos. Ou seja, transformar a hidroxila em espécie de oxigênio mais nucleofílica e, conseqüentemente, mais reativa. O oxigênio na forma de alcóxido é bastante nucleofílico podendo atacar facilmente a carbonila dos ácidos. Pensando nisso, a oxamniquina foi colocada na presença de espécies altamente reativas, como o sódio e lítio metálicos. Em termos comparativos, o lítio metálico é mais reativo que o sódio. Assim, esperava-se que a reação com o primeiro se processaria mais eficientemente. Ao contrário do que se imaginava, não houve reação com nenhuma das duas espécies, o que foi comprovado pela permanência dos metais em solução. A reação com o hidreto de sódio também não resultou na espécie desejada. A partir destes resultados, surgiram dúvidas a respeito de como o grupo hidroximetilênico poderia estar disposto estérica e eletronicamente, causando a dificuldade de reação.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Todos os métodos utilizados para a obtenção dos derivados da oxamniquina não foram eficientes. Em nenhum deles, a obtenção do derivado foi conseguida. Isto pode ser explicado por fatores eletrônicos relacionados à oxamniquina. 1) O grupo nitro em *orto* promove forte efeito elétron-aceptor, principalmente na hidroxila benzílica, dificultando a disponibilidade eletrônica para o ataque nucleofílico aos compostos carboxílicos; 2) Acredita-se que, além deste efeito elétron-aceptor do grupo nitro, este ainda pode fazer uma ponte intra molecular com o hidrogênio da hidroxila benzílica, e não se disponibilize para reação, diminuindo sua reatividade. Esta hipótese foi avaliada por modelagem molecular e está apresentada no *Apêndice*.



Uma das alternativas para se tentar avaliar a influência do grupo nitro na reatividade da hidroxila é sua redução à função amina. Como o grupo amino tem efeito eletrônico contrário ao do nitro, ou seja, indutivo positivo, aquele grupo pode alterar, de maneira a aumentar, a reatividade da hidroxila benzílica do fármaco. Além disso, a substituição do grupo nitro pelo grupo amino, como foi demonstrado pela modelagem molecular (*Apêndice*), provoca o deslocamento e o afastamento do hidrogênio do grupo hidroximetilênico em relação ao grupo amino. Esta proposta de síntese foi realizada com o intuito de se verificar a influência do grupo nitro na reatividade geral do fármaco. Conhecendo aquela característica, a síntese do derivado da oxamniquina em que o grupo nitro é substituído pelo grupo amina foi proposta. A reação de redução utilizada neste trabalho foi descrita por Cowan, 1986, a qual utilizava acetato de cobre e boridreto de sódio como reagentes. Ao contrário do que se planejava, um composto totalmente inesperado foi obtido a partir desta reação, como visto a seguir.



Segundo os resultados obtidos a partir da análise do composto, aconteceu, o que dentro da modificação molecular pode ser chamado de fechamento de anel. A reação resultou em fechamento de anel na região das aminas, heterocíclica e alifática. O anel formado foi de 5 membros, o que pode ser comprovado pelos espectros 38, 39 e 40. Segundo o espectro 38, nota-se o aparecimento de dois sinais em 4,5 e 3,62 ppm, referentes aos prótons (H-18 e H-18'). O sinal do próton H-18' aparece em campo mais alto pois espacialmente ele está mais próximo à isopropila da cadeia lateral. Isto provoca o efeito de blindagem neste próton, deslocando seu sinal para região que confere maior proteção. O padrão de acoplamento dos outros prótons permanece semelhante ao da oxamniquina, exceto pelo fato que ocorreu deslocamento de alguns prótons para regiões diferentes. O novo carbono metilênico pode ser confirmado pela análise espectro 39, no qual é possível observar o aparecimento de sinal em 69,25 ppm. Este carbono foi identificado com o auxílio do espectro 40. Este espectro mostra a correlação entre o espectro de RMN ^1H e o de RMN ^{13}C . Pelo HETCOR, observa-se que o carbono em 69,25 ppm está correlacionado aos prótons H-18 e H-18'. Estes dados corroborados aos resultados obtidos a partir da análise elementar, comprovam a estrutura do novo derivado. A partir da determinação da faixa de fusão do derivado cíclico (140 a 142 °C) verificou-se que o derivado estava com grau de pureza satisfatório.

Este derivado cíclico, embora tenha sido previamente sintetizado por Barberato *et al*, 2002, foi obtido por uma rota sintética diferente daquela e totalmente inédita. Algumas tentativas de se explicar o mecanismo dessa reação direcionaram o estudo para os derivado de cobre, visto que outros fatores foram avaliados e não resultaram em mudanças significativas. Anteriormente, imaginava-se que o grupo metilênico do anel poderia ter se

originado a partir do solvente utilizado, metanol. O solvente então foi substituído por etanol a fim de verificar se a introdução de mais uma unidade carbônica resultaria em anel maior ou com ramificação. Sem resultados conclusivos, a reação foi realizada em ausência completa de CO₂. Isto foi realizado pensando que o grupo metilênico poderia estar sendo originado a partir de um complexo formado pelo cobre e o gás carbônico proveniente do ar. Esta hipótese também não resultou em dados conclusivos. Segundo as reações realizadas, observou-se que o boroidreto acelerava as reações e que o grupo metilênico entre as amins poderia ser proveniente do sal de cobre. Estudos serão realizados visando a substituição do acetato de cobre por outro sal, proprionato ou butirato, com maior número de carbonos. Isto será realizado visando descobrir o mecanismo de formação do anel. Hipoteticamente, o anel é formado por prévia coordenação do cobre com os nitrogênios da amina e posterior descarboxilação do acetato, formando a ponte metilênica. Este mecanismo merece maior atenção e deverá ser estudo mais profundamente, tendo em vista que é um mecanismo bastante interessante em reações com diaminas.

Segundo Barberato *et al.*, 2002, embora o derivado tenha mostrado potência promissora, a toxicidade (DL₅₀ = 1135 mg/kg) é maior do que a da própria oxamniquina (DL₅₀ = 1300 mg/kg). Estes resultados são indicações que a cadeia lateral pode ser modificada, preservando a atividade, mas estas modificações estão relacionadas com aumento de toxicidade. Isto não descarta a possibilidade que outros anéis introduzidos na cadeia lateral possam resultar em compostos ativos e destituídos de toxicidade. Somente estudo detalhado de relação estrutura-atividade nesta posição da molécula poderá elucidar esta hipótese.

Segundo o objetivo do trabalho, o uso de co-mônômeros como vinipirrolidona e HPMA na tentativa de aumentar a solubilidade dos derivados poliméricos da oxamniquina, pode ser método bastante atrativo. Até o momento somente o HPMA foi sintetizado e caracterizado.

O HPMA, co-mônômero a ser utilizado na obtenção dos derivados poliméricos da oxamniquina foi sintetizado e amplamente caracterizado. HPMA foi obtido com 59 % de rendimento e o ponto de fusão (67-68 °C) confirma a pureza do composto. Pelo espectro 41 de RMN ^1H , o composto é confirmado pela ligação amídica formada. O próton H-5, um tripleto em 6,43 ppm, pode ser observado confirmando a ligação amídica. O próton H-2, relacionado a um carbono quiral, apresenta-se sob a forma de um multipletto em 3,99-3,90 ppm. O hidrogênio H-4 da hidroxila encontra-se em 2,92 ppm, indicando que esta porção está livre. Pela diminuição da temperatura na reação, houve seleção da porção amínica para acilação em relação à alcoólica, isto devido à concomitante diminuição da reatividade dos nucleófilos. Os prótons H-1 são átomos pró-quirais, ou seja, do seu lado existe um centro quiral, e se houver substituição de um dos dois prótons H-1, este carbono se tornará quiral também, induzindo novo centro assimétrico. Por serem prótons pró-quirais, são prótons não equivalentes, apresentando padrão de acoplamento diferente um do outro. Aparecem as nomenclaturas *anti* (180 °) e *gauche* (90 °) referente à posição dos prótons H-1 em relação aos prótons vizinhos. Pelo espectro 41, o próton H-1' que é um multipletto, está em posição *gauche* e apresenta constante de acoplamento pequena (não determinada no espectro). Seu deslocamento químico é 3,52-3,47 ppm. Na verdade esperaríamos que ele fosse um duplo duplo dupletto, mas em virtude de não se conseguir determinar a constante de acoplamento entre ele e o próton da amida (H-5), decidiu-se atribuir este como multipletto. O próton H-1'', que também é um multipletto, está em posição *anti* e seu deslocamento químico é 3,21-3,12 ppm. Os prótons H-8'', H-8' e H-9, que são os prótons da olefina, encontram-se em 5,72, 5,34 e 1,96 ppm, respectivamente, e ajudam a confirmar a estrutura do HPMA. Pelo espectro 42 de RMN ^{13}C , observa-se o carbono (C6) em 168,90 ppm, relativo à carbonila da amida. O carbono (C9) da metila da olefina encontra-se em 18,19 ppm. O carbono assimétrico (C2) apresenta um deslocamento químico em 66,70 ppm, enquanto o carbono (C1) é encontrado em 46,69 ppm. Estes

dados corroborados com os resultados de RMN ^1H comprovam a formação do HPMA.

Apenas o monômero metacrílico da oxamniquina foi submetido à reação de polimerização e o copolímero resultante, o único caracterizado. Foram elaboradas três técnicas para a polimerização dos monômeros. Estas técnicas foram ensaiadas primeiramente com os ácidos acrílico e metacrílico para que pudessem ser estendidas para os derivados monoméricos da oxamniquina. Pelo método utilizando solvente, os polímeros obtidos não foram adequados. Os espectros de ressonância não confirmaram a estrutura polimérica. Quando se utilizou o método sem solvente foram obtidos os ácidos poliacrílico e polimetacrílico, com pequenas impurezas. Entretanto, as reações mostraram-se extremamente violentas e explosivas. Decidiu-se não optar por estas duas técnicas. Outras técnicas foram realizadas, pois dados da literatura revelaram condições mais apropriadas para a polimerização radicalar de monômeros ligados a fármacos (Gallardo *et al.*, 2001; Elvira, Román, 1997). Para tanto, os ácidos acrílico e metacrílico foram submetidos a nova polimerização a fim de adequar-se condições eficientes para a polimerização dos derivados da oxamniquina. As novas condições mostraram-se realmente eficientes. A ausência de oxigênio e a mudança de iniciador resultaram em condições de reação mais suaves e com maior controle. Os polímeros obtidos foram caracterizados apenas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Os espectros 43 e 44 revelam os polímeros formados. O que ajuda a comprovar a formação dos polímeros é a característica dos sinais relacionadas à cadeia polimérica. Por existir extensas cadeias poliméricas, os sinais relativos ao CH_2 , CH_3 e CH são bastante largos, caracterizando o sistema polimérico. Outros métodos, como infravermelho e análise térmica são necessários para melhor elucidação da estrutura polimérica.

Esta última técnica foi aplicada ao monômero metacrílico da oxamniquina, pois sua estrutura foi amplamente caracterizada e seu grau de

pureza apresentou-se satisfatório. Quando tentou-se polimerizar apenas o metacrilato de oxamniquina, os resultados não foram adequados. Acredita-se que por questões estéricas, a polimerização do monômero metacrílico da oxamniquina foi ineficaz. A introdução das unidades monoméricas na cadeia polimérica no decorrer do processo pode ter sido dificultada pelo tamanho da fármaco. Pensando nisto, promoveu-se a copolimerização do metacrilato de oxamniquina com ácido metacrílico. Assim, a reação poderia se processar mais facilmente, pois os monômeros teriam maior liberdade para se acomodarem espacialmente. A reação processou-se como esperado e o copolímero foi obtido com sucesso. Tentou-se realizar a caracterização por ressonância magnética nuclear, mas devido a baixa solubilidade do derivado nos solventes usuais, o método foi abandonado.

Alguns métodos, bastante eficientes, foram utilizados na caracterização do copolímero: análise térmica, espectrofotometria no IV e difração por raios X. A análise térmica mostra-se importante ferramenta na caracterização de diversos tipos de materiais, incluindo polímeros e insumos farmacêuticos. Abrange grupo de técnicas, através das quais uma propriedade física de uma substância e ou seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (Cárdenas *et al.*, 2000). As técnicas termoanalíticas são classificadas de acordo com a propriedade física analisada (Ionashiro, Giolito, 1980).

Na termogravimetria (TG) a massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. A TG é aplicada na resolução de problemas na ciência aplicada, como a caracterização de materiais (fármacos, construção civil) e problemas analíticos nas áreas de química orgânica e inorgânica, polímeros, alimentos, farmacêutica entre outras (Svenson, Nicholls, 2001).

A análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica na qual a diferença de temperatura entre a substância e o material de referência é medida em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. A DTA tem ampla aplicação nas mais diversas áreas do conhecimento, que vão desde a química até a metalurgia.

Sabendo-se da importante ferramenta que é a análise térmica, avaliou-se comportamento térmico da oxamniquina (OXA), ácido polimetacrílico (PMA), ácido poli(metacrílico-co-metacrilato de oxamniquina) (PMOXA) e da mistura física (OXA + PMA). Os resultados obtidos puderam auxiliar na caracterização destes materiais e também na diferenciação entre o pró-fármaco polimérico e a mistura física.

O pró-fármaco polimérico produzido pelo método radicalar foi caracterizado por TG, DTA, espectrofotometria de absorção no IV e difração por Raios X. A fim de se entender melhor as propriedades do pró-fármaco polimérico, o comportamento do homopolímero PMA, da OXA e da mistura física (OXA+PMA) devem ser levados em consideração numa primeira instância.

A FIGURA 17 mostra as curvas TG (a) e DTA (b) do PMA. Analisando-se a curva TG, observa-se boa estabilidade térmica até 200 °C e uma pequena perda de massa inicial referente à água superficial (3,4%). Pela curva DTA, é possível observar que na faixa de temperatura entre 200 e 245 °C, um pico endotérmico correspondendo ao primeiro processo de degradação pode ser observado. Acima de 245 °C, nenhum evento térmico relevante ocorre antes de 422 °C, quando um segundo evento endotérmico, correspondente a degradação do polímero, inicia-se. Os dados de DTA podem ser corroborados pela curva TG, onde observa-se também dois eventos de perda de massa nas faixas de temperatura de 200 a 300 °C e de

300 a 470 °C, com perda de massa de amostra de 19% e 70%, respectivamente.

Como relatado por Ho *et al.*, 1992 e Polacco *et al.*, 2000, o primeiro evento de perda de massa após a liberação de água superficial é, geralmente, interpretado como a liberação de água devido a abertura do grupo anidrido formado entre pares de grupos carboxílicos das unidades monoméricas e também à descarboxilação dos grupos –COOH, em que CO₂ é formado. Na segunda degradação, o polímero se decompõem pela ruptura dos monômeros por cortes abundantes na cadeia polimérica e pela formação de uma pequena percentagem de insaturações. Posteriormente é observado um processo de decomposição lenta de material carbonáceo.

Com relação à oxamniquina (FIGURA 18), a curva DTA mostra estabilidade térmica até 125 °C, quando entre 125 °C e 160 °C, um pico endotérmico em 148,6 °C, correspondente ao ponto de fusão pode ser notado. Um novo evento exotérmico pode ser observado em 276 °C, correspondendo à decomposição do composto. O evento exotérmico está associado, na curva TG, a uma perda de massa de cerca de 40%. Um segundo evento exotérmico acontece na temperatura de cerca de 418 °C e está relacionado, na curva TG, com a perda de 20% de massa. Ainda com relação a curva TG, percebe-se um terceiro evento que corresponde à perda de massa de 32%, relacionado à eliminação de materiais carbonáceos. Os produtos de degradação não foram identificados. Outros estudos são necessários para isolar e caracterizar os produtos de cada etapa de degradação térmica.

A curva TG (FIGURA 19) da mistura física (PMA+OXA – 2:1) mostra eventos característicos das duas substâncias, em especial para o PMA, pois esse apresenta maior proporção na mistura. Sendo assim, a curva TG da mistura física apresenta um somatório dos eventos dos materiais isolados. Através da curva DTA (FIGURA 19), foi possível observar diferenças

significantes, em virtude do método avaliar o calor específico de cada composto. Na temperatura de 147 °C observa-se um pico endotérmico relativo ao ponto de fusão da oxamniquina, enquanto que outros dois eventos endotérmicos são observados em 221 °C e 418 °C, que estão relacionados, respectivamente com a perda de água das ligações anidrido e descarboxilação do PMA, e decomposição do PMA e da OXA.

Investigação na curva TG (FIGURA 20) do PMOXA revela quatro etapas de perda de massa, sendo o primeiro representado por perda de água superficial. Observando-se os eventos de perda de massa apresentados pela curva TG, não é possível fazer grandes distinções entre esta curva e aquela apresentada na FIGURA 19, para a mistura física. O que pode ser diferenciado entre estas análises é que a curva TG do pró-fármaco polimérico apresenta uma cinética de decomposição térmica mais lenta, além de etapas não muito bem definidas. Diferentemente, a curva TG da mistura física mostra eventos bem definidos e uma decomposição similar ao PMA e OXA, isolados. Pela curva DTA (FIGURA 20), pode-se observar diferenças significantes entre a mistura física (FIGURA 19) e o PMOXA. Enquanto que na mistura física observa-se um pico endotérmico em 147 °C, referente ao ponto de fusão da OXA, na curva referente ao PMOXA, nenhum pico é observado nesta região, comprovando a formação de uma nova entidade química.

A formação do pró-fármaco polimérico foi confirmada também pelo auxílio da espectrofotometria de absorção no IV. O espectro 45 revela os sinais da OXA, PMA, PMA+OXA e PMOXA e a TABELA CXXXIII as respectivas atribuições.

Os espectros (a) e (b) representam as substâncias puras, enquanto que os espectros (c) e (d) representam a mistura física e o pró-fármaco polimérico, respectivamente. Analisando-se o espectro (a), observa-se os sinais típicos da oxamniquina em 3324 cm^{-1} (N-H), 3093 cm^{-1} (C-H aromático), 1508 cm^{-1} e 1329 cm^{-1} (NO_2 assimétrico e simétrico) e 1050 cm^{-1}

(C-O álcool primário). No espectro (b), os sinais mais importantes do PMA são 3500 cm^{-1} a 3220 cm^{-1} (OH), 1706 cm^{-1} (estiramento C=O), 1391 cm^{-1} e 948 cm^{-1} (C=O, deformação no plano e fora do plano). No espectro (c) pode-se observar sinais típicos do somatório dos sinais do PMA e da OXA. Os sinais em 3500 cm^{-1} e 3324 cm^{-1} referentes à amina secundária e à hidroxila. Em 1706 cm^{-1} , referente à carbonila e 1525 cm^{-1} e 1343 cm^{-1} observa-se a deformação assimétrica e simétrica do grupo NO_2 , respectivamente. Observa-se ainda, em 1050 cm^{-1} , a deformação C-O de álcool primário. No espectro (d), observa-se sinais típicos dos compostos PMA e OXA, como OH em 3500 cm^{-1} , C=C aromático em 1625 cm^{-1} e NO_2 em 1525 cm^{-1} e 1343 cm^{-1} . Mas a ausência de pico em 1050 cm^{-1} , revela o mascaramento hidroxila da oxamniquina, indicando ligação éster. Sendo assim, a associação dos métodos termoanalíticos com os espectrométricos ajudaram a caracterizar e diferenciar os materiais em estudo.

O grau de substituição do copolímero foi calculado visando-se definir uma dose efetiva para ser empregada nos ensaios biológicos. Para se calcular a quantidade de oxamniquina incorporada ao copolímero elaborou-se uma equação de regressão linear obtida a partir de uma curva de calibração da oxamniquina. É conhecido que o polímero não tem absorção na região do ultravioleta. A oxamniquina possui absorção no ultravioleta devido a suas duplas conjugadas no anel aromático. Isto permite descobrir-se a concentração de oxamniquina incorporada no copolímero.

A dimetilformamida foi o solvente utilizado no ensaio em virtude de ter possibilitado a dissolução satisfatória do copolímero, sem comprometimento na concentração necessária para leitura. O solvente foi utilizado como branco em todas as leituras de absorbância.

Primeiramente foi realizada varredura espectral de uma solução de oxamniquina $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ em DMF, com o objetivo de se verificar o comprimento de onda em que ocorre máxima absorção. O valor encontrado

foi de 270 nm (Espectro 46). Assim, soluções de concentração variando de 1 a 16 $\mu\text{g/mL}$ foram feitas e a partir da leitura das absorvâncias, construiu-se a curva de calibração (FIGURA 21). Os resultados estatísticos (TABELA XCVII) apresentam ótima correlação entre concentração e absorvância, mostrando que o método está validado. Realizou-se a leitura de uma solução do copolímero a 10 $\mu\text{g/mL}$ em DMF, encontrando-se concentração correspondendo a 5,02 $\mu\text{g/mL}$. Pode-se concluir que o grau de substituição do copolímero foi de 50%. Este valor está em concordância com a proporção utilizada para a polimerização do ácido metacrílico e metacrilato de oxamniquina (2:1). Este teste foi importante para se verificar qual a dose efetiva de copolímero deveria ser administrada para a realização dos ensaios biológicos.

Pelos difratogramas de raios X (DRX) (FIGURA 22) foi possível caracterizar a OXA, o PMA, a mistura física e o PMOXA. O DRX da OXA indica cristalinidade para a espécie, enquanto que o PMA apresenta-se amorfo. Analisando-se o difratograma da mistura física nota-se, nitidamente, que este apresenta um somatório das características da OXA e PMA. Porém, no difratograma do pró-fármaco polimérico é possível observar que o mesmo apresenta-se no estado não cristalino, corroborando com os dados de TG/DTA e IV. Estes resultados evidenciam a formação de uma nova entidade química.

Os ensaios biológicos foram realizados no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, utilizando-se a técnica de perfusão de veias mesentéricas e porta e do oograma quantitativo. Após os 45 dias de infecção, avaliou-se a positividade dos camundongos frente à eliminação de ovos nas fezes. A positividade foi avaliada pelo exame direto de fezes. A presença de apenas um ovo de *Schistosoma mansoni*, indica positividade. Os camundongos positivos foram triados e separados dos negativos. Os negativos, por sua vez, foram submetidos a uma segunda avaliação. Aqueles que ainda se encontrassem negativos eram eliminados do experimento.

Após a triagem, os camundongos foram separados em 8 grupos, representando os grupos controle positivo e negativo, veículo, polímero base e derivados monoméricos e polimérico. Vale ressaltar que a dose administrada do copolímero, monômero e polímero base foram a metade da dose efetiva (100 mg/kg) de oxamniquina. Após 10 e 20 dias, os animais foram sacrificados e verificou-se dois aspectos: a) a quantidade de vermes recuperados em relação ao controle positivo e; b) o número de ovos nos diversos estágios de maturidade.

No oograma quantitativo dois aspectos principais indicam a atividade farmacológica: supressão da oviposição e aumento do número de ovos imaturos. O primeiro pode ser conseqüência da morte de ambos os parasitas ou de todos de um mesmo sexo, ou ainda, conseqüência da atividade sobre o sistema reprodutor de machos ou fêmea. O segundo pode indicar ação direta do fármaco sobre os ovos, apresentando assim, algum efeito terapêutico.

Quanto à pesquisa de vermes adultos pela técnica de perfusão de veias, pode-se avaliar se o fármaco teve ação diretamente no verme ou se o aparelho reprodutor foi afetado. Um número alto de vermes associado a pequeno número de ovos indica ação sobre o aparelho reprodutor. Em contraste, pequeno número de vermes e pequeno número de ovos indica que a viabilidade dos vermes foi afetada.

Os ensaios realizados visaram comparar a atividade dos derivados monoméricos e copolimérico a dos grupos controle e ainda avaliar o prolongamento de ação, especialmente do derivado copolimérico. Assim, pode-se dizer a respeito das FIGURAS 23, 24, 25, 26, 29 e 30 que:

- grupos infectados não tratados e tratados com veículos (ácido polimetacrílico e cremofor): não houve supressão de oviposição e nem redução da carga parasitária.

- grupo controle tratado com oxamniquina 100 mg/kg: houve total supressão da oviposição e redução completa da carga parasitária.
- grupos controle tratados com oxamniquina 50 mg/kg:
 - 10 dias** – houve supressão da oviposição e redução parcial da carga parasitária.
 - 20 dias** – ainda persiste a supressão da oviposição, no entanto a carga parasitária teve um discreto aumento, indicando que a dose de 50 mg/kg não é efetiva para eliminação dos vermes e afeta apenas a eliminação de ovos.

As FIGURAS 31 e 32 apresentam os dados de atividade para o monômero acrílico da oxamniquina (monômero A). Observa-se que o perfil de atividade do monômero apresenta-se muito similar ao do grupo tratado com oxamniquina 50 mg/kg. Mesmo após a avaliação de 20 dias, poucas diferenças são notadas quando se compara este derivado com a oxamniquina 50 mg/kg (20 dias). Apenas uma redução discreta na carga parasitária é observada, indicando provável e ligeiro prolongamento de ação. O derivado mostrou atividade, porém pouco efetivo na dose empregada (50 mg/kg). Isto indica efeito parcial do composto.

As FIGURAS 27 e 28 apresentam os dados de atividade para o monômero metacrílico da oxamniquina (monômero B). O perfil de atividade deste composto apresenta-se muito similar ao perfil de atividade do monômero A. A avaliação de 10 e 20 dias possibilitou a visualização de prolongamento discreto de ação, visto que ocorreu redução da carga parasitária de um período para outro. Isto pode ser argumentado também com vista ao perfil da oxamniquina 50 mg/kg (10 e 20 dias). A oxamniquina nesta dose não consegue promover redução da carga parasitária, pelo contrário, observa-se até mesmo um aumento desta carga. Fundamentado nisto, pode-se dizer que tanto o monômero A, quanto o monômero B mostraram perfil de prolongamento de ação, mas que nesta dose de 50 mg/kg, ainda é insuficiente para o tratamento completo dos animais.

As FIGURAS 33 e 34 apresentam os dados de atividade para o copolímero. Pode-se observar que o copolímero apresenta perfil de atividade semelhante ao do controle não tratado, indicando a falta de atividade imediata deste derivado e até mesmo 20 dias após o tratamento. Esta falta de atividade pode ser atribuída a vários fatores: 1) O polímero é uma forma de liberação prolongada e existe a possibilidade de que o fármaco não tenha atingido a dose efetiva no período estudado; um tempo maior seria necessário para avaliar este fator; 2) Problemas de liberação do fármaco da matriz polimérica. Dificuldades de hidrólise enzimática ou química podem ter influenciado na administração (este é possível teste a ser realizado); Possivelmente com a inserção de unidades espaçantes entre o fármaco e a matriz polimérica, este problema possa ser resolvido; 3) Peso molecular extremamente elevado. A massa molecular do copolímero não foi determinada. Uma massa molecular alta pode impedir o englobamento por endocitose; Talvez a determinação da massa molecular do polímero possa ajudar a esclarecer tais problemas. o copolímero não teve atividade após 10 e 20 dias do tratamento. Os monômeros apresentaram perfil de prolongamento de ação, mas na dose empregada, não foram eficientes para tratar os animais.

A FIGURA 35 mostra a atividade de todos os compostos testados frente à carga parasitária. É possível observar que a oxamniquina e ambos os monômeros promoveram redução da carga de vermes, enquanto o copolímero não mostrou qualquer redução.

A FIGURA 36 revela a atividade dos compostos avaliados frente aos ovos de 1º, 2º e 3º estágios. Estes estágios são críticos no que diz respeito à avaliação de atividade, pois redução no número de ovos destes estágios indica possível atividade. Corroborando com os resultados de carga parasitária, os monômeros apresentaram redução no número de ovos nestes estágios, vislumbrando possível atividade. Embora o copolímero tenha

provocado redução do número de ovos, particularmente de 1º e 2º estágios no período de 20 dias, sua ação não foi suficiente para tratar os animais.

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSÕES

1. monômero metacrílico da oxamniquina pode ser obtido pelo método de esterificação direta com grau de pureza satisfatório, como demonstrada pelas diversas análises de caracterização.
2. monômero acrílico foi obtido pela técnica de transferência de fase e sua caracterização foi completa.
3. A técnica de polimerização que utiliza atmosfera inerte e AIBN como iniciador mostrou-se eficaz e os produtos desejados foram obtidos.
4. copolímero, ácido poli(metacrílico-co-metacrilato de oxamniquina), obtido foi caracterizado por análise térmica, espectrofotometria de absorção na região do infravermelho e difração de raios X.
5. O poliacrilato de oxamniquina e o copolímero ácido poli(acrílico-co-monômero acrílico de oxamniquina) não foram obtidos.
6. o copolímero, ácido poli(metacrílico-co-metacrilato de oxamniquina), não teve atividade após 10 e 20 dias do tratamento. Os monômeros apresentaram perfil de prolongamento de ação, mas na dose empregada, não foram eficientes para tratar os animais.
7. A reação de formação de sal de amônio da oxamniquina é método promissor, mas existe a necessidade de estudos mais aprofundados com relação a estrutura do composto formado.
8. Método de acetilação e de hidrólise são desenvolvidos facilmente, com bons rendimentos. A proteção dos grupos amino da oxamniquina parece ser método promissor para a esterificação com os cloretos de ácido. Porém, as condições de reação não foram as ideais.

9. Os derivados acrílamídicos e metacrililamídicos dos aminoácidos foram obtidos com bons rendimentos e pureza satisfatória, exceto para os derivados da glicina.
10. Os derivados da oxamniquina com espaçantes não foram obtidos até o momento. Novos métodos de síntese estão sendo estudados para obtenção dos derivados propostos.
11. A modelagem molecular mostrou ser ferramenta importante para desvendar problemas relacionados à estrutura e reatividade da oxamniquina, bem como elucidar a obtenção dos derivados do fármaco
12. O derivado OXA-cíclica foi obtido com bom rendimento e amplamente caracterizado. O mecanismo de reação ainda está obscuro
13. A oxamniquina apresenta problemas de reatividade devido forte interação entre o hidrogênio do grupo hidroximetilênico e o grupo nitro;
14. A redução do grupo nitro a grupo amínico é método promissor, embora novas técnicas precisem ser exploradas.

5.2 PESPECTIVAS

1. Pretende-se desenvolver método mais eficiente para a esterificação da oxamniquina com os derivados acrílamídicos e metacrilamídicos dos aminoácidos;
2. Proceder a polimerização e copolimerização dos monômeros obtidos, especialmente com o HPMA, agente modulador de solubilidade;

3. Realizar ensaios biológicos para avaliar a atividade dos polímeros e copolímeros com espaçantes, comparando esta atividade com a dos derivados monoméricos e copoliméricos sem espaçantes;
4. Avaliar a atividade dos derivados frente às diferentes distâncias entre o fármaco e a matriz polimérica;
5. Reduzir o grupo nitro e avaliar a possibilidade de reação do novo derivado em comparação com a oxamniquina;
6. Realizar estudo mais aprofundado sobre o mecanismo de formação do derivado cíclico, com a possibilidade de obtenção de outros derivados potencialmente ativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATH, F. G. C., MONTENEGRO, S. M. L., GOMES, Y. M. Vaccines against human parasitic diseases: an overview. *Acta Trop.*, Shannon, v.71, p.237-254, 1998.
- ABDULLA, M. A., HOMBAL, S. M., AL-JUWAISER, A. Detection of *Schistosoma mansoni* in bronchoalveolar lavage fluid: a case report. *Acta Cytol.*, St. Louis, v.45, n.5, p.856-858, 1999.
- AGRAWAL, M. C. Schistosomiasis in India with the possibility of its diagnosis in man (abstract). *Six International Symposium on Schistosomiasis*, Belo Horizonte, p. 19-24, 1997.
- ALGER, H. M., WILLIAMS, D. L. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Shannon, v. 121, p.129-139, 2002.
- ALMEDA, J., CORACHAN, M., SOUSA, A. Schistosomiasis in the republic of São Tomé and Príncipe: human studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.88, p.406-409, 1994.
- ARAÚJO, N., KATZ, N., DIAS, E. P. Susceptibility of chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.29, p.890-894, 1980.
- ARYA, O. P., HART, C. A. *Sexually transmitted infections and AIDS in the tropics*, London: CABI Publishing, 1998. 448p.

* De acordo com a norma NBR 6023 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas e local de publicação dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service

- BADER, A. R., VOGEL, H. A. Transesterification. II. Esters of Strong Organic Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington D.C., v.74, p.3992-3994, 1952.
- BALANT, L. P., DOELKER, E. Metabolic considerations in prodrug design. In: WOLFF, E. ed. *Burguer's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5.ed., John Wiley & Sons, Inc., cap.23, 1995. p.949-977.
- BARBERATO FILHO, S., VELLOSA, S. A. G., SILVA, R. M. da, GARGIONE, C., PINTO, L. S., CHIODELLI, S. G., SILVEIRA, M. A. B., Synthesis and pharmacological evaluation of oxamniquine derivates as potencial schistosomicides. *Inter. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 233, p.35-41, 2002.
- BASCH, P. F. Parasitological review: Intermediate gost specificity in *Schistosoma mansoni*, *Exp. Parasitol.*, Orlando, v.39, p.150-169, 1976.
- BAVIA, M. E., MALONE, J. B., HALE, L., DANTAS, A., MARRONI, L., REIS, R. Use of thermal and vegetation index data from earth observing satellites to evaluate the risk of schistosomiasis in Bahia, Brazil. *Acta Trop.*, Shannon, v.79, p.79-85, 2001.
- BAXTER, C. A. R., RICHARDS, H. C. Schistosomicides. 1. Derivatives of 2-aminomethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline. *J. Med. Chem.*, Washington D.C., v.14, n.11, p.1033-1042, 1971.
- BECKER, H. G. O., BERGER, W., DOMSCHKE, G., IANGHANEL, E., FAUST, J., FISCHER, M., GENTS, F., GEWALD, K., GLUCH, R., MAYER, R., MÜLLER, K., DIETRICH, P., SCHMIDT, H., SCHOLLBERG, K., SCHWETLICK, K., SEILER, E., ZEPPENFELD, G. *Organikum: Quimica Organica Experimental*. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1997. 1053p.

- BECKER, K., GROMER, S., SCHIMER, R. H., MÜLLER, S. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur. J. Biochem.*, Oxford, v.267, p.6118-6125, 2000.
- BERGQUIST, N. R. A concept for the collection, consolidation and presentation of epidemiological data. *Acta Trop.*, Shannon, v.79, p.3-5, 2001.
- BERGQUIST, N. R., AL-SHERBINY, M., BARAKAT, R., OLDS, R. Blueprint for schistosomiasis vaccine development. *Acta Trop.*, Shannon, v.82, p.183-192, 2002.
- BERGQUIST, N. R., COLLEY, D. G. Schistosomiasis vaccines: research to development. *Parasitol. Today*, Oxford, v.4, n.3, p.99-104, 1998.
- BEZERRA, J. C. B., SILVA, I. A., FERREIRA, H. D., FERRI, P. H., SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of brazilian cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, Amsterdam, v.73, p.428-430, 2002.
- BIKALES, N. M., Characterization of polymers, Canada: John Wiley & Sons, Inc. 1971. 264p.
- BOHDANECKÝ, H., BAŽILOVÁ, H. KOPEČEK, J., Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-II. Hydrodynamic properties of dilute solutions. *Eur. Polym. J.*, Oxford, v.10, p.405-410, 1974.
- BOUT, D. T., DESLÉE, D., CAPRON, A. Protection against schistosomiasis produced by cyclosporina A. Apud: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.33, p.185-186, 1984.

- BRINDLEY, P. J. Drug resistance to schistosomicides and other antihelmentics of medical significance. *Acta Trop.*, Shannon, v.56, p.213-231, 1994.
- BROOKER, S. Schistosomes, snails and satellites. *Acta Trop.*, Shannon, v. 82, p. 207-2014, 2002.
- BRUCE, J. I., SOUZA, D.L.C., LIANG, Y. S., COLES, G. C. Drug resistance in schistosomiasis: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.82, n.4, p. 143-150, 1987.
- BUNDGAARD, H., *Design of prodrugs*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V, 1985. 360p.
- BUTTERWORTH, A. E., DAVIDSON, R. N Schistosomiasis CD-ROM. *Parasitol. Today*, Oxford, v.15, n.9, 1999.
- CAPRON, A. Schistosomiasis: forty years' war on the worm. *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, n.10, 1998.
- CÁRDENAS, G., MUÑOZ, C., CARBACHO, H. Thermal properties and TGA-FTIR studies of polyacrylic and polymethacrylic acid doped with metal cluster. *Eur. Polym. J.*, Oxford, v.36, p.1091-1099, 2000.
- CAREY, F. A., *Organic Chemistry*, 4.ed., Boston: McGraw-Hill, 2000. 1081p.
- CARROLL, F. I., BLACKWELL, J. T. Optical isomers of aryl-2-piperidylmethanol antimalarial agents. Preparation, optical purity and absolute stereochemistry. *J. Med. Chem.*, Washington D.C., v. 17, n. 2, 1974.

- CARVALHO, S. A., SHIKANAI-YASUDA, M. A., AMATO NETO, V. *et al* Neurotoxicidade do oxamniquine no tratamento da infecção humana pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.27, n.3, p.132-142, 1985.
- CHANDRA, R., RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.*, Oxford, v.23, p.1273-1335,1998.
- CHAPPELL, L.H., THOMSON, A. W. Studies on the action of cyclosporin A against *Schistosoma mansoni* and other parasitic infections. *Transplant. Proc.*, New York, v.20, p.291-297, 1988.
- CHATTERJEE, S., MBAYE, A., De MAN, J. G., Van MARCK, E. A. E. Does the neuropeptide somatostatin have therapeutic potential against schistosomiasis? *Trends Parasitol.*, Oxford, v.18, n.7, 2002.
- CHITSULO, L., ENGELS, D., MONTRESOR, A. *et al* The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.*, Shannon, v.77, p.41-45, 2000.
- CHRISTOFFERS, J., ÖNAL, N., Azeotropic transesterification of β -keto esters. *Eur. J. Org. Chem.*, Weinheim, p. 1627-1635, 2000.
- CHRISTOPHERSSON, J. B. The successful use of antimony in bilharziosis. Administered as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). Apud: *Lancet ii.*, London, p.325-327, 1918. Apud: CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present...and future? *Pharmac. Ther.*, Great Britan, v.68, n.1, p.35-85, 1995.
- CHUNG, M., C., FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos, *Química Nova*, São Paulo, v.22, n.1, p.75-84, 1999.

- CIOLI, D., Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, n.10, p.418-422, 1998.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., ARCHER, S. Resistance of schistosomes to hycanthone and oxamniquine. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.84, n.1, p. 38-45, 1989.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., ARCHER, S. *Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. *Exp. Parasitol.*, Orlando, v.45, n. 4, p. 425-32, 1992.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present...and future?. *Pharmac. Ther.*, Great Britan, v.68, n.1, p.35-85, 1995.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., ROSENBERG, S., ARCHER, S. Evidence for the mode of antischistosomal action of hycanthone. *Life Sci.*, Nagua, v.37, p.161-167, 1985.
- COELHO, P.M.Z., RIBEIRO, F., MELLO, R. T. Activity of oxamniquine at skin, pulmonary and sexual maturationphases, on a *Schistosoma mansoni* strain (R1) previously reported as resitant at the adult phase. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.93, suppl. 1, p.267-268, 1998.
- COELHO, P.M.Z., SILVA, F. C. L., NOGUEIRA, M. J. A. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolated from patient submitted to repeated treatments. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.39, n.2, p.101-6, 1997.

- CONCEIÇÃO, M. J., ARGENTO, C. A., CORRÊA, A. Study of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with failures of treatment with oxamniquine. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 93, n.3, p.375-380, 2000.
- CONNORS, K. A. *A textbook of pharmaceutical analysis*. 5.ed. Boston: McGraw-Hill, 1985. 509p.
- COOK, G. C. Antihelminthic agents: some recent development and their clinical application. *Postgrad. Med. J.*, London., v.67, n.783, p.16-22, 1991.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R., CALDAS, I. R., GAZZINELLI, G. Natural versus drug induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol. Today*, Oxford, v.16, n.9, p.397-399, 2000.
- COULTER, J. B. S. Global importance of parasitic disease. *Curr. Paediatrics*. Shannon, v.12, p.523-533, 2002.
- COURA, J.R. Control of schistosomiasis in Brazil: perspectives and proposals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.90, p.257-260, 1995.
- COWAN, J. A. $\text{Cu}^{2+}/\text{BH}_4^-$ reduction system: synthetic utility and mode of action. *Tetrahedron Lett.*, Oxford, v.27, n.10, p.1205-1208, 1986.
- CRAVER, C. D., PROVDER, T., *Polymer characterization*. Advances in Chemistry Series 227. Washington D.C.: American Chemical Society, 1990. 512p.
- CROMPTON, D. W. T. How much human helminthiasis is there in the world? *J. Parasitol.*, v.85, p.397-403, 1999. *Apud*: HIRST, S. I., STAPLEY, L. A. parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitol. Today*, Oxford, v. 16, n.1, 2000.

- DA'DARA, A. A., SKELLY, P. J., WANG, M., HARN, D. A., Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. *Vaccine*, Oxford, v. 20, p.359-369, 2001.
- DANSO-APPIAH, A., DE VLAS, S. J. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. *Trends Parasitol.*, Oxford, v.18, n.3, p.125-129, 2002.
- DAVARAN, S., ENTEZAMI, A.A. Acrylic type polymers containing ibuprofen and indomethacin with difunctional spacer group: synthesis and hydrolysis. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v.47, p.41-49, 1997.
- DEELDER, A. M., QIAN, Z. L., KREMSNER, P.G., *et al* Quantitative diagnosis of *schistosoma* infections by measurement of circulating antigens in serum and urine. Apud: *Trop. Geogr. Med.*, Belgium, v.46, p.233-238, 1994.
- DIAS, L. C. S., PEDRO, R. J., REGO, E. Linhagem humana de *S. mansoni* resistente a esquistossomicidas. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.72, p.110, 1978.
- DISCH, J., KATZ, N., SILVA, Y. P., VIANA, L. G., ANDRADE, M. O., RABELLO, A. Factors associated with *Schistosoma mansoni* infection 5 years after selective treatment in a low endemic area in Brazil. *Acta Trop.*, Shannon, v. 81, p.133-142, 2002.
- DOENÇAS infecciosas e parasitárias - Guia de bolso, FUNASA. 1998. Disponível em : [<http://www.fns.gov.br/pub/GBDIP/gbdip00.htm>]. Acesso em: 10/1999.

- DOENHOFF, M. J. A vaccine for schistosomiasis: alternative approaches. *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, n. 3, p.105-109, 1998.
- DOENHOFF, M. J., KIMANI, G., CIOLI, D. Praziquantel and the control of schistosomiasis. *Parasitol. Today*, Oxford, v.16, n.9, p.364-366, 2000.
- DROBNÍK, J., KOPEČEK, J., LABSKÝ, J., REJMANOVÁ, P., EXNER, J., SAUDEK, V., KÁLAL, J. Enzymatic cleavage of side chains of synthetic water-soluble polymers. *Makromol. Chem.*, Neugasse, v.177, p.2833-2848, 1976.
- DUNCAN, R., KOPEČEK, J., Soluble synthetic polymers as potential drug carriers. *Adv. Polym. Sci.*, Berlin, v.57, 51-101, 1984.
- EBERL, M., AL-SHERBINY, M., HAGAN, P., LJUBOJEVIC, S., THOMAS, A. W., WILSON, R. A. A novel and sensitive method to monitor heminth infections by faecal sampling. *Acta Trop.*, Shannon, v.83, p.183-187, 2002.
- EL-HAMOULY, W.; PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. *et al*, Studies on some derivatives of oxamniquine. *J. Med. Chem.*, Washington D.C., v.31, p. 1629-1631, 1988.
- EL-SAYED, H. F., RIZKALLA, N.H., MEHANNA, S., *et al* – Prevalence and epidemiology of *S. mansoni* and *S. haematobium* infection in two areas of Egypt recently reclaimed from the desert. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.52, n.2, p.194-198, 1995.
- ELVIRA, C., GALLARDO, A., ZUNSZAIN, P., SAN ROMAN, J. Vinyl pyrrolidone-methacrylic monomers bearing salicylic acid derivative moieties: copolymerization parameters and microstructure analysis. *Polymer*, Oxford, v.41, p.7303-7309, 2000.

- ELVIRA, C., SAN ROMÁN, J. Synthesis and stereochemistry of isomeric methacrylic polymers derived from 4 and 5-aminosalicylic acids. *Polymer*, Oxford, v.38., n.18, p.4743-4750, 1997.
- ENGELS, D., CHITSULO, L, MONTRESOR, A., SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop.*, Shannon, v.82, p.139-146, 2002,
- ERDMANN, L., UHRICH, K. E. Synthesis and degradation characteristics of salicylic acid-derived poly(anhydride-esters). *Biomaterials*, Oxford, v.21, p.1941-1946, 2000.
- ERNOULD, J. C., SELLIN, B. The impact o the local water development programme on the abundance of the intermediate hosts of schistosomiasis in three villages of the senegal river delta. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Oxon, v.93, n.2, p.135-145, 1999.
- ETRYCH, T., JELÍNKOVÁ, M., RÍHOVÁ, B., ULBRICH, K. New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary *in vitro* and *in vivo* biological properties. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v.73, p.89-102, 2001.
- FALLON, P. G., DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.51, n.1, p.83-88, 1994.
- FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 4.ed. São Paulo:1988, v.1.

- FERREIRA, H. S., COUTINHO, E. M. Should nutrition be considered as a supplementary measure in schistosomiasis control?. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Oxon, v.93, n.5, p.437-447, 1999.
- FIOCRUZ estuda vacina contra esquistossomose. *Pharmacia Brasileira*, Brasília, n.22, p.49, 2000.
- FONTANET, A. L., WOLDEMICHAEL, T. , SAHLU, T., *et al* Epidemiology of HIV and *Schistosoma mansoni* infections among sugar-estate residents in Ethiopia. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Oxon, v.94, n.2, p.145-155, 2000.
- FORSTER, R. A review of clinical experience with oxamniquine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.81, p.55-59, 1987.
- FOSTER, J. M. Effect of insect-growth disrupting amines and amides on *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.82, p.340-343, 1996.
- FOWLER, R., LEE, C., KEYSTONE, J. S. The role of corticosteroids in the treatment of cerebral schistosomiasis caused by *S. mansoni* – case report and discussion, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.61, n.1, p.47-50, 1999.
- FRIIS, G. J., BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSE, P., LILJEFORS, T., MADSEN, U. *A textbook of drug design and development*. 2. ed. Denmark: Hardwood Academic Publisher, 1996. p.352-385.
- FRITSCHÉ, T. R., SMITH, J. W. Parasitologia médica In: HENRY, J. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 19.ed., São Paulo: Editora Manole Ltda., 1998. cap.53, p. 1289-1296.

- GALLARDO, A., FERNÁNDEZ, F., CIFUENTES, A., DÍEZ-MASA, J. C., BERMEJO, P., REBUelta, M., LÓPEZ-BRAVO, A., SAN ROMÁN, J. Modulated release of cyclosporine from soluble vinyl pyrrolidone-hydroxyethyl methacrylate copolymer hydrogels. A correlation of *in vitro* and *in vivo* experiments. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v.72, p.1-11, 2001.
- GALLARDO, A., SAN ROMÁN, J., Synthesis and characterization of a new poly(methacrylamide) bearing side groups of biomedical interest, *Polymer*, Oxford, v.34, p.394-400, 1993.
- GIBBONS, A. Researchers fret over neglect of 600 million patients. *Science*, Washington D.C., v.256, p.1135, 1992.
- GIBODA, M., BERGQUIST, N. R., Post-transmission schistosomiasis. *Parasitol. Today*, Oxford, v.15, n.8, 1999.
- GUIA DE VIGILÂNCIA epidemiológica - Esquistossomíase, FUNASA. 1998. Disponível em :[<http://www.fns.gov.br/pub/GVE/GVE001D.htm>]. Acesso em: 10/1999.
- GUITTI, J. C. S., GORDAN, L. N., BALDY, J. L.. S. Arritmia cardíaca com uso de oxamniquine oral no tratamento de esquistossomose mansônica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.35, n.6, p.585-587, 1993.
- GUYATT, H. The cost of delivering and sustaining a control programme for schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Acta Trop.*, Shannon, v.86, p.267-274, 2003.
- HAGAN, P., EL MELEIGY, M., TRAORE, M. Schistosomiasis research: the end of the beginning, *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, n.10, p.392-394, 1998.

- HARDY, M. J., Pharmaceutical applications of thermal analysis. *Thermochimica Acta*, Amsterdam, p.180-197, 1990.
- HASSNER, A., ALEXANIAN, V. Direct room temperature esterification of carboxylic acids, *Tetrahedron Lett.*, Oxford, v.46, p. 4475-4478, 1978.
- HO, B. C., LEE, Y. D., CHIN, W. K. Thermal degradation of polymethacrylic acid. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, New York, v.30, p.2389-2397, 1992.
- HOSTE, K., SCHACHT, E., SEYMOUR, L. New derivatives of polyglutamic acid as drug carrier systems. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v.64, p.53-61, 2000.
- IONASHIRO, M., GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. *Cerâmica*, São Paulo, v. 26, n. 121, p.17-24, 1980.
- ISMAIL, M., BOTROS, S. , METWALLY, A. *et al* Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.60, n.6, p.932-935, 1999.
- JAMES, S., COLLEY, D. Schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, London, v.8, p.351-355, 1995.
- JIANG, H. L., ZHU, K. J. Synthesis, characterization and *in vitro* degradation of a new family of alternate poly(ester-anhydrides) based on aliphatic and aromatic diacids. *Biomaterials*, Oxford, v.22, p.211-218, 2001.
- JOHNSON, P., LLOYD-JONES, J. P. *Drug delivery system: fundamentals and techniques*. England: Ellis Horwood LTDA, 1987. p. 95-120.

- JORDAN, P. From Katayama to the Dakla Oasis: the beginning of epidemiology and control of bilharzia. *Acta Trop.*, Shannon, v.77, p.9-40, 2000.
- JUNKER, J., ECKARDT, L., HUSSTEDT, I. Cervical intramedullar schistosomiasis as a rare cause of acute tetraparesis. *Clin. Neurol. Neurosurgery*, Baltimore, v.103, p.39-42, 2001.
- KALCIC', I., ZORC, B., BUTULA, I. Macromolecular prodrugs., *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.136, p.31-36. 1996.
- KARANJA, D. M. S., COLLEY, D. G., NAHLEN, B. L., *et al* Studies on schistosomiasis in western Kenya: I. Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus coinfections, Apud: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.56, p.515-521, 1997.
- KARANJA, D. M. S., HIGHTOWER, A. W., COLLEY, D. G., MWINZI, P. N. M., GALIL, K., ANDOVE, J., SECOR, W. E. Resistance to reinfection with *Schistosoma mansoni* in occupationally exposed adults and effect of HIV-1 co-infection on suscetibility to schistosomiasis: a longitudinal study. *The Lancet*, CIDADE, v.360, p.592-596, 2002. Disponível em: <http://image.thelancet.com/extras/01art8103web.pdf>. Acesso em: 10/2002.
- KASSAI, T. *et al.*, Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAd). *Rev. Parasitol.* v.29, p.299-326. Apud: ECKERT, J. Parasitology nomenclature – a recommendation. *Trends Parasitol.*, Oxford, v.17, n.1, 2001.
- KATCHALSKY, A., EISENBERG, H. Molecular weigth of polyacrylic and polymethacrylic acid. *J. Polym. Sci.*, New York, v.6, n.2, p.145-154, 1950.

- KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para esquistossomose mansoni, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.32, n.6, p.705-711, 1999.
- KATZ, N. Schistosomiasis control in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.93, suppl. 1, p.33-35, 1998.
- KAYE, B., WOOLHOUSE, N.M. The metabolism of oxamniquine-a new schistosomicide. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Oxon, v. 70, p.323-328, 1976.
- KHORANA, H. G. The chemistry of carbodiimides. *Chem. Rev.*, Washington D.C., v.53, p.145-164, 1953.
- KNIGHT, M., ONGELE, E., LEWIS, F. A., Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, na intermediate host of *S. mansoni*. *Int. J. Parasitol.* Oxford, v.30, p.535-541, 2000.
- KOPEČEK, J. Reactive copolymers of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide with *N*-methacryloylated derivatives of L-Leucine and L-Phenylalanine. Preparation, characterization and reactions with diamines. *Makromol. Chem.*, Neugasse, v.178, p. 2169-2183, 1977.
- KOPEČEK, J., BAŽILOVÁ, H. Poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-I. Radical polymerization and copolymerization. *Eur. Polymer J.*, Oxford, v. 9, p.7-14, 1973.
- KOROLKOVAS, A., SILVEIRA, M. A. B. da Resinatos de agentes esquistossomicidas., *Rev. Farm. Bioquím. Univer. São Paulo*, São Paulo, v.10, n.1, p.113-124, 1972.

KOROLKOVAS, A. Dicionário terapêutico guanabara. Edição 1999/2000. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000, p. 10.17-10.18.

KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*. 2.ed. New York: Wiley Interscience, 1988. p.621-623.

KRAJDEN, S., KEYSTONE, J. S., GLENN, C. Safety and toxicity of oxamniquine in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections, with particular reference to electroencephalographic abnormalities., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.32, n.6, p.1344-1346, 1983.

KRINICK, N. L., SUN, Y., JOYNER, D., *et al*, A polymeric drug delivery system for the simultaneous delivery of drugs activable by enzymes and for light, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, Zeist, v.5, p.303-324, 1994.

KULKARNI, P. V., RAJUR, S. B., ANTICH, P. P., *et al*, Transport studies on macromolecules used as drug carriers, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, New York, v.C30, p.441-490, 1990.

KURSTAK, E. Recent progress in vaccines development and new trends in immunisation. *Vaccine*, Oxford, v.19, p.2198-2200, 2001.

KUSEL, J., HAGAN, P. Praziquantel – its use, cost and possible development of resistance. *Parasitol. Today*, Oxford, v.15, n.9, p.352-354, 1999.

KWATIA, M. A., BOTKIN, D. J., WILLIAMS, D. L. Molecular and enzymatic characterization of *Schistosoma mansoni* thioredoxin peroxidase. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.86, p.908-915, 2000.

LAMBERTUCCI, J. R., RAYES, A. A. M., GERSPACHER-LARA, R. *Salmonella-S. mansoni* association in patients with acquired

- immunodeficiency syndrome, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo [online], 1998. Disponível em: <http://www.fiocruz.org.br/schistAIDS.html>. Acesso em: 10/1999.
- LAMBERTUCCI, J. R., SERUFO, J. C., GERSPACHER-LARA, R. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control, *Acta Trop.*, Shannon, v.77, p.101-109, 2000.
- LEONARDO, L. R., ACOSTA, L. P., OLVEDA, R. M., ALIGUI, G. D. L. Difficulties and strategies in the control of schistosomiasis in the Philippines. *Acta Trop.*, Shannon, v.82, p.295-299, 2002.
- LI, S. *et al.* Studies on prophylatic effect of artesunate on schistosomiasis japonica. *Chin. Med. J.*, Beijing, v.109, p.848-853. 1996.
- LISO, P. A., REBUELTA, M., SAN ROMÁN, J., *et al*, Polymeric drugs derived from ibuprofen with improved antiinflammatory profile. *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, v.32, p.553-560, 1996.
- LLOYD, J., DUNCAN, R., KOPEČEK, J. Synthetic polymers as targetable carriers for drugs. *Pure Appl. Chem.*, New York, v.56, n.10, p.1301-1304, 1984.
- LOUREIRO, S. A questão social na epidemiologia e controle da esquistossomose mansônica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.84, supl.1, p.124-133, 1989.
- LOVERDE, P. T. Do antioxidants play a role in schistosome host-parasite interaction? *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, p.285-289, 1998.
- LUO, X., XIE, M. Sub-nanogram detection of dihydroartemisinin after chemical derivatization with dactylhihydrofluorescein followed by high-

performance liquid chromatography and UV absorption. *Chromatographia*, Wiesbaden, v.23, n.2, p.10-15, 1987.

McGONIGLE, S., DALTON, J. P., JAMES, E. R. Peroxidoxins: a new antioxidant family. *Parasitol. Today*, Oxford, v.14, p.139-145, 1998.

McKERROW, J. H., SALTER, J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. *Trends Parasitol.*, Oxford, v.18, n5, p.193-195, 2002.

McMANUS, D. P. A vaccine against Asian schistosomiasis: the story unfolds. *Inter. J. Parasitol.*, Oxford, v.30, p.265-271, 2000.

McMANUS, D. P. The search for a vaccine against schistosomiasis: a difficult path but an achievable goal, *Immunol. Rev.*, Denmark, v.171, p.149-161, 1999.

MAGNUSSEN, P. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years' experiences. *Acta Trop.*, Shannon, v.86, p.243-254, 2003.

MALONE, J. B., BERGQUIST, N. R., HUH, O. K., BAVIA, M. E., BERNARDI, M., EL BAHY, M. M., FUENTES, M. V., KRISTENSEN, T. K, McCARROLL, J. C., YILMA, J. M., ZHOU, X. N. A global network for the control of snail-borne disease using satellite surveillance and geographic information systems. *Acta Trop.*, Sannon, v.79, p.7-12, 2001.

MANK, R., KALA, H., STRUBE, M. Preparation and testing of polymer drugs. Part 3. Bonding of benzocaine to polyacrylic acid via spacer. *Pharmazie*, Eschborn, v. 43, p.692-693, 1988.

- MARCH, J. *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structures*. 4.ed. United States of America: Wiley-Interscience, 1992. p. 376-438.
- MARKUS, M. B., FINCHAM, J. E. Implications for neonatal HIV/AIDS and TB of sensitization *in utero* to helminths. *Trends Parasitol.*, Oxford, v.17, n.1, 2001.
- MARKUS, M. B., FINCHAM, J. E. Worms and pediatric human immunodeficiency virus infection and tuberculosis. *J. Infec. Dis.*, Chicago, v.181, p.1873, 2000.
- MEI, H., LoVERDE, P. T. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Exp. Parasitol.*, Orlando, v.86, p.69-78, 1997.
- MELO, A. L. de, SILVA-BARCELLOS, N. M., DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. *Inter. J. Pharm.* Amsterdam, v.255, p. 227-230, 2003.
- MENEZES, L. E. Q., SIQUEIRA, R. B., da SILVA, O. L., *et al* Treatment of schistosomiasis. *Rev. Bras. Med.*, São Paulo, v.50, n.3, p.358-387, 1993.
- MERTENS, T. E., BURTEN, A., STONEBURNER, R., *et al* Global estimates and epidemiology of HIV infections and AIDS. *AIDS*, New York, v.8, supl.1, p.S361-S372, 1994.
- MERWE, T. van der, BONESCHANS, B., ZORC, B., BREYTENBACH, J., ZOVKO, M. Macromolecular prodrugs X. Kinetics of fenopropfen release from PHEA-fenopropfen conjugate, *Inter. J. Pharm.*, Amsterdam, v.241, p.223-230, 2002.

- MORRISON, R. T., BOYD, R. N. *Organic chemistry*, 5.ed. New York: Allyn and Bacon, Inc., 1972. 1639p.
- MOSUNJAC, M. B., TADROS, T., BEACH, R., MAJMUDAR, B. Cervical schistosomiasis, human papilloma virus (HPV) and human immunodeficiency virus (HIV): a dangerous coexistence or coincidence? *Gynecol. Oncol.*, Orlando, v. 90, p.211-214, 2003.
- NEISES, V., STEGLICH, W. Esterification of carboxylic acids with dicyclohesilcarbodiimide/4-dimethylaminopyridine: *t*-butyl ethyl fumarate. *Org. Synthesis*, Washington D.C., v.63, p.183, 1985.
- NEVES, D. P., MELO, A. L. de, GENARO, O., *et al Parasitologia humana*. 7.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. p.213-243.
- NOGUSA, H., YANO, T., KASHIMA, N., YAMAMOTO, K., OKUNO, S., HAMANA, H. Structure-activity relationships of carboxymethylpullulan-peptide-doxorubicin conjugates-systematic modification of peptide spacers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Oxford, v.10, p.227-230, 2000.
- ORTIZ, C., VÁSQUEZ, B., SAN ROMÁN, J. Synthesis, characterization and properties of polyacrylic systems derived from vitamin E. *Polymer*, Oxford, v.39, n.17, p.4107-4114, 1998.
- OTERA, J., Transesterification. *Chem. Rev.*, Washington D.C., v. 93, p.1449-1470, 1993.
- OUCHI, T., OHYA, Y. - Macromolecular prodrugs, *Prog. Polym. Sci.*, Oxford, v.20, n.2, p.211-257, 1995.

- PARISE FILHO, R., ARAÚJO, M. B. de, FERNANDES, A. N., SILVEIRA, M. A. B. da Análise químico farmacêutica da oxamniquina e suas especialidades farmacêuticas. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.31, n.1, p.61-72, 2001.
- PARISE FILHO, R., SILVEIRA, M. A. B. da Panorama atual da esquistossomíase no mundo. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.37, n.2, p.123-135, 2001.
- PANCHAGNULA, R., THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *Inter. J. Pharm.*, Amsterdam, v.201, p.131-150, 2000.
- PATEL, H., RAVAL, D.A, MADAMWAR, D., *et al*, Polymeric prodrugs: synthesis, release study and antimicrobial properties of polymer-bound acriflavine, *Angew. Makromol. Chem.*, Weinheim, v.245, p.1-8, 1997.
- PATÓ, J., AZORI, M., TÜDÖS, F., Polymeric prodrugs: 2) Synthesis by coupling of drugs via spacer group, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, Neugasse, v. 4, p.25-28, 1983.
- PATRICK, G. L. An introduction to medicinal chemistry. New York: Oxford university Press, chap.7, 1994, p.104-110.
- PEARCE, E. J. Progress towards a vaccine for schistosomiasis. *Acta Trop.*, Shannon, v. 86, p.309-313, 2003.
- PELLEGRINO, J., FARIA, J. The oogram method for the screening of drugs in schistosomiasis mansoni. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.14, n.3, p.363-69, 1965.

- PELLEGRINO, J., SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, Rio de Janeiro, v.8, p.589-597, 1956.
- PERRIN, D. D., ARMAREGO, W. L. F., PERRIN, D. R. *Purification of laboratory chemicals*. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1980. 568p.
- PHILLIPS, R. *Sources and applications of ultraviolet radiation*. New York, Academic Press, 1983. 384p.
- PICA-MATTOCCIA, L., CIOLI, D. Studies on the mode of action of oxamniquine and related schistosomicidal drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.34, n.1, p.112-118, 1985.
- PILLAI, O., DHANIKULA, A. B., PANCHAGNULA, R. Drug delivery: an odyssey of 100 years. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, Oxford, v.5, p.439-446, 2001.
- POGGENSEE, G., FELDMEIER, H., KRANTZ, I. Schistosomiasis of the female genital tract: public health aspects. *Parasitol. Today*, Oxford, v.15, n.9, 1999.
- RADI, A., BELAL, F. Reaction of electrogenerated oxamniquine radical anion with glutathione. *J. Electroanalytical Chem.*, Shannon, v.441, p.39-42, 1998.
- RAKOWITZ, D., MATUSZCZAK, B., GRITSCH, S., HOFBAUER, P., KRASSINGG, A., COSTANTINO, L. On the prodrug potential of novel aldose reductase inhibitors with diphenylmethyleneaminooxycarboxylic acid structure. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Shannon, v.15, p.11-20, 2002.

- RANNEY, D. F. Biomimetic transport and rational drug delivery. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.59, p.105-114, 2000.
- RAUTIO, J., NEVALAINEN, T., TAIPALE, H. *et al.*, Synthesis and *in vitro* evaluation of novel morpholinyl and methylpiperazinyloxyalkyl prodrugs of 2-(6-methoxy-2-naphthyl)propionic acid (naproxen) for topical drug delivery., *J. Med. Chem.*, Washington D.C., v.43, p.1489-1494, 2000.
- REJMANOVÁ, P., LABSKÝ, J., KOPEČEK, J. Aminolyses of monomeric and polymeric 4-nitrophenyl esters of *N*-methacryloylamino acids. *Makromol. Chem.*, Neugasse, v.178, p.2159-2168, 1977.
- RICHARDS, H.C., FOSTER, R. A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. *Nature*, London, v.222, p.581-582, 1969.
- RICHTER, J. Evolution of schistosomiasis-induced pathology after therapy and interruption of exposure to schistosomes: a review of ultrasonographic studies. *Acta Trop.*, Shannon, v.77, p.111-131, 2000.
- RICHTER, J. The impact of chemotherapy on morbidity due to schistosomiasis. *Acta Trop.*, Shannon, v.86, p.161-183, 2003.
- RÍHOVÁ, B., JELÍNKOVÁ, M., STROHALM, J., SUBR, V., PLOVOVÁ, D., HOVORKA, O., NOVÁK, M., PLUNDROVÁ, D., GERMANO, Y., ULBRICH, K. Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules II. Anti-cancer activity of antibody or (Fab')₂-targeted conjugates and combined therapy with immunomodulators. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v.64, p.241-261, 2000.
- RINGSDORF, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers., *J. Polym. Sci., Polym. Symp.*, New York, v.51, p.135, 1975.

- SAN ROMÁN, J., DARIAS, V., BRAVO, J., *et al* Preliminary pharmacological study of polymeric acrylic derivatives of salicylic and paracetamol, *Pharmazie*, Eschborn, v.47, p.1-3, 1992.
- SAN ROMÁN, J., GALLARDO, A. , LEVENFELD, B. Polymeric drug delivery systems, *Adv. Mater.*, Weinheim, v.7, n.2, p.203-208, 1995.
- SAN ROMÁN, J., MADRUGA, E.L. Polymers with pharmacological activity: synthesis free-radical polimerization of p-methacryoyloxyacetanilide. *Polymer*, Oxford, v.30, n.5, p.949-954, 1989.
- SANDA, F., NAKAMURA, M., ENDO, T. Synthesis and radical polymerization behavior of novel optically active methacrylamides having (L)-leucine structure in the side chains. *J. Polym. Sci. part A: Polym Chem.*, New York, v.36, p.2681-2690, 1998.
- SCHALL, V. T. An interactive perspective of health education for the tropical disease control: the schistosomiasis case. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.93, suppl. 1, p. 51-58, 1998.
- SCHRÖDER, E., MÜLLER, G., ARNDT, K., *Polymer characterization*, New York: Hanser Publishers, 1989. 343p.
- SHEEHAN, J. C., HESS, G. P., A new method of forming peptide bonds., *J. Am. Chem. Soc.*, Washington D.C., v.77, p.1067-1068, 1955.
- SHEKAR, K. C. - Schistosomiasis drug therapy and treatment considerations. *Drugs.*, Auckland, v.42, n.2, p.379-405, 1991.
- SHRINER, R. L. *Identificação sistemática dos compostos orgânicos*. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1983. 490p.

- SHUHUA, X., BINGGUI, S., UTZINGER, J., CHOLLET, J., TANNER, M. Transmission electron microscopic observations on ultrastructural damage in juvenile *Schistosoma mansoni* caused by artemether. *Acta Trop.*, Shannon, v.81, p.53-61, 2002.
- SHUHUA, X. BOOTH, M., TANNER, M. The prophylatic effects of artemether agains *S. japonicum* infections. *Parasitol. Today*, Oxford, v.16, n.3, 2000.
- SHUHUA, X., CATTO, B. A. *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.33, p.1557-1562, 1989.
- SHUHUA, X., CHOLLET, J., WEISS, A. Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Int.*, Shannon, v.49, p.19-24, 2000.
- SHUHUA, X., CHOLLET, J., TANNER, M. Experimental studies on early treatment of schistosomal infection with artemether. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.*, Bangkok, v.26, p.306-318, 1995.
- SHUHUA, X., TANNER, M., N'GORAN, E. K., UTZINGER, J., CHOLLET, J., BERGQUIST, R., MINGGANG, C., JIANG, Z. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. *Acta Trop.*, Shannon, v. 82, p.175-181, 2002.
- SHUHUA, X., UTZINGER, J., CHOLLET, J., ENDRISS, Y., N'GORAN, E. K, TANNER, M. Effect of artemether against *S. haematobium* in experimentally infected hamsters. *Inter. J. Parasitol.*, Oxford, v.30, p.1001-1006, 2000.

- SILVEIRA, M. A. B. da Combate a esquistossomíase., *Rev. Bras. Med.*, São Paulo, v.38, n.11, p.691-699, 1981.
- SILVEIRA, M.A.B. da *Preparação e estudos espectrométricos de polimetacrilamidas de antimaláricos em associação.* São Paulo, 1987. 210p. (Tese de Doutorado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP).
- SILVEIRA, M. A. B. da, KOROLKOVAS, A. Latenciação de agentes esquistossomicidas e antimaláricos., *Rev. Farm. Bioquím. Univer. São Paulo*, São Paulo, v.17, n.1, p.47-59, 1981.
- SILVERSTAIN, R. M., BASSLER, O. C., MORRIL, T. C. *Spectrometry identification of organic compounds*, 6.ed., New York: Wiley & Sons, Inc., 1998.
- SINTOV, A., LEVY, R. J. Polymeric drug deliveru of enzymatically degradable pendant agents: peptidyl-linked procainamide model system studies. *Inter. J. Pharm.*, Amsterdam, v.146, p.55-62, 1997.
- SOANS, B., ABEL, C. Ultrasound appearance of schistosomiasis of the testis. *Australas. Parasitol.*, Richmond, v.43, n.3, p.358-387, 1999.
- SOLOMONS, T. W., *Organic chemistry*. 5.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992. 1198p.
- SOUTHGATE, V. R. Schistosomiasis in the senegal river basin: before and after the construction of the damas at Diama, Senegal and Mantali, Mali and future prospects. *J. Helmitol.*, Wallingford, v.71, p.125-132, 1997.
- SOYEZ, H., SCHACHT, E., VANDERKERDEN, S. The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design. *Adv. Drug Delivery Rev.*, Sharmmen, v.21, n.2, p.81-106, 1996.

- SPARG, S. G., VAN STADEN, J., JÄGER, A. K. Efficiency of traditionally use south african plants against schistosomiasis. *J. Ethnopharmacol.*, Shannon, v.73, p.209-214, 2000.
- STELLA, V. J., CHARMAN, W. N. A., NARINGREKAR, V. H., Prodrugs: do they have advantages in clinical practice?, *Drugs*, Auckland, v.29, p.455-473, 1985.
- STEVENS, M. P. *Polymer chemistry an introduction*. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999. p.167-204.
- STOKVIS, H., BAUER, A. G. C., STUIVER, P. C. *et al* Convulsions after oxamniquine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.81, p.880, 1987.
- STONE, P. J. Potential use of collagen and elastin degradation markers for monitoring liver fibrosis in schistosomiasis. *Acta Trop.*, Shannon, v.77, p.97-99, 2000.
- STROHALM, J., KOPEČEK, J. Poly[N-(2-hydroxipropyl)methacrylamide]. IV. Heterogeneous polymerization. *Angew. Makromol. Chem.*, Weinheim, v.70, p.109-118, 1978.
- SVENSON, J., NICHOLLS, I. A. On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers. *Anal. Chim.*, Amsterdam, v.435, p.19-24, 2001.
- TABER, D. F., AMEDIO, J. C., PATEL, Y. K., Preparation of β -keto esters by 4-DMAP-catalyzed ester exchange. *J. Org. Chem.*, Washington D.C., v. 50, p.3618-3619, 1985.

- TESTA, B. Drug Metabolism. In: WOLFF, M.E. *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. 5.ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. cap.6, p.129-180.
- TRACY, J. W., WEBSTER, L. T. Drugs used in the chemotherapy of helminthiasis In: *Goodman and Gilman: The pharmacological basis of therapy*. 9 ed. 1996, p.1011-1012.
- UTZINGER, J., VOUNATSOU, P., N'GORAN, E. K., TANNER, M., BOOTH, M. Reduction in the prevalence and intensity of hookworm infections after praziquantel treatment for schistosomiasis infection. *Inter. J. Parasitol.*, Oxford, v.32, p.759-765, 2002.
- UTZINGER, J., SHUHUA, X., N'GORAN, E. K., BERGQUIST, R., TANNER, M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. *Inter. J. Parasitol.*, Oxford, v.31, p1549-1562, 2001.
- VAN LIESHOUT, L., POLDERMAN, A. M., DEELDER, A. M. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Trop.*, Shannon, v. 77, p. 69-80, 2000.
- VARMA, R. S., NAICKER, K. P., Solvente-free synthesis of amides from non-enolizable esters and amines using microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.*, Oxford, v.40, p.6177-6180, 1999.
- VOGEL, A. I., *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, 5.ed., London: Longman Scientific and Technical, 1989. 1514p.
- WAINE, G. J., ALARCON, J. B., QIU, C., McMANUS, D. P. Genetic immunization of mice with DNA encoding the 23 kDa transmembrane surface protein of *Schistosoma japonicum* (Sj23) induces antigen-specific

- immunoglobulin G antibodies. *Parasite. Immunol.*, Oxford, v.21, p.3877-381, 1999.
- WERMUTH, C., G., *The practice of medicinal chemistry*, London: Academic Press, 1996. 968 p.
- WILCOX Jr, C. F., WILCOX, M. F. *Experimental organic chemistry: a small-scale approach*. 2 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1995, p.208-263.
- WILLIAM, S., SABRA, A. RAMZY, F., MOUSA, M., DEMERDASH, Z., BENNETT, J. L., DAY, T. A., BOTROS, S. Stability and reproductive fitness of *S. mansoni* isolates with decreased sensitivity to praziquantel. *Inter. J. Parasitol.*, Oxford, v.31, p.1093-1100, 2001.
- WILLIS, C., WILLS, M. *Organic synthesis*. New York: Oxford University Press, v. 31, 1999. p.39-52.
- WYNN, T. A., HOFFMANN, K. F. Defining a schistosomiasis vaccination strategy – is it really TH1 versus Th2? *Parasitol. Today*, Oxford, v.16, n.11, p.497-501, 2000.
- WOOLHOUSE, N. M., Biochemical and pharmacological effects in relation to the mode of action of antischistosomal drugs., *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.28, p.2413-2418.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2003. Disponível em: [<http://www.who.int/ctd/schisto>]
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) *Division of control of tropical disease - schistosomiasis control*. Annual report 1998a. Disponível em: [<http://www.who.int>]. Acesso em: 09/1999.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) *Schistosomiasis. Bull. W. H. O.*, Geneva, v.76, suppl.2, p. 150-151, 1998b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) *The control of schistosomiasis.* Geneva, 1993, p.1-85. [Technical Report Series, n.830].
- YANG, W., JACKSON, D. C., ZENG, Q., MCMANUS, D. P. Multiple-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. *Vaccine*, Oxford, v. 19, p.103-113, 2000.
- YAZDANBAKHSI, M., DEELDER, A. M. Advances in schistosomiasis research. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, London, v.11, p.542-546, 1998.
- YEVICH, J. P. Drug development: from discovery to marketing. In: KROGSGAARD-LARSEN, P., LILJEFORS, T., MADSEN, U. *A textbook of drug design and development.* 2. ed. Denmark: Hardwood Academic Publisher, 1996. p.508-523.
- YODER, M., TRUANT, A. L., HARRIS, J., RAO, K. Rare presentation of *S. mansoni* in an HIV-positive man from Puerto Rico. *Clin. Microbiol. Newsletter*, Milan, v.22, p.165-167, 2000.
- YUANQING, Y., SHUHUA, X., TANNER, M., UTZINGER, J., CHOLLET, J., JIADONG, W., JIAN, G. Histopathological changes in juvenile *S. haematobium* harboured in hamsters treated with artemether, *Acta Trop.*, Shannon, v.79, p.135-141, 2001.
- YUE, W-j., YU, S-h., XU, X-j Failure to induce resistance of *Schistosoma japonicum* to praziquantel. Apud: *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, Bangkok, v21, p.85-89, 1990.

- YURA, H., YOSHMURA, N., HAMASHIMA, T. *et al* Development of a macromolecular prodrug of FK506: I. synthesis of FK506-Dextran conjugate. *Transplant. Proc.*, New York, v. 30, p. 3598-3599, 1998.
- ZACCHIGNA, M., DI LUCA, G., MAURICH, V., BOCCÚ, E. Syntheses, chemical and enzymatic stability of new poly(ethylene glycol)-acyclovir prodrugs, *Il Farmaco*, Lausanne, v.57, p.207-214, 2002.
- ZHANG, W., WONG, C. M. Evaluation of the 1992-1999 world bank schistosomiasis control project in China. *Acta Trop.*, Shannon, v.85, p.303-313, 2003.
- ZHANG, Y., TAYLOR, M. J., JOHANSEN, M. V., BICKLE, Q. D. Vaccination of mice with a cocktail DNA vaccine induces a Th1-type immune response and partial protection against *Schistosoma japonicum* infection. *Vaccine*, Oxford, v. 20, p.724-730, 2001.
- ZHU, Y., HE, W. LIANG, Y. XU, M., YU, C., HUA, W., CHAO, G. Development of a rapid, simple dipstick dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.266, p.1-5, 266, 2002.
- ZORC, B., BUTULA, I. Macromolecular prodrugs. III. Esters of fenoprofen and probenecid. *Acta Pharm.*, Zagreb, v.44, p.103-108, 1994.

APÊNDICE

ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR VISANDO ELUCIDAR A REATIVIDADE DA OXAMNIQUINA E OBTENÇÃO DOS DERIVADOS PROPOSTOS

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A oxamniquina (OXA) mostrou ser estrutura bastante estável frente às reações de acilação. Embora alguns derivados tenham sido obtidos, outras reações não foram bem sucedidas, como comprovado experimentalmente. Surpreendente foi o fato de que a OXA reage facilmente com o ácido metacrílico (MA) para formação do *O*-metacrilóil derivado (MA-OXA), e não reage com o ácido acrílico (AC) e demais monômeros (AC-Aca-OH, MA-Aca-OH), para formação dos respectivos ésteres derivados. Acreditava-se que as dificuldades encontradas nas reações envolvendo a oxamniquina eram devidas aos efeitos eletrônicos causados pelo grupo nitro orientado na posição *orto* em relação ao grupo hidroximetilênico. Associada a este fato, a formação do *N*-acrilóil derivado de OXA, mas não do *N*-metacrilóil também se tomou objeto de estudo. Este último não foi obtido, provavelmente devido a problemas de natureza estérica relacionados ao grupo isopropila da molécula da OXA e ao grupo metila do MA. Dessarte, optou-se por realizar estudo de modelagem molecular com o intuito de melhor elucidar a reatividade da oxamniquina e também a obtenção dos derivados propostos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Programa SPARTAN'02 versão 119 (demonstrativa) para Linux da Wavefunction Inc. Irvine, CA, 2003.

Métodos

OXAMINIQUINA E ANÁLOGOS

A otimização da geometria das estruturas (FIGURA 1) da oxamniquina (OXA), análogos propostos (NH₂-OXA, H-OXA e HOEt-OXA) e análogos simplificados (OXA-Simpl, NH₂-OXA-Simpl, H-OXA-Simpl, HOEt-OXA-Simpl) foi realizada utilizando método semi-empírico AM1.

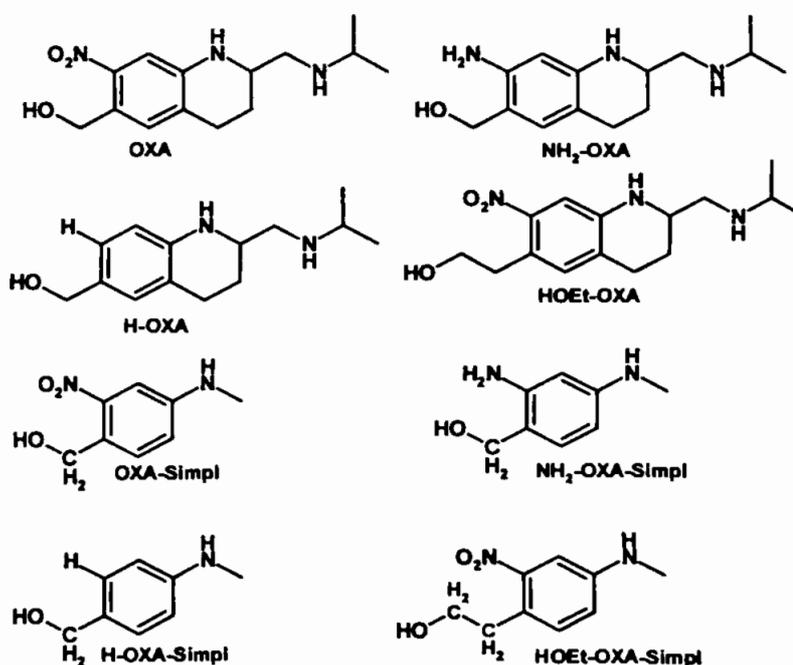


FIGURA 1 – Estruturas da oxamniquina (OXA), análogos propostos (NH₂-OXA, H-OXA e HOEt-OXA) e análogos simplificados (OXA-Simpl, NH₂-OXA-Simpl, H-OXA-Simpl, HOEt-OXA-Simpl).

A análise conformacional foi realizada empregando método AM1, segundo análise sistemática em que os diedros selecionados foram avaliados a cada 15°, conforme pode ser visto na FIGURA 2. Dentre os confômeros de energia mínima observados na análise conformacional da cadeia lateral da oxamniquina, escolheu-se aquele cuja conformação estava em concordância com os dados de RMN H¹ (Espectro 1). Analisando este espectro, foi possível observar que, a partir dos dados de acoplamento, a cadeia lateral encontrava-se na posição equatorial em relação ao anel heterocíclico, enquanto o próton (H-2) permanecia na posição axial. Ressalta-se que o confômero escolhido não ultrapassava a faixa de energia de 5 kcal/mol em relação ao confômero de menor energia mínima apontado na análise. A partir daquele confômero realizou-se análise conformacional na região hidroximetilênica da molécula. O confômero de energia mínima então obtido foi empregado como referência para a análise das demais estruturas.

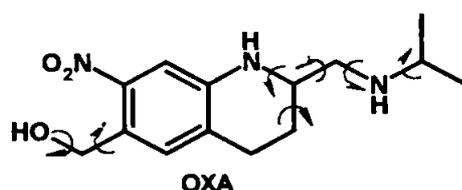


FIGURA 2 – Esquema dos diedros selecionados na OXA para realização da análise conformacional por método AM1. O ângulo de rotação foi de 15°.

Os confômeros de energia mínima de cada composto estudado foram submetidos aos cálculos de determinação de ponto único no método AM1. Para as formas simplificadas empregou-se o método *ab initio* 3-21G*. Foram calculadas as superfícies de mapa de potencial eletrostático (MEPs) sobre a densidade eletrônica total. Neste trabalho, os contornos isoenergéticos de MEPs foram gerados em faixas de energia que serão apresentadas ao longo da discussão e sobrepostos em superfície de densidade eletrônica constante de 0,002 e/au³. As constantes empregadas nos cálculos de superfície são parâmetros padrões do programa SPARTAN.

ÁCIDOS ACRÍLICO E METACRÍLICO

A otimização das geometrias dos ácidos acrílico (AC) e metacrílico (MA) (FIGURA 3) foi realizada empregando-se o método *ab initio* 3-21G*.

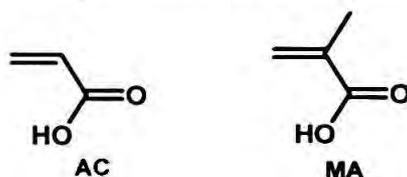


FIGURA 3 – Estruturas do AC e MA.

Análise conformacional das estruturas dos AC e MA foi realizada, por análise sistemática, utilizando método *ab initio* 3-21G*, com rotações de diedro de 15°, conforme ilustrado na FIGURA 4.

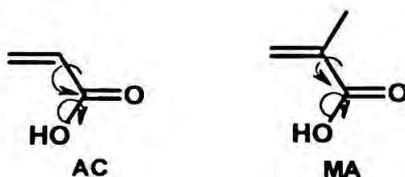


FIGURA 4 – Esquema dos diedros selecionados do AC e MA para realização da análise conformacional por método 3-21G*. O ângulo de rotação foi de 15°.

Os confôrmeros de energia mínima de cada composto estudado foram submetidos aos cálculos de determinação de ponto único no método 3-21G*, quando foram calculadas as superfícies de mapa de potencial eletrostático (MEPs), mapa do orbital de LUMO (orbital molecular desocupado de mais baixa energia) sobre a densidade eletrônica total. Neste trabalho, os contornos isoenergéticos de MEPs foram gerados em faixas de energia que serão apresentadas ao longo da discussão e sobrepostos em superfície de densidade eletrônica constante de 0,002 e/au³. As constantes empregadas nos cálculos de superfície são parâmetros padrões do programa SPARTAN.

DERIVADOS DA OXAMNIQUINA

O produto obtido *N*-acrilamídico de oxamniquina (AC-OXA) e análogo proposto *N*-metacrilamídico de oxamniquina (MA-N-OXA) (FIGURA 5) tiveram a geometria otimizada utilizando método semi-empírico AM1.

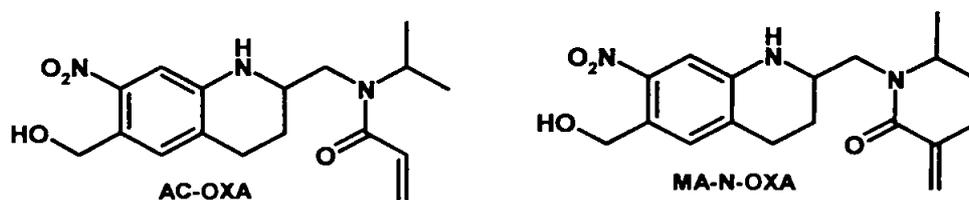


FIGURA 5 – Estruturas do AC-OXA e análogo proposto MA-N-OXA.

Na análise conformacional empregou-se o conformero de energia mínima da OXA e diedros adicionais foram avaliados segundo análise sistemática, também a cada 15° de rotação, conforme apresentado na FIGURA 6.

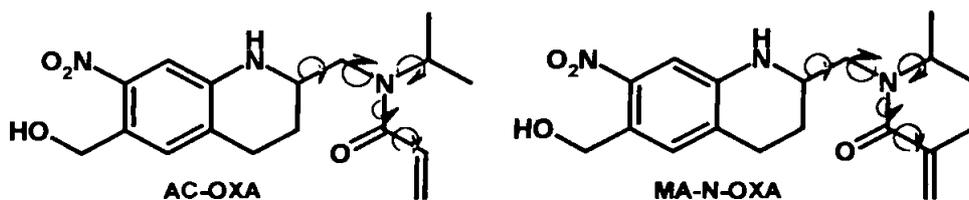


FIGURA 6 – Esquema dos diedros selecionados do MA-N-OXA e AC-OXA para realização da análise conformacional por método AM1. O ângulo de rotação foi de 15°.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

OXAMNIQUINA E ANÁLOGOS

A análise do confômero de energia mínima da OXA (FIGURA 7) mostra a estabilização da hidroxila pelo grupo nitro, provavelmente por formação de ligação de hidrogênio entre o hidrogênio alcoólico e o átomo de oxigênio daquele grupo. Tal estabilização poderia comprometer a reatividade da hidroxila (diminuição da nucleofilicidade), o que explicaria a dificuldade de obtenção dos compostos desejados durante os procedimentos sintéticos.

A fim de melhor avaliar esta hipótese foram propostos os análogos da OXA em que: 1) o grupo nitro foi substituído por um grupo amina (NH_2 -OXA); 2) o grupo nitro foi removido (H-OXA); 3) aumento em uma unidade carbônica da cadeia hidroximetilênica (HOEt-OXA). Na FIGURA 7 são apresentados os confômeros de energia mínima destes análogos. A substituição presente em NH_2 -OXA tem a finalidade de se avaliar o comportamento da hidroxila frente a mudança dos estados eletrônicos na molécula, tendo em vista que o caráter eletrônico é oposto para os dois substituintes. O composto H-OXA foi proposto para verificar a ausência de efeito do grupo nitro. E o composto HOEt-OXA foi construído por homologia procurando-se avaliar a interferência do aumento da cadeia carbônica na interação hidroxila-nitro.

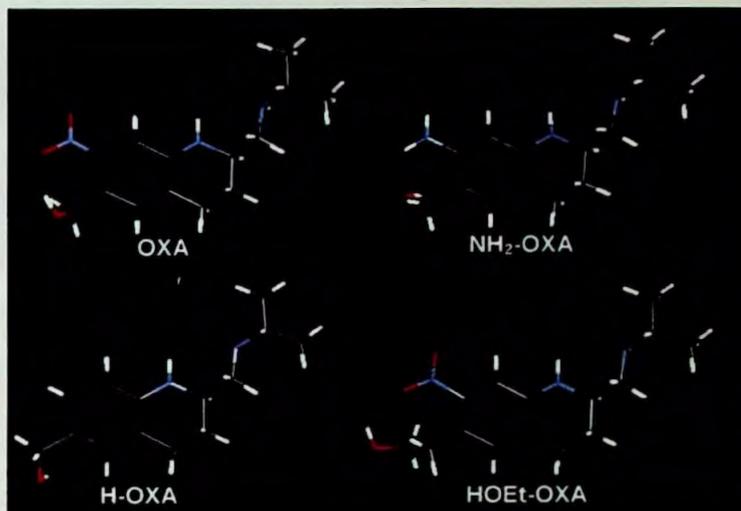


FIGURA 7 – Confôrmeros de energia mínima da OXA e seus análogos, representação no modelo tubo. Átomos nas cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), nitrogênio (azul) e oxigênio (vermelho).

Na FIGURA 8 são apresentadas as faces anterior, lateral e posterior dos confôrmeros de energia mínima da OXA, $\text{NH}_2\text{-OXA}$, H-OXA e HOEt-OXA , representados pelos modelos CPK e tubo, respectivamente. Quando observada a face anterior, o confôrmero da OXA mostra a provável formação de ligação de hidrogênio entre o hidrogênio alcoólico e o átomo de oxigênio do grupo nitro, como mencionado anteriormente. Por esta face não é possível observar a orientação do grupo hidroximetilênico para os análogos $\text{NH}_2\text{-OXA}$ e H-OXA . A observação do HOEt-OXA mostra que, mesmo no homólogo superior, a hidroxila permanece orientada em direção ao grupo nitro, formando provavelmente ligação de hidrogênio, como observado para a OXA.

As visões das faces lateral e posterior dos confôrmeros corroboram a hipótese de formação de ligação de hidrogênio para a OXA e seu homólogo HOEt-OXA , nas quais é possível observar mais facilmente a estabilização entre o hidrogênio alcoólico e o grupo nitro. O confôrmero $\text{NH}_2\text{-OXA}$ mostra que a substituição do grupo nitro pelo grupo amino altera a orientação do grupo hidroximetilênico, tornando a hidroxila mais disponível para ataque nucleofílico. A mesma característica é observada para o confôrmero H-OXA .

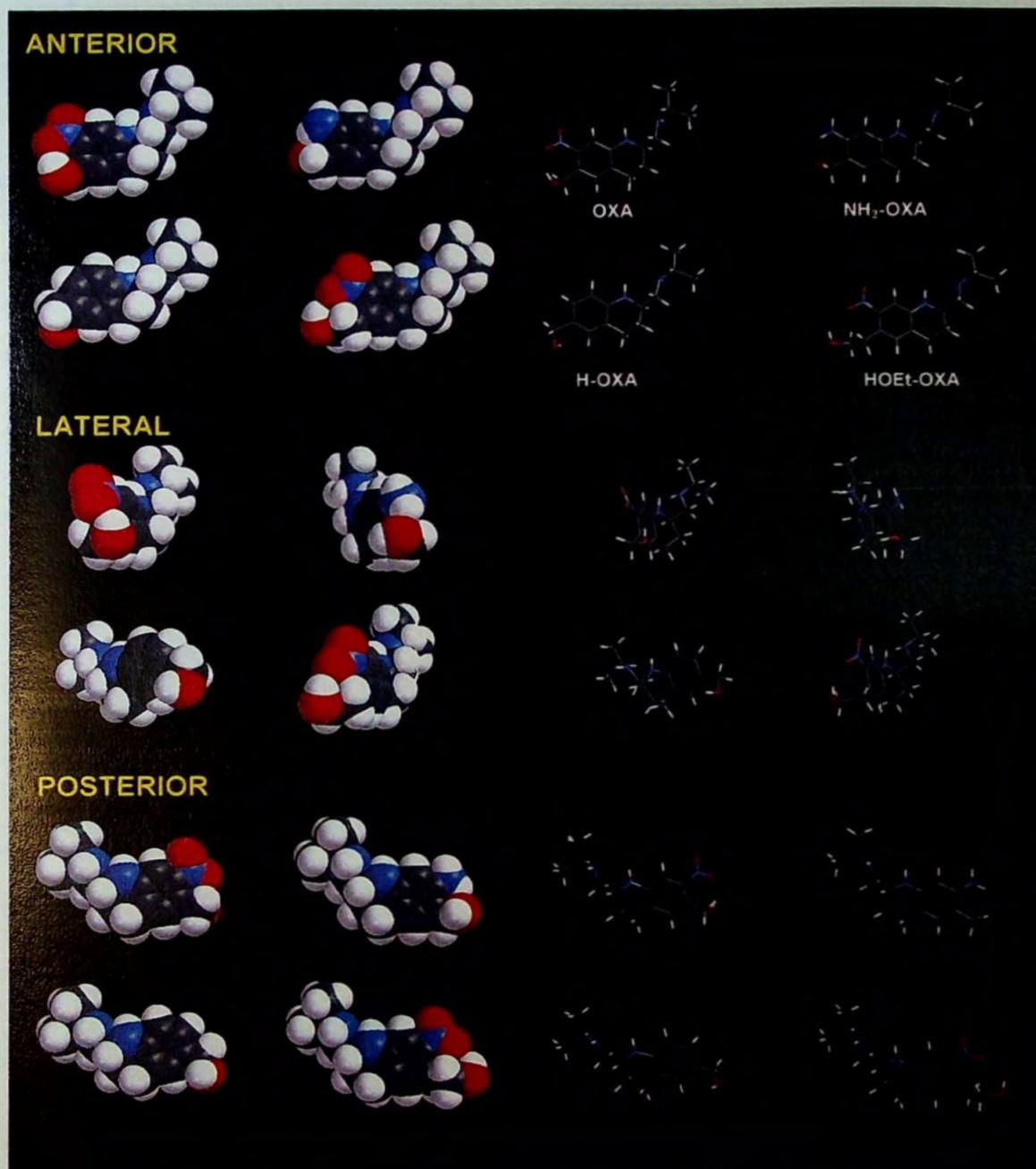


FIGURA 8 - Faces anterior, lateral e posterior dos confôrmeros de energia mínima da OXA, NH₂-OXA, H-OXA e HOEt-OXA, representados sob a mesma orientação pelos modelos CPK (esquerda) e tubo (direita). Átomos nas cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), nitrogênio (azul) e oxigênio (vermelho).

A hipótese da formação da ligação de hidrogênio é fortalecida pela análise dos MEPs (FIGURA 9), nos quais é possível observar diferenças de distribuição de densidade eletrônica próxima à região do hidrogênio alcoólico. Para a OXA e seu homólogo HOEt-OXA, a densidade eletrônica é maior, o que pode ser comprovado pelo decréscimo de intensidade da cor azul (representante da maior deficiência de densidade eletrônica). Em contrapartida, para os análogos NH₂-OXA e H-OXA, a densidade eletrônica é menor, cuja representação é observada por um aumento da intensidade da cor azul. Tais diferenças evidenciam a ocorrência (OXA e HOEt-OXA) ou a ausência (NH₂-OXA e H-OXA) da estabilização do hidrogênio alcoólico pelo grupo nitro.

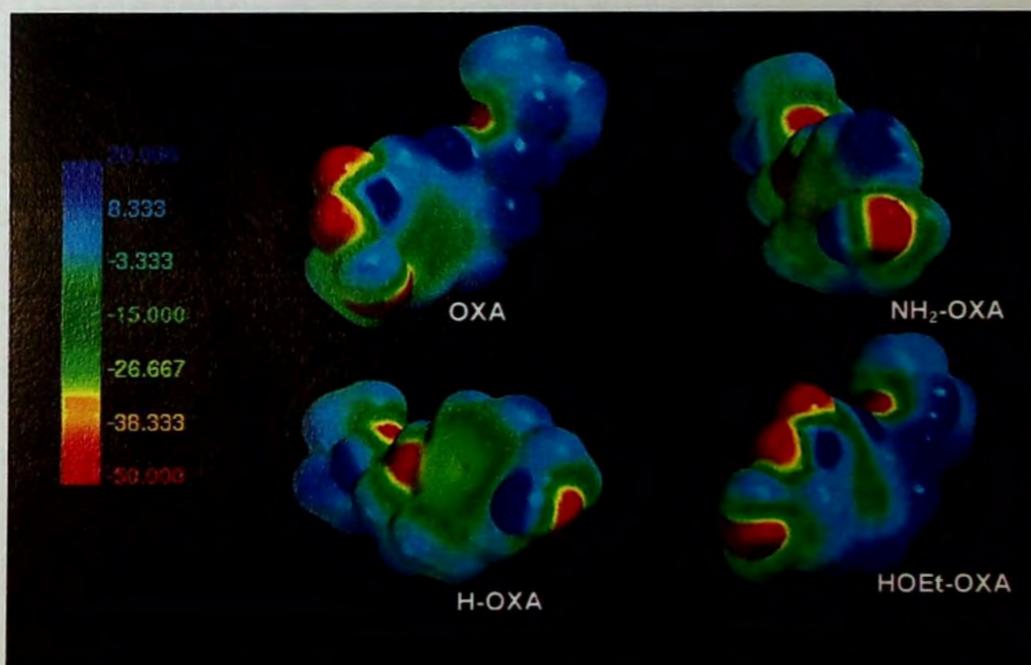


FIGURA 9 – Mapas de potencial eletrostático (MEPs) da OXA, NH₂-OXA, H-OXA e HOEt-OXA sobrepostos em densidade eletrônica total de 0,002 e/au³, calculados por AM1. A distribuição de cores está na faixa de -50 (vermelho escuro) a +20 (azul escuro) kcal/mol.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Afim de melhor avaliar as propriedades eletrônicas da OXA e seus análogos, cálculos de ponto único foram realizados empregando-se o método *ab initio* 3-21G*. Em decorrência de limitações da versão do programa disponível, houve a necessidade de simplificação das estruturas dos confômeros de energia mínima. Como a região hidroximetilênica é a de maior interesse para este estudo, optou-se por remover a cadeia lateral e parte do anel tetraidroquinolínico.

A análise dos MEPs obtidos por método 3-21G* (FIGURA 10) confirma os resultados obtidos por método semi-empírico AM1. Maior densidade eletrônica sobre a região do hidrogênio alcoólico é observada para OXA e seu homólogo HOEt-OXA, representada pela menor intensidade da cor azul. Em razão da mudança de orientação do grupo hidroximetilênico, nos análogos NH₂-OXA e H-OXA, que pode ser melhor visualizado pelo modelo CPK, observa-se menor densidade eletrônica na região do hidrogênio em questão simbolizado graficamente pelo aumento da intensidade da cor azul.

FIGURA 10 - Contornos de energia mínima por métodos semi-empírico de OXA, NH₂-OXA, H-OXA e HOEt-OXA, representados sob o mesmo formato de uma molécula azul (A) e CPK (B). Abaixo dos eixos x, y e z, os valores numéricos, em unidades de a.u., são exibidos. Os valores são: OXA: 0,000000; NH₂-OXA: 0,000000; H-OXA: 0,000000; HOEt-OXA: 0,000000. A distribuição das cores azul na foto de 100 pixels, mostra a diferença entre as moléculas.

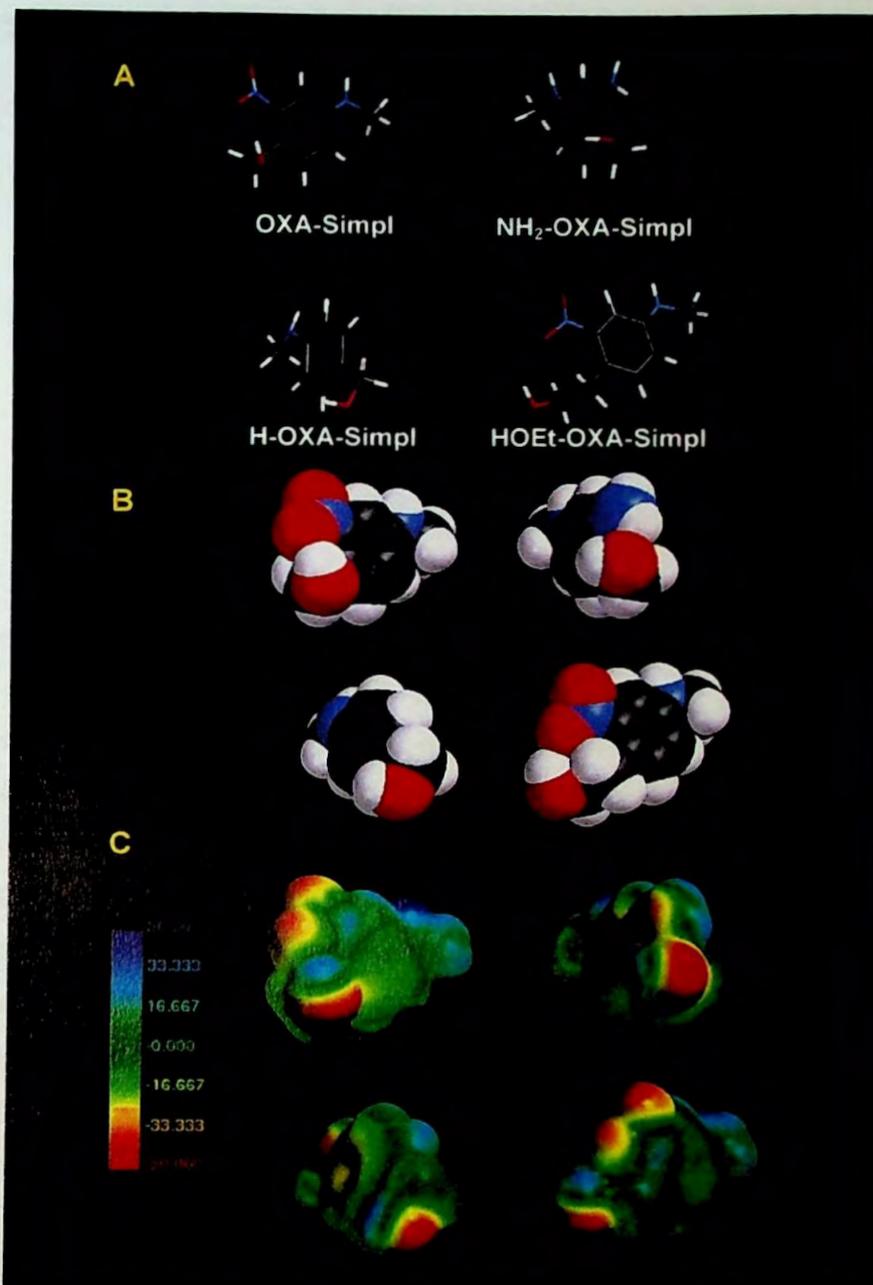


FIGURA 10 - Confôrmeros de energia mínima das estruturas simplificadas da OXA, NH₂-OXA, H-OXA e HOEt-OXA, representados sob a mesma orientação pelos modelos tubo (A) e CPK (B). Átomos nas cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), nitrogênio (azul) e oxigênio (vermelho). Sob a mesma orientação, MEPs (C) calculados por 3-21G* sobrepostos em densidade eletrônica total de 0,002 e/au³. A distribuição das cores está na faixa de -50 (vermelho escuro) a +50 (azul escuro) kcal/mol.

ÁCIDO ACRÍLICO E METACRÍLICO

Os confôrmeros *s-cis* de energia mínima do AC e MA obtidos após análise conformacional por método 3-21G* são apresentados na FIGURA 11.



FIGURA 11 – Confôrmeros *s-cis* de energia mínima do AC e MA no modelo bola-palito. Átomos nas cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco) e oxigênio (vermelho).

Na FIGURA 12, são apresentados os mapas do orbital de LUMO sobre a densidade eletrônica total, dos confôrmeros de energia mínima do AC e MA, nas representações contínua e discreta, nível 6. As áreas em azul representam regiões de menor densidade eletrônica. A visão do mapa contínuo mostra menor densidade eletrônica próxima à região do carbono carbonílico de ambos os confôrmeros. Entretanto, nota-se no confôrmero AC, maior dispersão da cor azul que se distribui desde o carbono carbonílico até os carbonos olefínicos. Esta característica não é observada para o confôrmero MA, cuja cor azul concentra-se sobre a região do carbono carbonílico. Esta observação pode ser confirmada e reforçada pela representação da distribuição eletrônica discreta, em que a cor azul do confôrmero AC espalha-se em maior superfície da molécula enquanto, no confôrmero MA, a cor azul delimita-se à região do carbono carbonílico. Estas diferenças de distribuição do LUMO sobre a densidade eletrônica poderiam explicar a menor reatividade do AC frente ao MA, quando em reação com a OXA. Quando se associam estas diferenças à estabilização do grupo hidroximetilênico pelo grupo nitro, conforme discutido anteriormente, compreende-se a não obtenção do derivado éster acrílico da OXA.

No entanto, em decorrência da maior reatividade do MA, a obtenção do éster metacrílico da OXA (MA-OXA) é favorecida, conforme verificado experimentalmente.

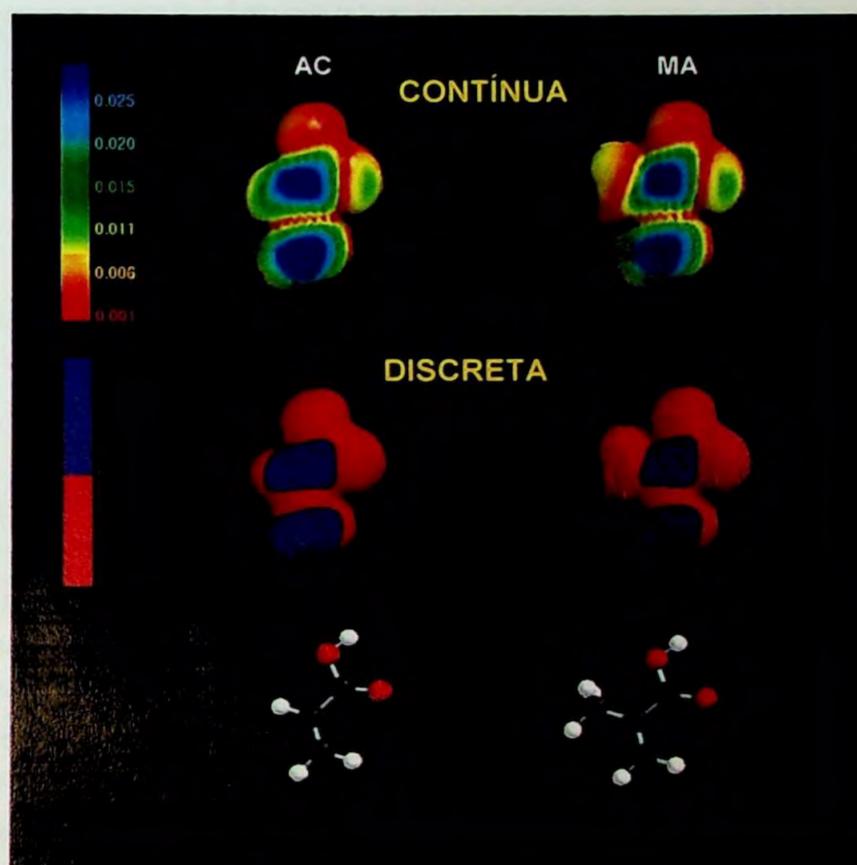


FIGURA 12 – Mapas do orbital de LUMO dos conformêros *s-cis* de energia mínima do AC e MA superpostos sobre a densidade eletrônica total de $0,002 \text{ e/au}^3$, calculados por 3-21G*, nas representações contínua e discreta, nível 6. A distribuição de cores está na faixa de 0,001 (vermelho escuro) a 0,030 (azul escuro) kcal/mol. Representação do modelo bola-canudo em auxílio à visualização. Átomos nas cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco) e oxigênio (vermelho).

A hipótese da maior reatividade para o conformêro MA é confirmada pela análise dos MEPs (FIGURA 13), os quais mostram diferenças na distribuição da densidade eletrônica dos conformêros estudados. A menor densidade

eletrônica (maior intensidade de cor azul) na região do carbono carbonílico do MA, pode ser considerada como fator de maior reatividade deste composto quando comparado ao AC.

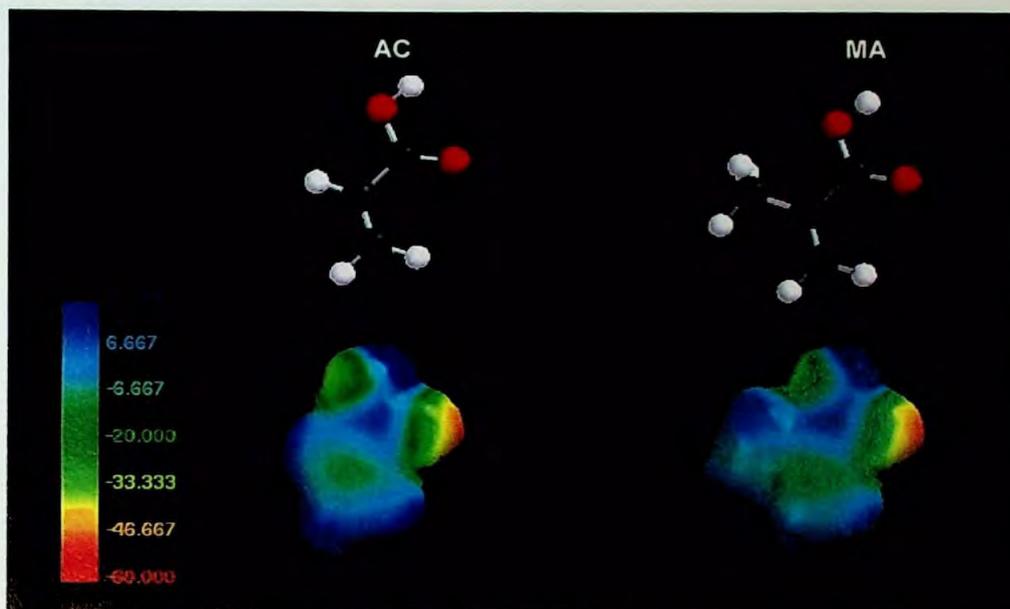


FIGURA 13 – Mapas de potencial eletrostático (MEPs) dos conformeros *s-cis* de energia mínima dos AC e MA superpostos sobre a densidade eletrônica total de $0,002 \text{ e/au}^3$, calculados por $3-21G^*$. A distribuição de cores está na faixa de -60 (vermelho escuro) a $+20$ (azul escuro) kcal/mol. Representação do modelo bola-canudo em auxílio à visualização. Átomos nas cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco) e oxigênio (vermelho).

DERIVADOS DA OXAMNIQUINA

Os conformeros de energia mínima do *N*-acrilóil e *N*-metacrilóil derivados são apresentados na FIGURA 14. Nestes, observa-se mudança de orientação do grupo metil-olefínico no derivado *N*-metacrilóil em relação à orientação do grupo olefínico do derivado *N*-acrilóil, muito provavelmente em função de estabelecimento de conformação mais estável. Tal reorientação faz supor que a presença da metila poderia desfavorecer a formação do derivado *N*-metacrilóil, por impedimento estérico, corroborando o resultado experimental. Ademais, interações entre os grupos metil-olefínico e *N*-isopropílico da cadeia lateral

também poderiam prejudicar a formação do *N*-metacrioloil derivado. Esta suposição pode ser visualizada na FIGURA 15, em que ambos os derivados encontram-se sobrepostos. Entretanto, estudo de transição da formação destes derivados seria necessário para melhor avaliação da hipótese aventada.

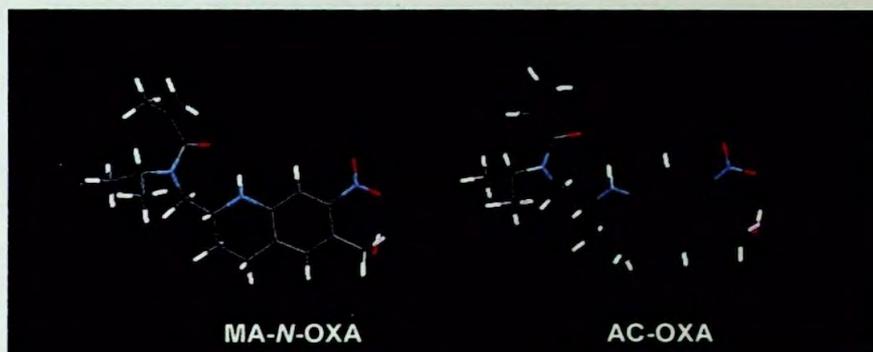


FIGURA 14 – Confôrmeros de energia mínima do AC-OXA e seu análogo proposto MA-N-OXA, modelo tubo. Átomos nas cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), nitrogênio (azul) e oxigênio (vermelho).

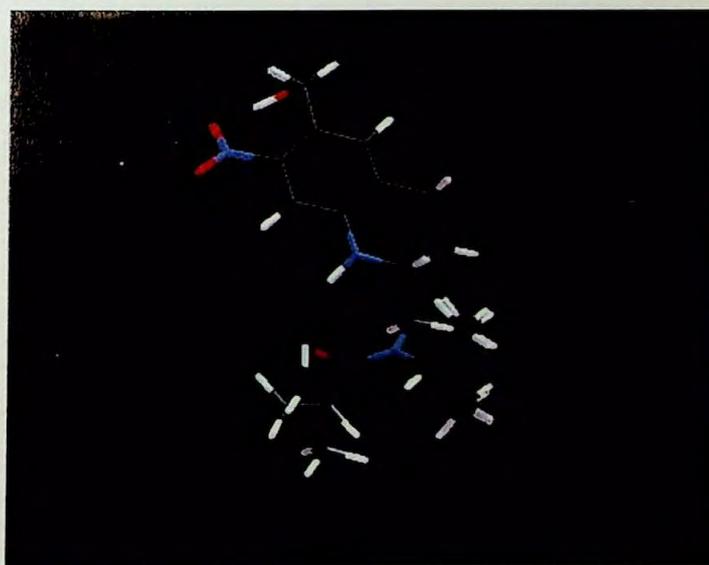


FIGURA 15 – Sobreposição do confôrmero de energia mínima do MA-N-OXA em relação ao confôrmero AC-OXA, considerando-se os átomos presentes no anel 1,2,3,4-tetraidro-2-aminometil-7-nitro-6-quinolinometanol. Átomos nas cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco) e oxigênio (vermelho).

Roberto Parise Filho