

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

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

**Antichagásicos Potenciais: Síntese de pró-fármacos recíprocos de
megazol e primaquina**

MICHELLE CARNEIRO POLLI

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2003

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

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

**Antichagásicos Potenciais: Síntese de pró-fármacos recíprocos de
megazol e primaquina**

MICHELLE CARNEIRO POLLI

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2003

17441

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005157

Ficha Catalográfica

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

Polli, Michelle Carneiro

P774a Antichagásicos potenciais : síntese de pró-fármacos
recíprocos de megazol e primaquina / Michelle Carneiro
Polli. -- São Paulo, 2003.
156p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2.
Antichagásicos : Medicina I. T. II. Ferreira, Elizabeth
Igne, orientador.

615.19 CDD

MICHELLE CARNEIRO POLLI

**Antichagásicos Potenciais: Síntese de pró-fármacos
recíprocos de megazol e primaquina**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
Presidente e Orientadora

Profa. Dra. Chung Man Chin
1º. examinador

Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____

A minha família que sempre foi a base da minha vida...

Aos meus pais, companheiros constantes, que sempre me proporcionaram o estudo e sempre participaram de todos os meus momentos com muito amor, apoio e incentivo. Quero compartilhar com vocês essa conquista, pois ninguém merece tanto.

A minha irmã MANY C. POLLI, por estar sempre presente na minha vida. Agradeço pela sua amizade, cumplicidade, ajuda e socorro prestados sempre que necessário.

A meu irmão RAUL C. POLLI por sua constante preocupação e zelo.

Ao meu namorado, ROBERTO PARISE FILHO, por ser capaz de me entender de um modo como poucos conseguem fazer, por se alegrar quando as coisas vão bem, e por ter dividido comigo todos os momentos de preocupações mas também de conquistas. Saiba que seu constante companheirismo tornou-se o meu apoio no dia a dia e sem a sua participação constante na minha vida esse trabalho não seria o mesmo.

A minha orientadora, professora Titular ELIZABETH IGNE FERREIRA, uma pessoa muito especial, agradeço em primeiro lugar pela oportunidade e encorajamento na realização deste trabalho mas, sobretudo, pela sua atenção constante, paciência e ensinamentos que proporcionaram o conhecimento e possibilitaram essa conquista. Sua dedicação e seriedade no trabalho me serviram de exemplos.

Quero agradecer de coração a minha amiga, Professora Dra. MARIA LUIZA CRUZ, que é a responsável pelo início de toda essa jornada. Agradeço por toda sua preocupação nos momentos difíceis e pelos seus valiosos conselhos.

AGRADECIMENTOS

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

À FAPESP pelo auxílio financeiro e bolsa concedida.

A minha amiga KÁTIA CIRLENE ALVES BOTELHO pela paciência e socorro prestado diversas vezes, através de sua ajuda irrestrita e fundamental para a elaboração deste trabalho. Agradeço pela amizade conquistada a cada dia, pela confiança demonstrada e convivência durante esses anos.

À KERLY PASQUALOTO pela amizade, atenção e auxílios sempre prestados mas, sobretudo, por esse período de convivência muito “iluminado” que me fez perceber o quanto é uma pessoa grandiosa.

À CARLA MENEZES, pelas nossas conversas e amizade que tem crescido a cada dia.

À DANIELA RANDO. Nunca esquecerei a maneira acolhedora com que me recebeu desde o início e os auxílios prestados na elaboração dos meus primeiros experimentos. Agradeço por sua amizade, atenção, sugestões, conselhos e instrutivas conversas que tivemos durante esse período.

A meu amigo, DIOGO TEIXEIRA CARVALHO, pela amizade e agradável convivência.

Ao mestrando GUSTAVO TROSSINI pela convivência sempre alto astral e por suas qualidades que são tantas mas poucos reconhecem.

Ao mestrando GUILHERME COSTA MATSUTANI, pela convivência, atenção e principalmente pela paciência.

À VANESCA FAGUNDES que participou na etapa crítica do trabalho. Agradeço sua ajuda e dedicação. Além disso, o seu constante bom humor torna a convivência e o trabalho sempre agradáveis.

Aos colegas de laboratório HÉLIO, KÁTIA SOLANGE, PRISCILLA; CLÁUDIA, CHARLES, NARA, ANA CLÁUDIA e CAMILA pela convivência, tolerância e amizade.

Ao professor CARLOS ALBERTO BRANDT pela atenção irrestrita com que me recebeu várias vezes, fornecendo importantes informações para a elaboração deste trabalho. Agradeço por estar sempre pronto para ajudar e pela companhia em diversos almoços.

As professoras Dra MARIA AMÉLIA B. DA SILVEIRA E Dra VENI F. NAKASONE, pela atenção e ensinamentos dispensados.

À professora Dra. CHUNG MAN CHIN pelas valiosas sugestões e pelo excelente material bibliográfico de sua autoria que foram indispensáveis para a elaboração do trabalho.

À INÊS pela colaboração fundamental na realização dos espectros de RMN.

À professora Dra MARIA TERÊSA MACHINI DE MIRANDA e ao CLÉBER pela ajuda e disponibilidade na desproteção dos aminoácidos.

Ao professor Dr. Sérgio Albuquerque pela realização dos ensaios biológicos.

Ao coordenador Luiz B. Leoni pela oportunidade e confiança depositadas.

Às amigas Denise e Carol por terem me acolhido de uma maneira muito especial neste período em São Paulo.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS	6
1.1 Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.1.1 Aspectos gerais da interação do <i>T. cruzi</i>	11
1.2 Transmissão da doença de Chagas	13
1.3 Manifestações clínicas e patologia da doença de Chagas	14
1.4 Aspectos sócio-econômicos	16
2 QUIMIOTERAPIA	17
2.1 Tripanomicidas em estudo	20
2.1.1 Megazol	20
2.1.2 Nitrofurais	23
2.1.3 Primaquina	25
2.2 Alvos bioquímicos na pesquisa de novos antichagásicos	26
2.2.1 <i>Tripanotiona reductase</i>	27
2.2.2 <i>Biossíntese do ergosterol</i>	31
2.2.3 <i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>	33
2.2.4 <i>Cisteína proteases</i>	34
2.3 Modificação molecular na introdução de novos fármacos	38
2.3.1 <i>Latenciação</i>	39
2.4 Síntese de peptídeos	50
III. MATERIAL E MÉTODOS	52
1 MATERIAL	52
1.1 Reagentes e solventes	52
1.2 Equipamentos	53
	53

2 MÉTODOS	
2.1 Síntese	56
2.1.1 <i>Megazol</i>	56
2.1.2 <i>Metodologias utilizadas na tentativa de obtenção do pró-fármaco recíproco de primaquina e megazol com espaçante não-peptídico</i>	57
2.1.2.1 Síntese do succinilmegazol	57
2.1.2.2 Síntese do éster metílico do succinilmegazol	57
2.1.2.3 Síntese da succinilprimaquina	58
2.1.2.4 Síntese do produto final derivado de primaquina e megazol com espaçante não-peptídico	58
2.1.3 <i>Metodologias utilizadas na tentativa de obtenção do pró-fármaco recíproco de primaquina e megazol com espaçante peptídico</i>	62
2.1.3.1 Remoção do grupo Boc com TFA/DCM, 50:50, v/v	64
2.1.3.2 Remoção do grupo Tos e Cl-Z utilizando HF	64
2.1.3.3 Síntese de H-Lys(Cl-Z)-primaquina e H-Arg(Tos)-primaquina	65
2.1.3.4 Síntese de Lys(Cl-Z)-Arginina(Tos)-primaquina	65
2.1.3.5 Síntese de megazol-succinil-lisina-primaquina	66
2.2 Métodos analíticos	69
2.2.1 <i>Determinação da faixa de fusão</i>	69
2.2.2 <i>Análise no infravermelho (IV)</i>	69
2.2.3 <i>Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ¹H</i>	69
2.2.4 <i>Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ¹³C</i>	69
2.2.5 <i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	70
2.2.6 <i>Análise Elementar</i>	70
2.3 Avaliação da atividade biológica	70
IV. EXPERIMENTOS	72
1 SÍNTESE DO MEGAZOL	72
1.1 Síntese de benzoato derivado	72
1.2 Síntese de oxima derivada	72

1.3 Síntese do 1-metil-2-ciano-5-nitroimidazol	72
1.4 Síntese do megazol	73
2 SÍNTESE DO PRÓ-FÁRMACO RECÍPROCO DE PRIMAQUINA E MEGAZOL COM ESPAÇANTE NÃO-PEPTÍDICO	73
2.1 Síntese do succinilmegazol	73
2.2 Síntese do éster metílico do succinilmegazol	73
2.2.1 <i>Síntese de 4-cloro-4-oxabutanoato de metila</i>	73
2.2.2 <i>Obtenção do éster metílico do succinilmegazol</i>	74
2.3 Síntese da succinilprimaquina	74
2.4 Síntese do produto final derivado de primaquina e megazol com espaçante não-peptídico	75
3 SÍNTESE DO PRÓ-FÁRMACO RECÍPROCO DE PRIMAQUINA E MEGAZOL COM ESPAÇANTE PEPTÍDICO	79
3.1 Síntese de H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA	79
3.1.1 <i>Síntese de Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina</i>	79
3.1.2 <i>Remoção do grupo Boc do composto Boc-Lys(Cl-Z)- primaquina com TFA/DCM, 50:50, v/v</i>	80
3.2 Síntese de H-Arg(Tos)-primaquina.TFA	81
3.2.1 <i>Síntese do Boc-Arg(Tos)-primaquina</i>	81
3.2.2 <i>Remoção do grupo Boc do composto Boc-Arg(Tos)- primaquina com TFA/DCM, 50:50, v/v</i>	82
3.3 Síntese de Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)-primaquina	82
3.3.1 <i>Remoção do grupo Boc do composto Boc-Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)- primaquina com TFA/DCM, 50:50, v/v</i>	83
3.4 Síntese de megazol-succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina	83
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
1 RESULTADOS	88
1.1 Síntese	88
1.2 Análises espectroscópicas dos compostos	89
1.2.1 <i>Análises espectroscópicas dos intermediários da síntese do</i>	

<i>megazol</i>	89
1.2.2 <i>Análises espectroscópicas dos intermediários utilizados na tentativa de síntese do composto primaquina e megazol com espaçante não-peptídico</i>	94
1.2.3 <i>Análise espectroscópica do composto primaquina e megazol com espaçante não-peptídico</i>	97
1.2.4 <i>Análises espectroscópicas dos derivados de primaquina com espaçante aminoácido e peptídico</i>	108
1.3 Análise Elementar do pró-fármaco obtido	118
1.4 Avaliação biológica	119
2 DISCUSSÃO	121
2.1 Síntese e análise	121
2.2 Avaliação biológica	132
VI. CONCLUSÕES	134
VII. PERSPECTIVAS	135
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

RESUMO

A doença de Chagas é uma das doenças parasitárias mais graves da América Latina, apresentando alto impacto sócio-econômico. Nos 21 países endêmicos, estima-se que de 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita e que ocorram, aproximadamente, 50.000 mortes a cada ano. Existem apenas dois fármacos disponíveis para o tratamento, no entanto, tais compostos apresentam alta incidência de efeitos adversos e eficácia inadequada contra a fase crônica da doença. Assim sendo, toma-se de extrema importância a pesquisa por novos compostos tripanomicidas. A alta atividade antichagásica potencial do megazol, derivado nitro-heterocíclico, já foi demonstrada. A primaquina, clinicamente utilizada em malária, também apresenta atividade tripanomicida. A latenciação de fármacos é um dos métodos de modificação molecular que tem como objetivo melhorar as características do fármaco protótipo. Diante do exposto, e devido ao ligeiro sinergismo entre primaquina e megazol, observado em ensaios in vitro com T. cruzi, o objetivo final desse trabalho foi sintetizar pró-fármaco recíproco de megazol e primaquina. Com base na especificidade da cruzipaina, protease encontrada somente no T. cruzi, planejou-se utilizar peptídio – Lys-Arg – e aminoácidos – Lys, Arg – como grupos espaçantes. Inicialmente, pró-fármaco com espaçante succínico inespecífico foi obtido para fins de comparação. No caso dos pró-fármacos recíprocos com espaçantes específicos, chegou-se à síntese dos intermediários: succinilmegazol, éster metílico do succinilmegazol, succinilprimaquina, otimizando-se a síntese de Lys(Cl-Z)-primaquina, Arg(Tos)-primaquina e Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)-primaquina. Estes serão, posteriormente, transformados nos derivados de liberação específica potencial. O pró-fármaco com espaçante peptídico provavelmente terá melhor atividade e maior seletividade visto que o composto megazol-succinilprimaquina apresentou elevado valor de IC₅₀, em ensaios in vitro, provavelmente por não estar ocorrendo a liberação completa dos fármacos.

ABSTRACT

Chagas's disease is one of the most severe parasitoses of Latin America. According to WHO, over 16 million people are infected and about 50.000 deaths occur in endemic countries annually. Only two drugs are available: benznidazol and nifurtimox. Both are active only in the acute phase of the disease. So, the lack of effective drugs against the disease leads to an urgent search for new antichagasic agents. Megazol is a nitro-heterocyclic compound with high potential antichagasic activity. Primaquine, clinically used in malaria, also showed tripanomicidal activity. Prodrug design is a molecular modification approach that aims to improve drug properties. Based on those facts, and due to the low synergism between primaquine and megazol found in in vitro assays with T. cruzi, the final purpose of this work was to synthesize mutual prodrugs of those drugs. Based on the knowledge of cruzipain specificity, protease found only in T. cruzi, peptide – Lys-Arg – and aminoacids – Lys, Arg – were planned to be used as spacer groups. Initially, these two drugs were linked through a succinic unspecific spacer group for comparison. In the case of specific mutual prodrugs, only the synthetic intermediates – succinylmegazol, succinylmegazol methyl ester, succinylprimaquine, Lys(Cl-Z)-primaquine, Arg(Tos)-primaquine and Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)-primaquine, which synthesis was optimized – were obtained. These intermediates will be further transformed in specific drug delivery system. Probably, the prodrug with peptide spacer group will have better activity and higher selectivity than the succinic derivative, as expected. The biological assay carried out with megazol-succinyl-primaquine mutual prodrug showed a high value of IC₅₀, probably due to incomplete drug release.

<i>megazol</i>	89
1.2.2 <i>Análises espectroscópicas dos intermediários utilizados na tentativa de síntese do composto primaquina e megazol com espaçante não-peptídico</i>	94
1.2.3 <i>Análise espectroscópica do composto primaquina e megazol com espaçante não-peptídico</i>	97
1.2.4 <i>Análises espectroscópicas dos derivados de primaquina com espaçante aminoácido e peptídico</i>	108
1.3 Análise Elementar do pró-fármaco obtido	118
1.4 Avaliação biológica	119
2 DISCUSSÃO	121
2.1 Síntese e análise	121
2.2 Avaliação biológica	132
VI. CONCLUSÕES	134
VII. PERSPECTIVAS	135
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

De acordo com as estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças parasitárias representam a maior causa de morte humana em relação a qualquer outra doença (WHO, 2002). Aproximadamente 3 bilhões de indivíduos em todo o mundo são afetados por protozoários ou helmintos patogênicos (TRACY & WEBSTER JR, 1996). Dentre essas doenças parasitárias pode-se destacar a doença de Chagas, cujo agente etiológico é um protozoário flagelado, o *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem *Kinetoplastidae* e à família *Trypanosomatidae*.

A doença de Chagas, apesar de ter sido descoberta há 90 anos por Carlos Chagas, ainda constitui grave problema de saúde pública, dada sua difusão por áreas extensas. Esta doença representa um dos mais graves problemas médico-sanitários da América Latina (WHO, 2002). Embora eminentemente rural, a doença de Chagas representa, também, problema para os centros urbanos, devido à intensificação do processo migratório das populações rurais para as cidades.

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, existem entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas no continente Americano e 100 milhões vivendo sob o risco de contrair a doença. O Brasil apresenta cerca de 5 milhões de chagásicos (WHO, 2002). Aproximadamente 3 milhões de pessoas infectadas desenvolvem complicações graves caracterizadas por cardiopatia chagásica crônica, lesões digestivas e distúrbios neurológicos causando 45 mil mortes por ano (SOUZA *et al.*, 1998).

A maior parte dos casos de infecção de seres humanos, ou de outros vertebrados, é produzida pelo contato da pele ou mucosas com fezes ou urina

de insetos hematófagos, os triatomíneos, contaminados por *T. cruzi*. Apesar de haver mais de 100 espécies de triatomíneos, somente uma dezena de espécies tem importância epidemiológica (SCHMUÑIS, 2000). A frequência de infecção dos seres humanos por transmissão através do vetor está relacionada com o nível econômico da população e com a natureza doméstica do vetor. A doença de Chagas é predominantemente rural, pois nessas áreas, o baixo poder aquisitivo da população permite o contato íntimo entre os triatomíneos infectados e o hospedeiro humano (SCHMUÑIS, 2000).

Atualmente, existem apenas dois fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: o nifurtimox (Lampit®, Bayer) e o benznidazol (Rochagan®, Roche). O primeiro, depois de amplamente utilizado no Brasil e em outros países latino-americanos, foi retirado da terapêutica (CANÇADO, 2000). Portanto, no Brasil, o único fármaco antichagásico disponível é o benznidazol. Esses fármacos são ativos apenas na fase aguda da doença e, em se tratando de nitrocompostos, observa-se alta incidência de efeitos adversos. Essas observações demonstram a grande importância do desenvolvimento de agentes antichagásicos realmente eficazes, principalmente para a fase crônica da doença (CHUNG, 1996).

Vários compostos têm sido testados contra o *T. cruzi*, seja em condições de laboratório (*in vivo* ou *in vitro*), seja em casos humanos na fase aguda ou crônica. A primaquina é fármaco de uso na quimioterapia da malária. No entanto, apresenta atividade antichagásica experimental, devido à formação de radicais livres (JARPA, 1950; RUBIO, PIZZI 1954). O megazol apresenta atividade curativa em infecções experimentais causadas por várias cepas de *T. cruzi* (BRENER, 1999).

O planejamento racional de novos fármacos, embora seja método bastante atrativo, é economicamente oneroso e que consome longo tempo para avaliar a segurança do novo fármaco. Em doenças como a doença de Chagas, que acomete pessoas de baixo poder aquisitivo, a dificuldade na produção de novos fármacos torna-se ainda maior, pois não é processo economicamente atrativo para as indústrias farmacêuticas. Assim, segue-se uma das recomendações da OMS em se proceder modificações nos fármacos já existentes com a finalidade de se obter melhorias nas propriedades, na atividade e no desempenho do fármaco no organismo (WHO, 2002). Portanto, no que se refere à introdução de novos fármacos, os processos de modificação molecular têm se mostrado promissores (KOROLKOVAS, 1988; BUNDGAARD, 1985; WERMUTH, 1996). Dentre esses processos merece destaque a latenciação, transformação do fármaco em forma de transporte inativo que, *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Mediante o emprego de grupos transportadores adequados, via de regra desprovidos de atividade pode-se obter pró-fármacos com diferentes finalidades como melhorar propriedades farmacocinéticas, diminuir toxicidade, aumentar seletividade. Caso o transportador também apresente atividade a forma latente resultante é denominada de pró-fármaco recíproco (BUNDGAARD, 1985; KOROLKOVAS, 1988; SINGH, SHARMA, 1994; WERMUTH, 1996). O pró-fármaco recíproco permite a obtenção de derivados de atividade mista ou de atividade única por mecanismos diferentes.

Estudos sobre a bioquímica do parasita têm sido bastante explorados, objetivando a identificação de possíveis alvos terapêuticos. A partir dessa abordagem é possível o desenvolvimento de fármacos antichagásicos mais seletivos, capazes de bloquear rotas metabólicas essenciais do parasita (SIJWALI *et al.*, 2001). Atualmente, tem sido observado interesse no estudo por proteases parasitárias, visto que tais substâncias estão sendo exploradas como

alvos potenciais para o desenvolvimento de novos quimioterápicos (McKERROW, 1989).

A cruzipaina é uma cisteína protease, presente no *T. cruzi*, que demonstrou a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas, que apresentam na posição P₁ resíduos de arginina e lisina. Tal propriedade pode ser explorada para a obtenção de fármacos antichagásicos mais seletivos (NORTH *et al.*, 1990; SHENAI *et al.*, 2000).

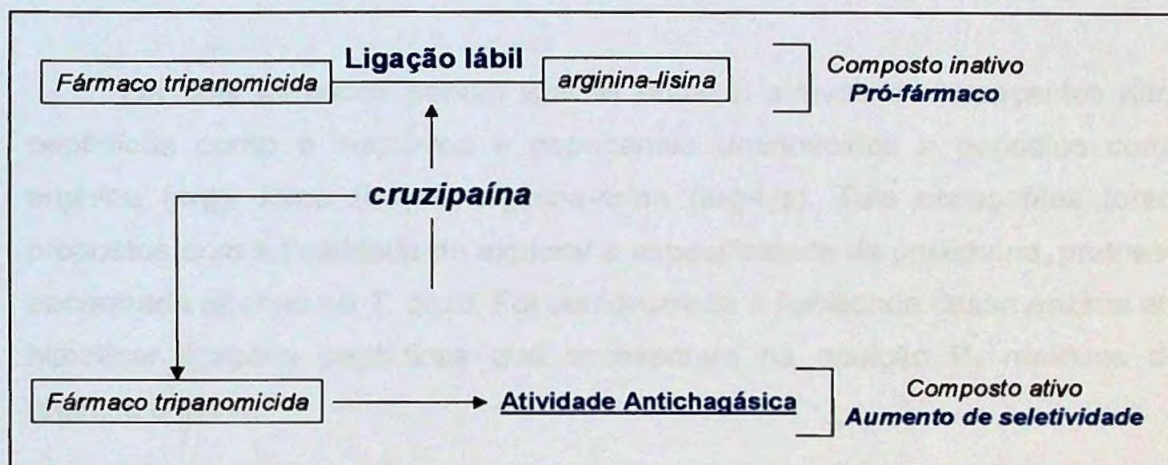


FIGURA 1 - Representação esquemática da utilização da cruzipaina na obtenção de fármacos antichagásicos seletivos.

2. OBJETIVOS

Em termos de número de fármacos disponíveis, a terapêutica da doença de Chagas conta com apenas dois nitrocompostos. Por outro lado, observa-se alta incidência de efeitos adversos, sendo que esses fármacos são ativos apenas na fase aguda da doença. Além disso, a emergência de parasitas resistentes aos quimioterápicos continua sendo um grave problema, justificando a necessidade pela busca de novos agentes antichagásicos.

Nesse sentido, observando-se a necessidade de melhores quimioterápicos - mais eficazes e menos tóxicos - que os de uso corrente em doença de Chagas, o presente projeto tem o objetivo de sintetizar, mediante o processo de latenciação (CHUNG, FERREIRA, 1999), pró-fármacos recíprocos de megazol e primaquina. Tal planejamento justifica-se à vista da alta eficácia demonstrada pelo megazol, cujo mecanismo de ação ainda se encontra em estudos, e ao estresse oxidativo provocado pela primaquina, que tem efeito sinérgico na produção do peroxinitrito, possivelmente implicado na ação do primeiro.

Os dois fármacos seriam ligados entre si através de espaçantes não-peptídicos como o succínico e espaçantes aminoácidos e peptídico como arginina (arg), lisina (lys) e arginina-lisina (arg-lys). Tais espaçantes foram propostos com a finalidade de explorar a especificidade da cruzipaina, protease encontrada apenas no *T. cruzi*. Foi demonstrada a habilidade dessa enzima em hidrolisar ligações peptídicas que apresentam na posição P₁ resíduos de arginina e lisina.

Trabalho análogo, desenvolvido com o nitrofural e primaquina na obtenção de pró-fármacos recíprocos (CHUNG, 1996), empregou diversos peptídios cindidos especificamente por essa enzima. Todos os pró-fármacos mostraram-se ativos em culturas de células infectadas com *T. cruzi* (CHUNG *et al.*, 1997). Neste trabalho, o espaçante peptídico Lys-Arg mostrou-se o mais adequado (CHUNG, 1996), justificando a escolha de tal espaçante para a síntese dos pró-fármacos recíprocos de megazol e primaquina.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, juntamente com outras parasitoses (leishmaniose, malária e esquistossomose), é uma das doenças parasitárias mais graves da América Latina, com alto impacto sócio-econômico. Apresenta ampla distribuição por todo o continente americano, desde o México até a Argentina, afetando cerca de 20 milhões de pessoas. Entretanto, é na América do Sul, principalmente na Argentina, Brasil, Chile, Uruguai, Venezuela e Bolívia, que a doença de Chagas constitui grave problema de saúde pública, visto a sua ampla distribuição (DIAS, SCHOFIELD, 1999; RASSI *et al.*, 1992).

A morbi-mortalidade da doença de Chagas no Brasil é significativa, vitimando 20% ou mais dos indivíduos infectados, que adquirem cardiopatia chagásica crônica evolutiva, capaz de matar, no mínimo, 15.000 pessoas/ano no país (DIAS, JANETE, 1992; FORATINI, 1980). Uma vez que a fase aguda não é facilmente detectada, a mortalidade de 8% não foi considerada relevante frente à fase crônica.



FIGURA 2 – Distribuição geográfica da doença de Chagas, em 1996.

Fonte: <http://www.who.int/ctd/chagas/chagmap1.jpg>.

Descoberta em 1909, por Carlos Chagas, a doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário flagelado *T. cruzi*. A etapa mais importante de transmissão do *T. cruzi* é efetuada por insetos da família *Reduviidae*, incluindo as espécies *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*. No Brasil, o transmissor mais importante é o *T. infestans*, conhecido vulgarmente como barbeiro (DIAS, 1990; DIAS, JANETE, 1992; FORATTININI, 1980; DIAS, 1990).



FIGURA 3 - *Triatoma infestans*: inseto transmissor da doença de Chagas.

Fonte: www.med.sc.edu:85/lecture/trypanosomiasis.htm

Os triatomíneos habitam principalmente as casas de pau-a-pique ou cafuas. São encontrados, com menor frequência, em casas de madeiras e tijolos. Alimentam-se obrigatoriamente de sangue, em especial de mamíferos, pois sem o repasto sanguíneo não ocorre seu desenvolvimento. (GARCIA, AZAMBUJA, 1979).

A partir dos anos 70, com o aumento migratório das populações rurais para as cidades, o parasita acompanhou o homem, modificando o perfil epidemiológico da tripanossomíase americana, ocorrendo a urbanização da doença (RASSI *et al.*, 1992).

Embora seja eminentemente rural, a doença de Chagas representa, também, grave problema para os centros urbanos devido ao fato de a transfusão sanguínea ser o segundo mais importante mecanismo de transmissão (RASSI *et al.*, 1992). Atualmente, como resultado de programas de controle em bancos de sangue, tem-se observado redução de 6,5% para 1% na taxa de contaminação por transfusão sanguínea (SCHUMUÑIS, 1999). Por outro lado, a transmissão congênita, embora sendo numericamente menor e o terceiro mecanismo mais importante de transmissão, é considerada responsável pelo aumento do número de casos de doença de Chagas em países do primeiro mundo, como os Estados Unidos (DIAS, SCHOFIELD, 1999; LEIBY, 1997).

Apesar da interrupção da transmissão da doença de Chagas em amplas áreas do continente americano devido aos avanços obtidos no controle do vetor e transfusão sanguínea, deve-se ressaltar que o problema com as pessoas infectadas permanece sem solução (DIAS, SCHOFIELD, 1999; DIAS, 1984, 1992, 1994).

1.1 Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*

O agente causador da doença de Chagas é um protozoário digenético, visto ser um parasita com alternância de evolução em hospedeiros invertebrados e vertebrados. (GARCIA, AZAMBUJA, 1979).

O ciclo biológico do parasita inicia-se quando o vetor triatomíneo se contamina durante a ingestão de sangue de mamíferos infectados contendo a forma tripomastigota. Os parasitas ingeridos sofrem diferenciação para a forma epimastigota no lúmen intestinal do inseto, onde ocorre a proliferação parasitária. Os parasitos, ao atingir o intestino posterior, se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, infectantes, eliminadas nas fezes e urina.

A infecção pelo *T. cruzi* inicia-se quando os parasitas eliminados pelo inseto, na forma tripomastigota metacíclico, encontram descontinuidade na pele ou mucosa do vertebrado. A maneira mais comum de transmissão é a vetorial, através da picada do barbeiro, e ocorre logo em seguida à picada pelo inseto, que, durante o processo de ingestão do sangue, deposita suas fezes próximas ao local da picada. O parasita tem acesso facilitado ao interior do organismo pelo toque das mãos, já que a picada causa irritação local. Se a picada for próxima dos olhos ou da boca o parasita pode penetrar diretamente pelas mucosas. Uma vez dentro do organismo, os tripomastigotas entram em uma variedade de células, dentro das quais se transformam em amastigotas. Nesse estágio, os parasitas reproduzem-se por fissão binária. O hospedeiro apresenta hipersensibilidade no local de entrada como resultado da intensa destruição celular local. Nesse ponto, alguns amastigotas, com a morte celular, transformam-se em tripomastigotas, que são liberados nos vasos periféricos e estarão aptos para infectar novas células em outros pontos do organismo, como músculo e tecido nervoso, de forma que a transformação de amastigotas para tripomastigotas possa ocorrer em outros pontos do organismo e o ciclo de infecção continua. Com a picada do hospedeiro vertebrado por um novo barbeiro, as formas tripomastigotas sanguíneas, ingeridas com o sangue do hospedeiro vertebrado, diferenciam-se em formas fusiformes denominadas epimastigotas. Essas formas desenvolvem-se basicamente nos 2/3 distais do tubo digestivo do inseto. Na porção terminal, diferenciam-se novamente em tripomastigotas. Estes, também denominados metacíclicos, são as formas mais infectantes do *T. cruzi*, prontas a contaminar novo hospedeiro vertebrado por meio dos excretas do barbeiro, bem como a se estabelecer em reservatórios naturais. (BRENER, CANÇADO, 1979; DIAS, 1990).



FIGURA 4 - Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. Contaminação do vetor através da ingestão de sangue de mamíferos infectados com o *T. cruzi* contendo a forma tripomastigota (1). No lúmen intestinal do inseto ocorre a diferenciação da forma tripomastigota para a epimastigota. Posteriormente, inicia-se o processo de multiplicação (2). No intestino posterior, os parasitas diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes; que serão eliminadas nas fezes e urina (3). Infecção do hospedeiro vertebrado. O parasita ao picar o hospedeiro elimina suas fezes próximo ao local da picada; causando uma irritação. Conseqüentemente, as formas tripomastigotas metacíclicas têm acesso facilitado ao interior do organismo pelo toque das mãos (4). Uma vez dentro do organismo, as formas tripomastigotas invadem diversas células e transformam-se em amastigotas. Inicia-se o processo de multiplicação celular e; posteriormente, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas capazes de infectar novas células (5). Outro barbeiro pica o hospedeiro vertebrado contaminado; ingerindo as formas tripomastigotas sanguíneas, iniciando, dessa maneira, iniciando um novo ciclo (6). A infecção pelo *T. cruzi* pode ocorrer em diversos vertebrados como tatus, gambás, macacos e gatos (7), além do homem.

Fonte: www.who.int. Acessado em: 12/12/2002.

O ciclo de vida do *T. cruzi* compreende três formas evolutivas principais, dotadas de características morfológicas e biológicas distintas. Com base na forma geral das células (esférica, piriforme, alongada), na posição relativa entre núcleo e cinetoplasto (anterior, lateral e posterior) e na maneira de saída do flagelo da bolsa flagelar (central ou lateral) definem-se as seguintes formas evolutivas: epimastigota (encontrada no tubo digestivo do vetor), tripomastigota (encontrada no vetor, em cultura de células e no sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado) e amastigota (encontrada no interior de células do

hospedeiro vertebrado ou em cultura de células). A figura 5 apresenta de maneira esquemática, as principais estruturas encontradas nas várias formas do ciclo evolutivo do *T. cruzi*.

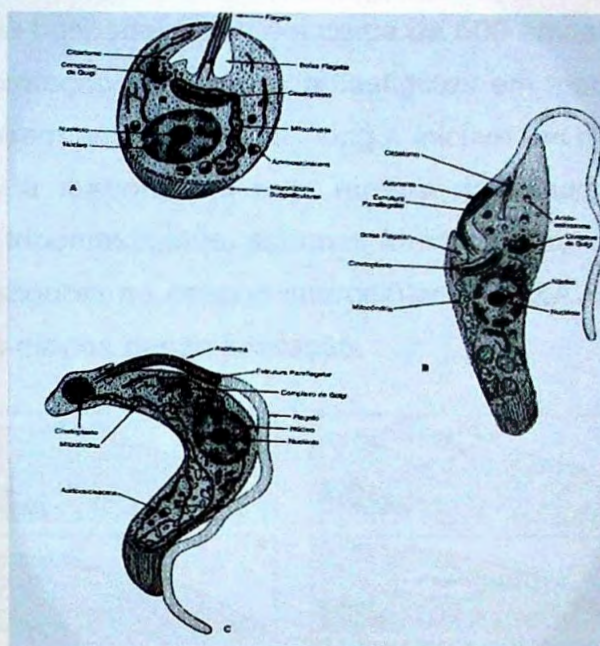


FIGURA 5 - Aspectos gerais da estrutura das formas amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C) do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: SOUZA, 2000.

1.1.1 Aspectos gerais da interação do *T. cruzi* com a célula do hospedeiro

A penetração do *T. cruzi* na célula do hospedeiro é fundamental para a realização completa do seu ciclo evolutivo. O parasita invade a célula utilizando mecanismos específicos, que podem variar dependendo do tipo celular. Logo após a entrada na célula a forma tripomastigota pode ser encontrada no interior de um vacúolo, denominado vacúolo parasitóforo. Imediatamente, inicia-se o processo de transformação para a forma amastigota e, simultaneamente, ocorre a destruição da membrana do vacúolo parasitóforo. Após determinado

período, a forma amastigota encontra-se livre, em contato direto com as estruturas citoplasmáticas da célula do hospedeiro. Cerca de 35 horas depois inicia-se o processo de divisão celular binária. Decorridos, aproximadamente, 5 dias, quando a célula hospedeira contém cerca de 500 amastigotas, inicia-se o processo de transformação das formas amastigotas em tripomastigotas. Logo que as formas adquirem um flagelo mais longo, iniciam um movimento intenso, que aparentemente é responsável pela ruptura da célula hospedeira, com liberação de muitos tripomastigotas, algumas formas de transição e, em certos casos, formas amastigotas no espaço intercelular (SOUZA, 2000). A Figura 6 mostra as diferentes etapas dessa interação.

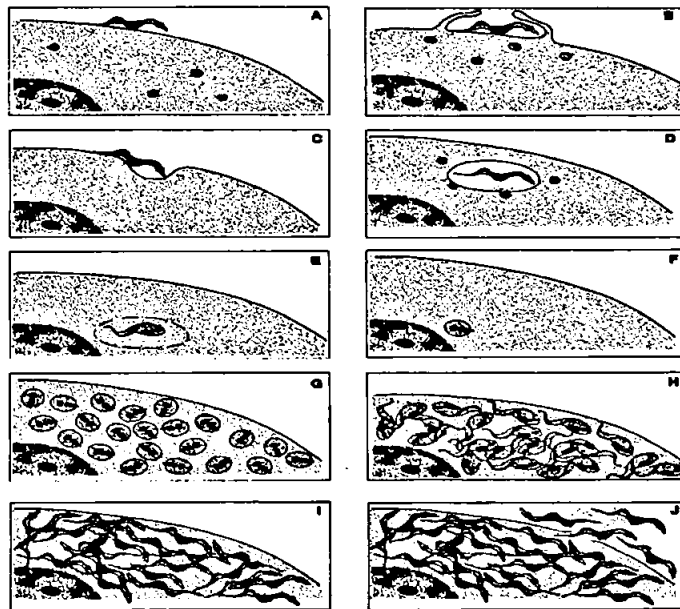


FIGURA 6 - Diferentes etapas do processo de interação do *T. cruzi* com a célula do hospedeiro vertebrado. Adesão do parasita à superfície celular (A), induzindo um processo de internalização via formação de pseudópodos (B) ou de uma depressão na superfície celular (C). No interior da célula o parasita encontra-se no interior de um vacúolo, denominado vacúolo parasitóforo (D). Lisossomos da célula do hospedeiro fundem-se com o vacúolo parasitóforo (D). Gradualmente, a forma tripomastigota perde o aspecto alongado e a membrana do vacúolo parasitóforo se desorganiza (E) até completa dissolução. A forma amastigota fica em contato direto com o citoplasma da célula do hospedeiro (F), iniciando o processo de multiplicação (G,H). Posteriormente, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas (H, L), levando à ruptura celular e liberação de novas formas tipomastigotas (J).
Fonte: SOUZA, 2000.

1.2. Transmissão da doença de Chagas

Os barbeiros sugam, também, o sangue de animais e aves domésticas, pois habitam igualmente currais, cavalariças e galinheiros, o que permite a infecção pelo *T. cruzi* de diversos vertebrados, além do homem. Em áreas endêmicas, a transmissão vetorial é a mais importante, ainda que existam outros modos de contaminação, como a transmissão por transfusão sanguínea, transmissão congênita, acidental ou em transplantes de órgãos (WENDEL, BRENER, 1992).

O *T. cruzi* circula no ciclo silvestre e no ciclo doméstico. O ciclo silvestre envolve a interação entre vetores silvestres e hospedeiros mamíferos. Neste ciclo existe equilíbrio ecológico entre o parasita e seus vetores e hospedeiros silvestres. Os principais reservatórios silvestres são tatus, gambás, roedores e primatas, que co-existem com o parasita sem serem afetados por ele. O ciclo doméstico resulta do contato entre humanos e vetores, causado por condições sócio-econômicas, que permitem a colonização do ambiente doméstico pelo vetor. Neste último caso o parasitismo causa danos graves ao hospedeiro humano, que é o principal "reservatório" do ciclo doméstico, seguido por gatos e cachorros.

Dois exemplos têm mostrado a influência de fatores ecológicos e sociais na doença de Chagas: a) a ausência do parasita entre populações indígenas brasileiras, em que os vetores infectados não infestam suas moradias em função da preservação do ambiente natural pelos índios; b) a ausência da infecção em populações rurais do sul dos Estados Unidos, que habitam moradias de nível econômico mais elevado (WENDEL, BRENER, 1992). Neste caso, deve-se ressaltar, no entanto, que triatomíneos encontrados nos Estados Unidos têm hábitos diferentes dos insetos da América Central e do Sul, defecando longe do local da picada.

Na década de 90, os Ministérios da Saúde do Brasil, Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai e Uruguai lançaram a “Iniciativa do Cone do Sul” para a eliminação da transmissão da doença de Chagas (Figura 7). Cerca de 90 milhões de dólares foram gastos para o controle do vetor e 6 milhões para a triagem em bancos de sangue. Atualmente, a transmissão vetorial intradomiciliar está sob controle no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai. No entanto, torna-se importante ressaltar que se não for praticada vigilância constante, o inseto triatomíneo poderá voltar a infestar os domicílios nestes países (WHO, 2000).

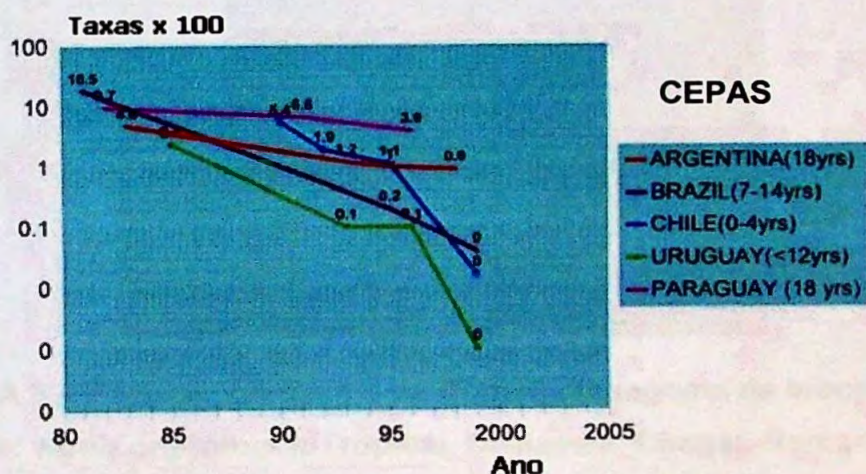


FIGURA 7 – Eliminação da transmissão por triatomíneos no período de 1980 a 2000 nos países do Cone Sul. Fonte: Reports by National Chagas Disease Control Programmes, 1993-1999.

1.3. Manifestações Clínicas e Patologia da doença de Chagas

Duas fases distintas podem ser observadas ao longo da doença de Chagas: a fase aguda e a fase crônica. Estima-se cerca de 7 a 10 dias para que os primeiros sintomas da fase aguda se manifestem. No local de entrada do parasita ocorre processo inflamatório, que nem sempre é visível. Quando a infecção ocorre pela mucosa ocular, observa-se sinal característico da fase

aguda da doença de Chagas, que consiste no inchaço de ambas as pálpebras do olho infectado, conhecido como sinal de Romaña (Figura 8). Quando a infecção ocorre pela pele, o sinal característico é chamado de chagoma, que consiste no inchaço do local da infecção. O sintoma mais comum da fase aguda da doença de Chagas é a febre, podendo ocorrer também inchaço de gânglios linfáticos, hepato ou esplenomegalia, edema localizado ou generalizado. O comprometimento cardíaco é muito raro nesta fase da doença (WENDEL, BRENER, 1992; SILVA, 1999).



FIGURA 8 – Paciente com sinal de Romaña (chagoma de inoculação).

Fonte: woub.org/intouch/Tropical_Disease/a_Chagas-Romana.jpg

Após a fase aguda da doença, que dura entre 1 e 12 meses, o paciente pode evoluir para uma fase indeterminada ou para a fase crônica. O prognóstico para pacientes na fase indeterminada é mais favorável do que para pacientes que entram diretamente na fase crônica, uma vez que estes não apresentam nenhum dos sintomas característicos da doença, podendo inclusive nunca vir a manifestá-los (WENDEL, BRENER, 1992). Aproximadamente um terço dos casos agudos evolui para a fase crônica, de baixa parasitemia, afebril, duradoura pelo resto da vida do paciente, representada por diversas formas clínicas, que afetam um ou mais órgãos de maneira irreversível, sendo as alterações cardíacas as principais observadas. A

cardiopatia crônica e o freqüente aparecimento dos 'megas' principalmente megaesôfago e megacólon, representam formas clínicas muito importantes e de considerável gravidade (SZAJNMAN , 2000).

Na forma cardíaca os sintomas mais característicos são a arritmia, a insuficiência cardíaca e o trombo-embolismo. Nas manifestações digestivas, ocorre comprometimento das funções do órgão afetado. Na forma digestiva do megaesôfago, observam-se alterações na motilidade e diâmetro do esôfago. Outros sintomas também de megaesôfago são: dores epigástricas, regurgitação e hipertrofia das glândulas salivares. No megacólon a principal característica é a obstipação do órgão, que pode durar por semanas. Entretanto, o movimento do cólon pode ser normal em alguns casos da doença (WENDEL, BRENER, 1992).

A prevalência de manifestações digestiva ou cardíaca da doença depende principalmente da região endêmica. Por exemplo, megaesôfago manifesta-se na região Central do Brasil, sendo rara em outras áreas. Já no Chile, a forma cardíaca é extremamente rara. Alguns estudos relacionam a cepa do parasita encontrada na região com o tipo de manifestação observada (ANDRADE, ANDRADE, 1979), porém não existem, ainda, evidências bioquímicas que expliquem estas observações.

1.4 Aspectos sócio-econômicos

A média anual de renda doméstica *per capita* na América Latina é de US\$ 2,966. Portanto, a perda econômica para o continente devido à incapacidade e mortalidade precoce, provocada por essa doença em adultos economicamente mais produtivos, é em torno de US\$ 8,156 milhões, o que equivalia a 2,5% da dívida externa total do continente em 1995 (WHO, 2000). No Brasil, considerando-se que pelo menos 10% dos indivíduos infectados

desenvolvem doenças cardíacas graves, ou comprometimento digestivo crônico, os custos médios para o seu tratamento podem alcançar US\$ 250 milhões e a ausência no trabalho dos trabalhadores chagásicos com graves problemas cardíacos pode representar perdas mínimas de US\$ 5,625 bilhões por ano (DIAS, 1992).

A doença de Chagas é doença crônica debilitante e incapacitante. A cardiopatia chagásica chegou a ocupar o terceiro lugar entre as causas de incapacitação em zonas rurais do Brasil onde a doença de Chagas é endêmica. Também representou a principal causa de aposentadoria antecipada. Observou-se em determinadas zonas endêmicas do Brasil que 9,1% de todas as pensões por invalidez recebidas por pessoas entre 30 a 50 anos tinham a sua origem na doença de Chagas (LOPES, CHAPADEIRO, 1986; DIAS, LOYOLA, BRENER, 1985; ZICKER, ZICKER, 1985).

O custo da enfermidade produzido pela doença de Chagas é maior que o produzido pela leishmaniose, tripanossomíase africana, hanseníase, filariase e oncocercose. Na América Latina, a doença de Chagas produziu o maior ônus de enfermidade entre as doenças tropicais. O ônus que produz a doença é o quarto em importância entre as enfermidades infecciosas prevalentes na região. Somente as infecções respiratórias agudas, as doenças diarreicas e a AIDS produzem um ônus maior. Por outro lado, a tuberculose e as parasitoses intestinais produzem um ônus de enfermidade que segue em magnitude aquele produzido pela doença de Chagas (SCHUMUNIS, 1999).

2. QUIMIOTERAPIA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1997) o fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas deveria apresentar as seguintes características: 1. proporcionar a cura parasitológica na fase aguda e

crônica da doença, 2. apresentar eficácia em dose única ou em poucas doses, 3. apresentar baixo custo, 4. ser desprovido de efeitos colaterais ou teratogênicos, 5. não necessitar de internação hospitalar para o tratamento e 6. não induzir o aparecimento de parasitas resistentes.

Conseqüentemente, em se tratando de doença que representa grave problema de saúde pública, o arsenal terapêutico encontra-se ainda bastante reduzido. Por outro lado, os quimioterápicos mais utilizados neste caso são inadequados, face à baixa eficiência e à alta toxicidade, além da possibilidade de aparecimento da resistência dos parasitas aos fármacos.

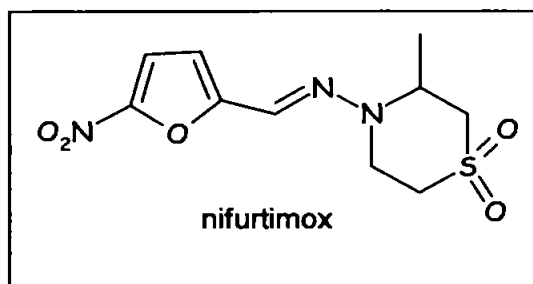
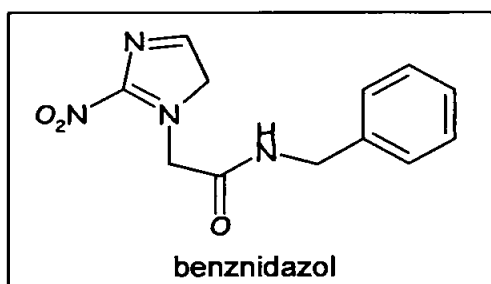
Apesar da tendência de se evitar a presença de grupos nitro-aromáticos como componente estrutural de derivados potencialmente ativos porque eles podem provocar metemoglobinemia, tais compostos têm sido usados na terapêutica desde 1944 (ROSS, 1980; DOCAMPO, MORENO, 1985). No caso da doença de Chagas a quimioterapia utilizada baseia-se em compostos nitrofurânicos (nifurtimox) e, principalmente, em nitroimidazólicos (benznidazol), e é efetiva na fase aguda, na qual se observou alta eficácia, traduzida pela cura de 76% dos pacientes tratados. Na fase crônica da doença, tem-se observado resultado oposto, com fracasso de 77% dos casos, cura de apenas 8% e resultado duvidoso em 16% dos pacientes (CANÇADO, 1999).

A suscetibilidade do *T. cruzi* aos fármacos nifurtimox e benznidazol deve-se às deficiências nos mecanismos de destoxificação deste organismo, já que o mesmo não possui catalase, além de apresentar baixo nível de superóxido dismutase. Desta forma, os fármacos que causam aumento intracelular dos níveis de H_2O_2 , O_2^- e radicais livres são tóxicos para o parasita, explicando a ação terapêutica destes fármacos. Entretanto, a resistência de algumas cepas aos fármacos atualmente utilizados no combate à doença de Chagas (FILARDI,

BRENER, 1987) pode envolver mecanismos de destoxificação mais eficientes, presentes nestas cepas.

Em relação ao mecanismo de ação do nifurtimox, acredita-se que o mesmo exerça efeitos citotóxicos devido à redução de grupos nitro em radicais nitroânions e espécies reativas de oxigênio. Pelo fato de o *T. cruzi* ser parcialmente deficiente de mecanismos de destoxificação de radicais livres este toma-se suscetível à ação do nifurtimox. Por outro lado, este prejuízo oxidativo não representa o principal mecanismo de ação do benznidazol. A detecção do radical nitroânion ocorreu somente em concentrações muito mais elevadas do que as doses capazes de exercer sua atividade tripanomicida. O mecanismo de ação do benznidazol não está bem elucidado, mas parece envolver ligações covalentes ou outras interações de intermediários de nitrorredução com componentes do parasita ou, ainda, ligações com DNA, lipídeos e proteínas (MASANA, TORANZO, CASTRO, 1984; MARR, DOCAMPO, 1986; MAYA, 1997; COURA, CASTRO, 2002).

Os resultados terapêuticos obtidos com o emprego desses fármacos dependem da fase da doença, do período de tratamento e a dose, da idade e origem geográfica do paciente (COURA, CASTRO, 2002).



Fármacos de diferentes origens – derivados quinolínicos (primaquina); emetina e derivados; nitrofurânicos e derivados; nitroimidazol e derivados; trifenilmetanos; triaminoquinazolinás; 2-acetamida-5-nitroimidazol – foram

utilizados empiricamente, no período de 1940-1975, em animais de laboratório e em casos humanos. Esses compostos diminuíram a parasitemia e a letalidade da doença de Chagas mas não promoveram a cura parasitológica (BRENER, 1975).

Derivados purínicos, azólicos, poliênicos e fenotiazínicos também foram empregados e apresentaram alguma capacidade de redução da parasitemia, mas nunca ao ponto de erradicar a infecção no homem (CHUNG, 1996).

2.1. Tripanomicidas em estudo

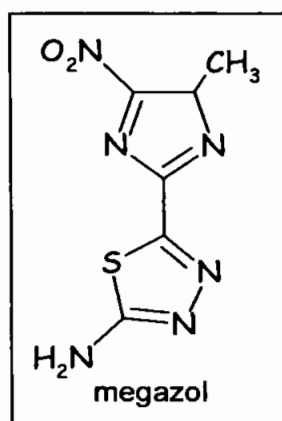
Existem compostos nitro-heterocíclicos com alta atividade antichagásica, que não apresentam utilidade terapêutica, frente aos efeitos adversos graves que apresentam. Entre esses compostos vale citar o nitrofural, anteriormente conhecido como nitrofurazona, e o megazol. A primaquina, uma 8-aminoquinolina utilizada no tratamento da malária, também apresenta atividade antichagásica.

2.1.1 Megazol

O megazol [2-amino-5-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil-1,3,4-tiadiazol)] é um derivado nitroimidazo-tiazol sintetizado em 1960. Esse composto é um antimicrobiano potente, de amplo espectro, agindo em grande variedade de protozoários e bactérias (BERKELHAMMER, ASATO, 1968; CANÇADO, 1980).

Ensaio biológico realizado em camundongos demonstrou a alta atividade do megazol em relação a diversos fármacos nitro-heterocíclicos com considerável atividade antichagásica. Resultados obtidos através de hemocultura, reinoculação e testes de imunofluorescência demonstraram altos níveis de cura parasitológica em animais inoculados com cepas Y20 e

Colombiana 21, que são respectivamente, mediana e altamente resistentes (BRENER, 1999). Apresenta atividade curativa em infecções experimentais causadas por várias cepas de *T. cruzi*, inclusive em cepas resistentes ao nifurtimox e ao benznidazol (FILARDI, BRENER, 1982). É mais ativo que nifurtimox e benznidazol (DE CASTRO, MEIRELLES, 1986; LAGES-SILVA *et al.*, 1990).



Além da atividade antichagásica, atividades antibacteriana e contra outros protozoários, como a *Leishmania donovani*, foram anteriormente relatadas (BERKELHAMMER, ASATO, 1968). A par do amplo espectro de ação, mostrou-se carcinogênico e mutagênico, em ensaio utilizando-se *Samonella/microsoma* (interação com o DNA). É mutagênico direto, isso é, exerce seus efeitos genéticos sem mediação pelas enzimas dos mamíferos (FERREIRA, FERREIRA, 1986). Por outro lado, a alta eficácia do megalol poderia contrabalançar esses inconvenientes em situações críticas, especialmente se fossem efetuadas modificações moleculares, que atenuassem essas propriedades indesejáveis. Dessa maneira, nos últimos anos esse composto tem sido proposto como fármaco antichagásico em alternativa ao nifurtimox e benznidazol, os quais estão sendo descontinuados devido à sua toxicidade (BOLLO, 2001).

O mecanismo de ação do megazol ainda não está totalmente elucidado. Inicialmente acreditava-se que a redução do grupo nitro com a formação do respectivo radical nitro ânion apresentava pouca participação na atividade antichagásica.

Existem estudos relacionando a atividade tripanomicida do megazol a uma forte inibição na síntese protéica nos parasitas (BRENER, 1999). Esse fármaco tem efeito definitivo na síntese protéica de amastigotas em concentrações nas quais o nifurtimox e o benznidazol não apresentaram efeitos (DE CASTRO, MEIRELLES, 1990). Ultra-estruturalmente, o megazol provoca várias alterações no *T. cruzi*, sendo as mais características a vacuolização, perda de estruturas no citoplasma e redução do número de ribossomas, além de invaginação do cinetoplasto (DE CASTRO, MEIRELLES, 1986).

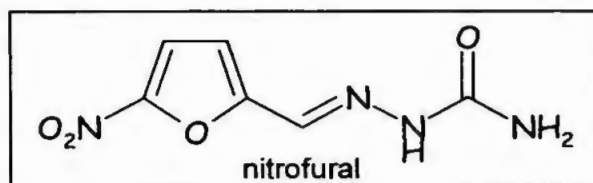
No entanto, atualmente, existem evidências que a redução do grupo nitro ao correspondente radical nitro ânion é uma etapa fundamental no mecanismo de reação. Conseqüentemente, em adição aos efeitos citados anteriormente, esse fármaco mostrou-se suscetível à redução por uma variedade de processos enzimáticos com atividade redutase. Seu potencial redox (-438 mV) é substancialmente mais baixo do que o do nifurtimox (-260 mV) e muito próximo ao do metronidazol (-485mV) (BARRET, 2000; BOLLO, 2001). A redução do nifurtimox e megazol pela tripanotona redutase foi comparada àquela obtida por meio de enzimas de mamíferos como a lipoamida desidrogenase e glutaciona redutase (TSUHAKO *et al.*, 1989). Enquanto o megazol foi um substrato fraco para ambas as enzimas, a constante catalítica para o nifurtimox foi, pelo menos, uma ordem de grandeza superior. Os resultados foram explicados em função do mais baixo potencial de redução dos nitroimidazóis em comparação ao dos nitrofuranos. Estudos recentes têm demonstrado que o megazol é inibidor da enzima fumarato redutase, uma enzima com "cluster" de ferro-enzofre em seu sítio ativo (TURRENTS *et al.*, 1996). Ainda que o modo de

ação da enzima não tenha sido esclarecido, acredita-se que a ação do megazol pode ser devida aos efeitos quelantes sobre o ferro do sítio ativo.

Estudos moleculares integrando cristalografia de raios X, mecânica molecular e métodos semi-empíricos do megazol (RAMEAU *et al.*, 1996) podem auxiliar na elucidação do mecanismo de ação deste nitroimidazol.

2.1.2 Nitrofurais

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



Este fármaco foi empregado, inicialmente, durante a II Guerra Mundial, para o tratamento de queimaduras, apresentando amplo espectro de atividade antibacteriana (CRENSHAW *et al.*, 1976). Em razão da resistência bacteriana, o espectro de atividade foi se modificando ao longo do tempo (KOROLKOVAS, 2000).

A toxicidade desse nitrofurais é alta por via oral, em razão da hemólise e neuropatia graves que provocam. Em alguns países foi retirado do mercado e em outros continua a ser empregado apenas por via tópica, sendo de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas da pele (feridas, queimaduras e

úlceras) especialmente aquelas resistentes a outros fármacos (KOROLKOVAS, 2000).

Em 1969, ANDRADE e BRENER observaram que o nitrofural provocava destruição do *T. cruzi*. Mais tarde, em 1988, HENDERSON e colaboradores constataram a inibição de naftoquinonas e nitrofuranos, incluindo o nitrofural, na tripanotiona redutase.

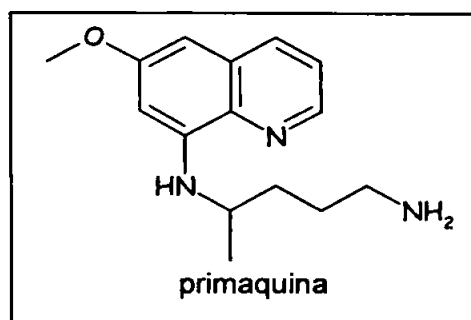
A formação do nitro radical aniônico a partir do nitrofural foi comprovada por meio de geração eletroquímica, com o uso de eletrodo de carbono vítreo (LA-SCALEA, CHUNG, FERREIRA, 1999).

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

O intermediário de síntese de bases de Mannich com peptídios de primaquina (CHUNG *et al.*, 1997), o hidroximetilnitrofural (CHUNG, 1996; CHUNG *et al.*, submetido), mostrou-se mais ativo do que o nitrofural e menos tóxico, ressaltando o papel da modificação molecular, mais especificamente da latenciação (CHUNG, FERREIRA, 1999) no aprimoramento da ação de fármacos. O aspecto altamente promissor desse composto é a diminuição da toxicidade em quatro vezes, comparativamente ao nitrofural, segundo o observado nos testes de mutagenicidade. Tais resultados conduzem ao aprofundamento do estudo do mecanismo de ação/toxicidade desse derivado. Vale mencionar que o prolongamento da ação, que também reduz paralelamente a toxicidade, vem sendo alvo de pesquisas recentes (DEZAN *et al.*, 1998; GUIDO *et al.*, 1999).

2.1.3 Primaquina

A primaquina é fármaco de uso na quimioterapia da malária, representando o único esquizotocida tecidual disponível (KOROLKOVAS, 2000). Apresenta, também, atividade antichagásica experimental, inicialmente comprovada por JARPA (1950) e RUBIO e PIZZI (1954). Contudo, não é empregada na quimioterapia corrente da doença de Chagas.



Inicialmente considerada como fármaco de atuação primária em formas tripomastigotas extracelulares (PEREIRA DA SILVA, KIRCHNER, 1962), mostrou-se, posteriormente, a ação da primaquina em formas intracelulares (McCABE, 1988). O mesmo estudo permitiu comprovar o efeito sinérgico entre primaquina e cetoconazol, sugerindo a utilização do fármaco, associada ou não a outros fármacos, no tratamento da doença de Chagas, no estágio crônico.

Apesar de fármaco introduzido há muito tempo na quimioterapia, o mecanismo de ação, tanto como antimalárico, quanto como antichagásico, não se encontra totalmente elucidado. Parece envolver formação de radicais de hidroxila, *per se* ou por meio de metabólitos (AUGUSTO, SCHREIBER, MASON, 1988; VAZQUEZ-VIVAR, AUGUSTO, 1992, 1994; MORAIS, AUGUSTO, 1993; TRACY, WEBSTER, 1996), podendo ser incluída na classe de fármacos antiprotozoários que devem atuar por meio do ciclo redox, com formação de espécies reativas de oxigênio (AUGUSTO *et al.*, 1986). Essa reação estaria relacionada à formação de H₂O₂ (VAZQUEZ-VIVAR, AUGUSTO,

1992; MORAIS, AUGUSTO, 1993). Estudo eletroquímico, desenvolvido por LA-SCALEA *et al.* (2001), mostrou aspectos importantes da eletro-oxidação e dissociação da primaquina, como contribuição para a compreensão do mecanismo de ação do fármaco.

Ensaio *in vitro* da associação de primaquina com nitrofurais (CHUNG, 1996) mostraram efeito sinérgico da mesma. Derivados peptídicos (CHUNG *et al.*, 1997), sintetizados como intermediários na preparação de pró-fármacos recíprocos de nitrofurais e primaquina (CHUNG, MIRANDA, FERREIRA, 1996; CHUNG, 1996; CHUNG *et al.*, 1996), mostraram-se ativos em células infectadas com *T. cruzi*. Dessa forma, o fármaco apresenta potencialidade como antichagásico, especialmente em associação.

Outrossim, ensaios da associação megalozol-primaquina em tripanossomíase experimental em camundongos infectados, efetuados por SÉRGIO ALBUQUERQUE, FCF/USP, Ribeirão Preto (resultados não publicados), mostraram ligeiro sinergismo em relação aos fármacos protótipos.

2.2. Alvos bioquímicos na pesquisa de novos antichagásicos

Os fármacos atualmente utilizados na quimioterapia da doença de Chagas, além de apresentarem eficiência questionável, causam graves efeitos adversos ao paciente. Dessa maneira, há necessidade urgente do desenvolvimento de novos fármacos menos tóxicos e mais eficientes. Para esta finalidade, é fundamental que se conheçam as vias metabólicas do parasita e que se caracterizem enzimas e componentes específicos. Possíveis alvos quimioterápicos têm sido identificados especialmente mediante comparação da bioquímica do parasita com a do hospedeiro. Exemplos dessa abordagem são o ergosterol e a tripanotona. Os possíveis alvos quimioterápicos principais são apresentados na tabela I, com as respectivas referências.

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

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

2.2.1 Tripanotona

Todos os organismos aeróbios apresentam defesa contra o estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio geradas durante o metabolismo oxidativo. Entre elas estão o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($OH\cdot$) e seus subprodutos. Essas espécies danificam biomoléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Para prevenir esse dano celular, existe um sistema de defesa, que compreende várias enzimas e moléculas antioxidantes com papel vital na destoxificação, como a catalase, a superóxido dismutase, variedade de peroxidases e o sistema da glutatona (CHANCE, SIES, BOVERIS, 1979; CADENAS, 1989).

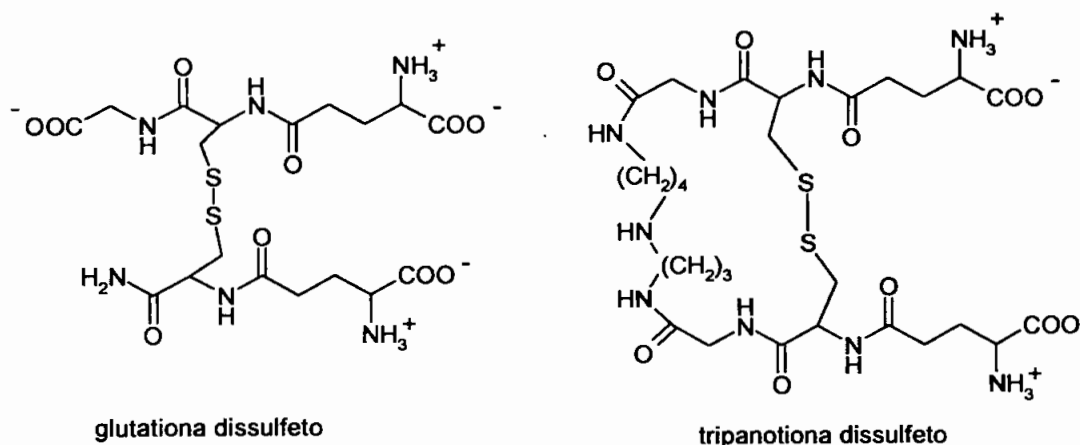
Assim, por exemplo, a superóxido dismutase catalisa a transformação do O_2^- em $H_2O_2 + O_2$, enquanto que H_2O_2 é decomposto a $H_2O + O_2$ pela catalase, peroxidases e glutathione peroxidase. Embora a catalase seja capaz de decompor H_2O_2 , é praticamente inativa frente a hidroperóxidos orgânicos, diferentemente da glutathione peroxidase, que é altamente ativa com esses compostos (URSINI, MAIORINO, 1995).

Em células de mamíferos, a principal via de destoxificação de H_2O_2 envolve a glutathione peroxidase, que age juntamente com NADPH, glutathione e glutathione redutase. A glutathione é um composto tiólico de baixo peso molecular envolvido na manutenção do equilíbrio redox por agir como coenzima em várias reações, conjugando-se com xenobióticos e com metabólitos altamente reativos (FAIRLAMB, CERAMI, 1992; MEHLOTRA, 1996). A forma reduzida da glutathione (GSH) funciona como agente protetor, mantendo o ambiente celular reduzido ao ser oxidada à forma dissulfeto (GSSG). A glutathione redutase preserva os níveis tiólicos ao catalisar a redução da forma dissulfeto.

O *T. cruzi* na infecção do hospedeiro vertebrado encontra-se inevitavelmente exposto a espécies reativas de oxigênio, geradas internamente como produto de processos oxidativos do parasita, ou pelo hospedeiro, como resposta fisiológica à invasão ou, ainda, como consequência da redução *in vivo* de fármacos, como benzimidazol e nifurtimox (DOCAMPO, STOPPANI, 1979; DOCAMPO, 1984).

Embora o *T. cruzi* possua uma enzima superóxido dismutase contendo ferro, que previne o acúmulo de O_2^- (LE TRANT, 1983; ISMAIL, 1997; TEMPERTON, WILKINSON, MEYER, KELLY, 1998), foi observada deficiência nos mecanismos enzimáticos para a remoção de H_2O_2 , tais como catalase e glutathione peroxidase, comuns em eucariotes superiores, porém ausentes ou presentes em baixíssima atividade nesse organismo (DOCAMPO, STOPPANI,

1979; BOVERIS *et al.*, 1980; PENKETH, KLEIN, 1986; PENKETH *et al.*, 1987; DOCAMPO, MORENO, 1990). Demonstrou-se que a capacidade do parasita para reduzir H_2O_2 era dependente de um cofator tiólico, um conjugado de glutatona e esperdimina, denominado tripanotona (FAIRLAMB *et al.*, 1985; FAIRLAMB, CERAMI, 1985). Como em outros microrganismos, o acúmulo de dissulfetos afeta o equilíbrio tiólico-redox e, conseqüentemente, a atividade metabólica do *Trypanosoma*. Uma flavoproteína dissulfeto redutase NADPH-dependente, a tripanotona redutase, foi isolada como sendo a responsável pela manutenção da tripanotona na forma ditiol $[T(SH)_2]$ dentro da célula (KRAUTH-SIEGEL, ENDERS, HENDERSON, FAIRLAMB, SCHIRMER, 1987).



Portanto, em mamíferos, a glutatona mantém o equilíbrio do sistema redox. Esta apresenta papel vital no controle do estresse oxidativo. Isto se justifica pelo fato de a mesma ser oxidada por espécies reativas altamente danosas de oxigênio. Enzima chave desse sistema é a glutatona redutase, pois a glutatona, pela ação de radicais livres, é oxidada à glutatona dissulfeto. Esta, por sua vez, quando acumulada torna-se nociva, já que não é oxidada pelos radicais livres, ocorrendo o acúmulo dessas espécies. A glutatona redutase é a enzima responsável pela conversão da glutatona dissulfeto a glutatona, podendo esta última ser novamente reoxidada pelo oxigênio molecular.

Como citado anteriormente, o *T. cruzi* contém estrutura análoga à glutathione, conhecida como tripanotiona, e sua forma oxidada tripanotiona dissulfeto. Assim como a glutathione, a tripanotiona mostra papel vital no controle do estresse oxidativo. Os níveis de tripanotiona são mantidos pela redução do seu derivado oxidado por intermédio da enzima tripanotiona redutase (BORGES *et al.*, 1995; D'SILVA, DAUNES, 2000).

Apesar de 41% de similaridade entre as enzimas tripanotiona e glutathione redutase, estas possuem substratos específicos. Observou-se que a forma tripanotiona dissulfeto não funciona como substrato para a enzima glutathione redutase e a enzima tripanotiona redutase não é capaz de reduzir a glutathione dissulfeto. Isto representa uma diferença metabólica fundamental entre parasita e hospedeiro relacionado à estrutura bioquímica, tornando a tripanotiona redutase alvo seletivo para o desenvolvimento de novos antichagásicos. Estes levariam ao bloqueio seletivo da tripanotiona redutase, interferindo com o sistema de defesa redox do parasita sem afetar a glutathione redutase humana (GIRAULT *et al.*, 1997).

A inibição efetiva da tripanotiona redutase pela ação de inibidores seletivos impede a redução do substrato fisiológico, a tripanotiona dissulfeto, e, dessa maneira, compromete o sistema de defesa redox do parasita tornando-o mais sensível ao prejuízo redox causado por fármacos tripanomicidas, como vários nitrocompostos. (WALSH, BRADLEY, NADEAU, 1991; GIRAULT *et al.*, 1997; D'SILVA, DAUNES, 2000). O conhecimento da estrutura cristalina da tripanotiona e glutathione torna-se fundamental para o desenvolvimento de fármacos seletivos, capazes de inibir a tripanotiona redutase. A figura 9, a seguir, representa a estrutura cristalina da tripanotiona redutase.



FIGURA 9 - Estrutura cristalina da enzima tripanotiona redutase.

Fonte: www.rcsb.org/pdb. Acessado em: 05/08/2002.

Chung (1996) sintetizou pró-fármacos recíprocos de nitrofuril e primaquina, os quais exibiram atividade antichagásica potencial. Tal planejamento justificou-se pelo fato dos nitrofuranos inibirem a tripanotiona redutase, enquanto a primaquina apresenta atividade antichagásica, possivelmente por meio da formação de espécies reativas de oxigênio. Dessa maneira, com o sistema antioxidante inibido pelo nitrofuril, o parasita torna-se mais suscetível à ação da primaquina.

2.2.2 Biossíntese do ergosterol

A rota biossintética de esteróis tem representado importante alvo contra a doença de Chagas. O fato de o *T. cruzi* apresentar ergosterol justifica dados da literatura de compostos como cetoconazol e itraconazol em inibir ou retardar o crescimento desse protozoário (COURA, CASTRO, 2002).

Compostos azóis, utilizados no tratamento das micoses, têm sido investigados na terapêutica contra o *T. cruzi*. Estes apresentam mecanismo de ação baseado no bloqueio da síntese de esteróis, inibindo a formação do ergosterol a partir do seu precursor, o lanosterol. Essa atividade resulta da ação

dos derivados azólicos em inibir a enzima lanosterol 14 α -desmetilase dependente do citocromo P-450. Tal bloqueio resulta em acúmulo de 14 α -metilesterol e perda de ergosterol. A enzima lanosterol 14 α -desmetilase está presente também em mamíferos, mas apresenta sensibilidade consideravelmente menor do que a enzima presente no *Trypanosoma*. Esse bloqueio mais específico na rota biossintética do parasita em relação à do hospedeiro sugere que tais inibidores podem representar importantes quimioterápicos contra a doença de Chagas (GOAD *et al.*, 1989; DOCAMPO, SCHMUÑIS, 1997).

Enquanto *T. cruzi* contém ergosterol, o esteroi predominante em mamíferos é o colesterol. Ambos diferem pela presença de um grupo metila na posição 24 e duplas ligações nas posições 7 e 22 do ergosterol. Por outro lado, as reações enzimáticas envolvidas na introdução do grupo metila e dupla ligação na posição 22, catalisadas pela enzima S-adenosil-L-metionina ($\Delta^{24(25)}$ esterol metil transferase), não apresentam correlação com a biossíntese de esteróis em mamíferos. Dessa maneira, inibidores de $\Delta^{24(25)}$ esterol metiltransferase representam potente e seletivo alvo para o planejamento de fármacos antichagásicos. Dados da literatura têm demonstrado efeito antiproliferativo de tais inibidores em ensaios *in vitro* e *in vivo* sobre o *T. cruzi*. (URBINA, VIVAS, 1995; DOCAMPO, SCHMUÑIS, 1997).

A indução de resistência do *T. cruzi* aos compostos azólicos dificulta o uso de tais compostos no tratamento da doença de Chagas. No entanto, a diferença entre os esteróis predominantes na membrana plasmática do *T. cruzi* e do hospedeiro torna a rota biossintética dos esteróis excelente alvo antichagásico. Diante do exposto, estudos têm sido realizados no sentido de bloquear outra etapa dessa via biossintética. A enzima oxido-escaleno ciclase é a responsável pela conversão do 2,3-óxido-escaleno a lanosterol. Inibidores desta enzima causaram acúmulo de 2,3-óxido-escaleno e reduziram a produção

de lanosterol e, conseqüentemente, ergosterol. Alguns desses inibidores, quando testados contra o *T. cruzi*, foram muito ativos contra as formas tripomastigotas (COURA, CASTRO, 2002).

2.2.3 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Todos os membros da família Trypanosomatidae dividem uma característica comum: a organização de praticamente todas as enzimas da via glicolítica dentro de uma organela denominada glicossoma (MARCHÉ, MICHELS, OPPERDOES, 2000). A obtenção de energia no *T. cruzi* é dependente da via glicolítica. Esta grande dependência da glicólise como fonte de energia torna as enzimas envolvidas nesta via alvos atrativos para o desenvolvimento de compostos tripanomicidas. A enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma das enzimas envolvidas nessa via glicolítica, responsável pela conversão do gliceraldeído 3-fosfato a 1-3-difosfoglicerato. Essa enzima tem mostrado ser alvo potencial devido a diferenças significativas existentes, quando comparada a enzima homóloga humana. Baseando-se nestas diferenças, inibidores têm sido desenvolvidos e testados (SOUZA *et al.*, 1998).

A atividade da GAPDH é dependente do NAD⁺ e, conseqüentemente, essa enzima deve apresentar um sítio de ligação para este cofator. Observou-se a presença de uma cavidade hidrofóbica na GAPDH do *T. cruzi* próximo ao sítio de ligação do NAD⁺. Portanto, compostos capazes de interagir com o sítio de ligação do NAD⁺, mas que apresentassem em sua estrutura substituintes volumosos capazes de explorar essa cavidade hidrofóbica adjacente, possivelmente teriam menor afinidade pela enzima humana. Baseando-se nessa estratégia, derivados da adenosina têm sido desenvolvidos e apresentaram maior afinidade e seletividade pela GAPDH do parasita, quando comparada com a GAPDH humana (SOUZA *et al.*, 1998).

2.2.4 Cisteína proteases

Em estudos sobre a bioquímica do *T. cruzi*, moléculas específicas, essenciais no ciclo de vida do parasita e na patogênese da doença, têm recebido considerável atenção. Um grupo de enzimas que apresenta importante papel nesses processos são as proteases parasitárias. Diferentes tipos de proteases são freqüentemente expressas nos diferentes estágios durante o ciclo celular do parasita (McKERROW, SUN, ROSENTHAL, 1993).

Proteases ou peptidases representam uma extensa família de enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas. As peptidases podem ser classificadas em endopeptidases e exopeptidases, dependendo do ponto em que hidrolisam a cadeia peptídica. Essas enzimas são adicionalmente classificadas em serinas e cisteínas, dependendo dos grupos reativos presentes no sítio ativo. As cisteína proteases apresentam um grupo tiol no seu sítio ativo. Observou-se a presença dessa classe de enzimas em vírus, bactérias, protozoários, plantas, mamíferos e fungos. Em protozoários observou-se que diversas proteases pertenciam à classe das cisteína proteases. Essas enzimas apresentam papel vital na nutrição do parasita e invasão das células do hospedeiro (OTO, SCHIRMEISTER, 1997).

A cruzipaina é uma cisteína protease com elevada atividade proteolítica no *T. cruzi*. Essa enzima é uma glicoproteína de 60 kDa semelhante às proteases da família da papaína. Acredita-se que essa enzima possa estar envolvida na proteção do parasita contra o sistema imune do hospedeiro pela degradação de IgG (OTO, SCHIRMEISTER, 1997). A cruzipaina está também envolvida no desenvolvimento do *T. cruzi*, na diferenciação dos vários estágios do seu ciclo biológico e na invasão do hospedeiro (SCHARFSTEIN *et al.*, 1986; MEIRELLES *et al.*, 1992; CHAGAS *et al.*, 1997; DEL NERY *et al.*, 1997).

A cruzipaina corresponde à cisteína protease mais abundante do tripanossoma (CAZZULO, STOKA, TURK, 1997) e é o antígeno imunodominante, reconhecido durante a infecção humana (CHAGAS *et al.*, 1997; DEL NERY *et al.*, 1997). É codificada por mais de 100 cópias de genes polimórficos localizados em vários cromossomos. Entretanto, a despeito do polimorfismo genético, a cruzipaina é uma das proteases parasitárias mais bem caracterizadas (CAZZULO, 1999). Essa enzima é encontrada em abundância nos reservossomas de formas epimastigotas do *T. cruzi*. No entanto, pode ser detectada também na superfície de formas amastigotas e tripomastigotas. Estudos realizados sugerem que a cruzipaina pode estar associada à membrana como uma proteína periférica ou através de uma âncora de glicosil fosfatidil inositol. A presença de cruzipaina nas formas intra e extra celular do *T. cruzi* tem estimulado bastante a tentativa de se desenvolver a primeira geração de inibidores, com alta eficácia *in vitro*. Alguns desses compostos têm apresentados excelentes resultados em experimentos realizados com camundongos infectados com *T. cruzi* (SERVEAU *et al.*, 1996).

A cruzipaina é composta de uma cadeia polipeptídica de 215 resíduos de aminoácidos, dobrada em dois domínios. A tríade catalítica é constituída de Cys25, His159 e Asn75. Todas as variedades moleculares relatadas apresentam essa tríade característica das cisteína proteases e organização estrutural similar às das proteases lisossômicas de mamíferos (DEL NERY *et al.*, 1997). Ao contrário destas últimas, entretanto, a cruzipaina tem uma cadeia C terminal, que pode ser liberada por auto-proteólise. O tamanho dessa cadeia varia de 100 a 130 resíduos de aminoácidos e a seqüência entre o domínio catalítico e o domínio terminal C, contendo grupamentos de Thr, Pro e Ser, é suscetível à clivagem proteolítica. A função desse domínio terminal C ainda permanece incerta. Propõe-se que ele esteja envolvido na evasão à resposta imune do hospedeiro e no aumento da atividade catalítica (SERVEAU *et al.*, 1996; DEL NERY *et al.*, 1997; DEL NERY *et al.*, 1997; STOKA *et al.*, 1998),

bem como na invasão da célula do hospedeiro, ligação às células-alvo, replicação intracelular e diferenciação do parasita (SERVEAU *et al.*, 1996; DEL NERY *et al.*, 1997), funções que seriam atribuídas, também, à porção N terminal. Tais funções, importantes nos vários estágios do ciclo biológico do parasito, fazem da cruzipaína excelente alvo para inibidores específicos e irreversíveis, que podem ser usados para o desenvolvimento de nova quimioterapia. O conhecimento da estrutura cristalina da enzima (figura 10) representa ferramenta importante para o desenvolvimento de inibidores específicos. Muitas tentativas nesse sentido foram realizadas e bem-sucedidas, resultando em inibição da invasão da célula hospedeira e do desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* (SERVEAU *et al.*, 1996).

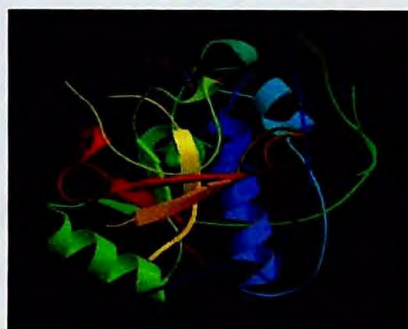


FIGURA 10 - Estrutura cristalina da cruzipaína.

Fonte : www.rcsb.org/pdb. Acessado em: 05/08/2002.

As cisteína proteases mais importantes presentes em mamíferos pertencem à classe das catepsinas, atualmente denominadas de A, B e C. A cruzipaína apresenta homologia de 65% na sua seqüência de aminoácidos com enzimas dessa família. Conseqüentemente, os substratos e inibidores utilizados atualmente para experimentos com a cruzipaína são os mesmos utilizados para as catepsinas lisossômicas L e B de mamíferos (SERVAU *et al.*, 1996).

Estudo cristalográfico da enzima com um inibidor do tipo fluormetilcetona (FMK) ligado ao Z-Phe-Ala demonstrou preferência por substratos contendo

resíduos de fenilalanina na posição P_2 . Por outro lado, observou-se a habilidade da cruzipaina em hidrolisar eficientemente substratos contendo arginina ou um aminoácido hidrofóbico na posição P_1 . CAZZULO *et al.* (1990a) demonstraram que a cruzipaina hidrolisa ligações peptídicas, que apresentem na posição P_1 resíduos de arginina (Arg) e lisina (Lys). A figura 11 mostra esquema da ligação enzima-substrato.

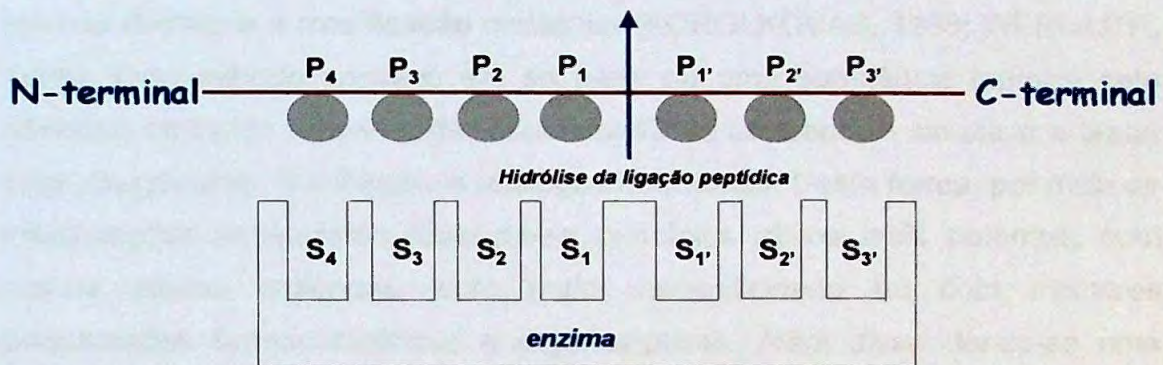


FIGURA 11 – Representação esquemática da ligação de protease com o substrato. Fonte: OTTO, SCHIRMEISTER, 1997.

O subsítio S_1 das cisteína proteases tem especificidade menos definida que o subsítio S_2 e a maioria dos seus substratos comuns contém Arg como resíduo P_1 . A cruzipaina demonstrou preferência marcante por resíduos de Phe, Cys(tBu), Leu e Tyr em P_1 , enquanto que os substratos contendo cadeias laterais β ramificadas, tais como Ile e Val, foram mais resistentes à hidrólise (DEL NERY *et al.*, 1997).

O fato de existir uma homologia de 65% entre a cruzipaina e a catepsina permite que a cruzipaina reconheça também substratos da catepsina. Conseqüentemente têm sido realizados estudos objetivando descobrir inibidores mais específicos para a cruzipaina. Constatou-se aumento na especificidade da cruzipaina quando os aminoácidos eram substituídos em

posições críticas especialmente em P₂. Observou-se, também, que a presença de um resíduo de arginina em P₁, proporciona aumento na seletividade (McGRATH *et al.*, 1995).

2.3 Modificação Molecular na introdução de novos fármacos

Entre os métodos de introdução de novos fármacos na terapêutica, merece destaque a modificação molecular (KOROLKOVAS, 1988; WERMUTH, 1996). Este método consiste em se partir de uma substância química com atividade biológica reconhecida, denominada de protótipo, e sintetizar e testar seus congêneres, homólogos e análogos estruturais. Desta forma, por meio de modificações moleculares, buscam-se princípios ativos mais potentes, com menos efeitos colaterais, com maior especificidade ou com melhores propriedades farmacocinéticas e organolépticas. Além disso, tendo-se uma série de substâncias estruturalmente relacionadas, é possível estabelecer a relação entre estrutura química e atividade biológica (REA), definir o grupo farmacofórico, ou seja, a estrutura mínima essencial para a atividade; e propor a estrutura de receptores. O conhecimento da REA, do grupo farmacofórico e do receptor possibilita o planejamento de fármacos de forma mais racional. Pode-se dizer que a modificação molecular torna-se promissora visto ser capaz de diminuir as propriedades indesejáveis do protótipo e ressaltar as propriedades desejáveis, mediante retirada, substituição ou introdução de grupos químicos, cuja participação na atividade biológica é determinante, ou cuja função acessória pode auxiliar na interação com o receptor (KOROLKOVAS, 1988; WERMUTH, 1996).

Apesar de, em geral, a modificação molecular clássica não utilizar as bases moleculares da doença como suporte racional para o planejamento de novos fármacos, esse foi o processo mais profícuo de introdução de fármacos na terapêutica.

2.3.1 Latenciação

Dentre os métodos de modificação molecular, pode-se destacar a união de um fármaco a um grupo transportador, originando um novo composto, *fármaco-grupo transportador*. No entanto, caso esse composto apresente atividade biológica semelhante ao fármaco protótipo tem-se a obtenção de um análogo. Por outro lado, caso o composto *fármaco-grupo transportador* seja inativo e necessite da liberação do fármaco para a atividade tem-se o chamado pró-fármaco. Dessa maneira, o pró-fármaco pode ser definido como resultante da união de um fármaco a um grupo transportador, por meio de uma ligação, em geral, covalente hidrolisável, que, para exercer sua atividade necessita ser biotransformado dentro do organismo, por um processo químico ou enzimático, liberando a porção ativa no local de ação ou próximo dele. O pró-fármaco constitui derivado farmacologicamente inativo do fármaco protótipo, isto é, uma forma latente (BUNDGAARD, 1985; WERMUTH, 1996; CHUNG, FERREIRA, 1999).

Tal conceito é análogo ao de grupo protetor, utilizado em síntese orgânica para mascarar a reatividade de determinados grupos funcionais (MENÉNDEZ, AVENDAÑO, 1993).

O objetivo no desenvolvimento de pró-fármacos consiste, de uma maneira geral, em melhorar diversas propriedades indesejáveis do fármaco protótipo sem alterar, no entanto, a atividade biológica do fármaco. A latenciação é um método capaz de reintroduzir na terapêutica compostos que apresentam inúmeros problemas tanto farmacotécnicos quanto farmacocinéticos. Apesar de já ter sido um método questionado quanto as suas vantagens na prática clínica, sabe-se que 20 a 30% dos fármacos introduzidos na terapêutica no período de 1986 a 1991 foram desenvolvidos utilizando a

estratégia da latenciação, comprovando dessa maneira sua importância (CHUNG, FERREIRA, 1999).

Diversas barreiras podem prejudicar a atividade de um fármaco e conseqüentemente, os pró-fármacos podem ser desenvolvidos para superar problemas relacionados com as fases farmacêuticas, farmacocinética e até mesmo farmacodinâmica do fármaco protótipo (TESTA, 1995). No caso da fase farmacodinâmica o problema mais freqüente é a toxicidade.

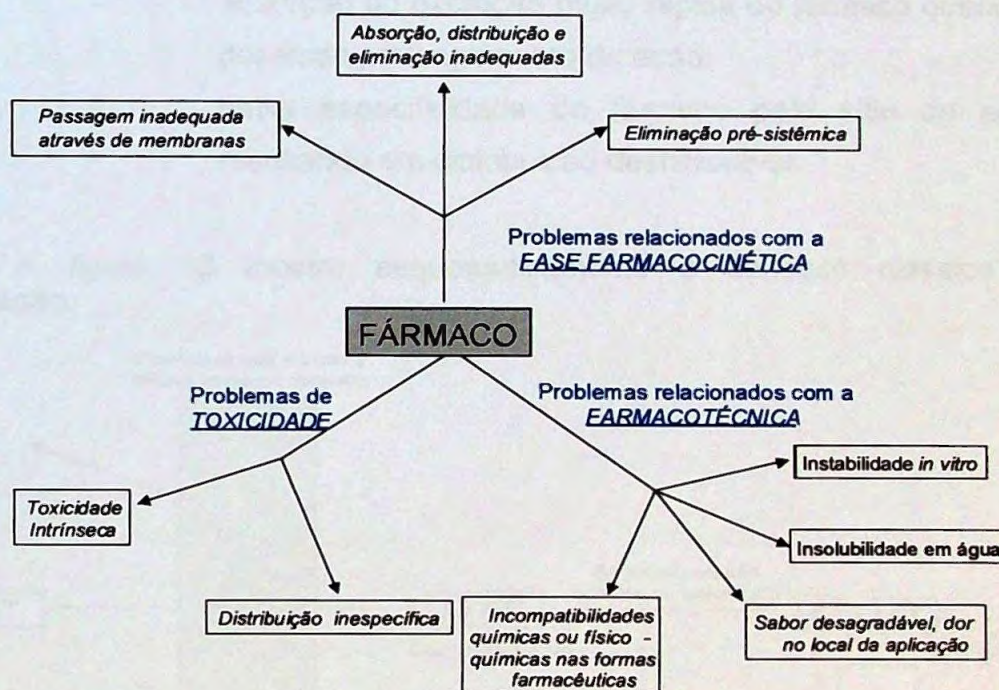


FIGURA 12 – Alguns dos problemas que limitam a utilização de um fármaco. Fonte: MENÈNDEZ, AVENDAÑO, 1993.

Na fase farmacêutica tem-se os problemas farmacotécnicos, que consistem em: falta de estabilidade química das formulações e sabor e odor desagradáveis. Outro problema observado nessa fase é a solubilidade inadequada do fármaco, que pode comprometer sua dissolução, passo

determinante na ação do fármaco e ligado à biodisponibilidade (TESTA, 1995; CHUNG, FERREIRA, 1999).

Os problemas relacionados com a fase farmacocinética incluem:

- absorção incompleta do fármaco através das membranas biológicas;
- baixa biodisponibilidade sistêmica devido à eliminação pré-sistêmica;
- absorção ou excreção muito rápida do fármaco quando é desejado prolongamento de ação;
- baixa especificidade do fármaco pelo sítio de ação, resultando em distribuição desfavorável.

A figura 13 mostra esquematicamente o conceito clássico de latenciação.

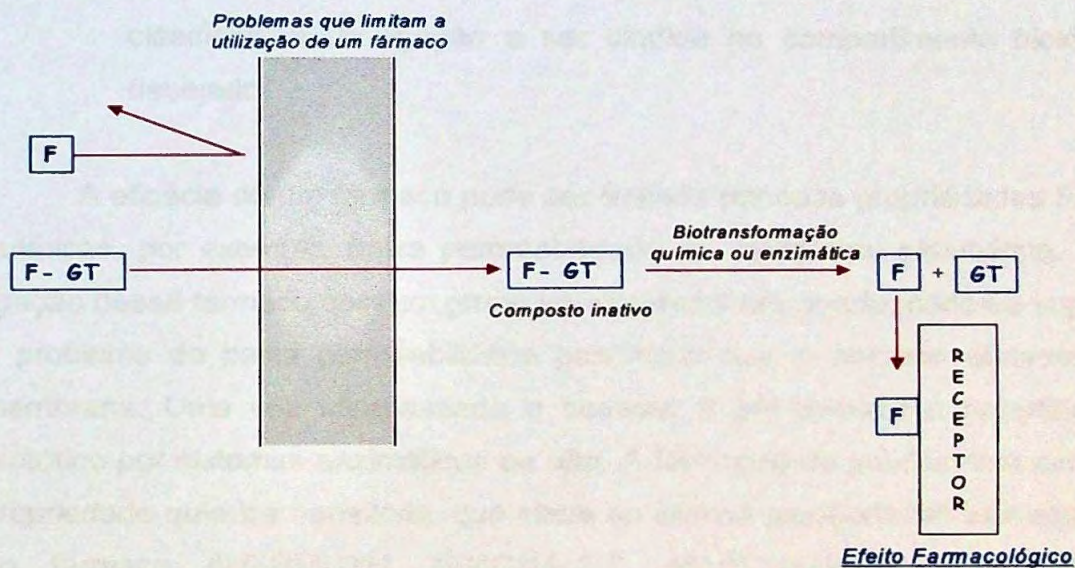


FIGURA 13 – Representação esquemática do processo de latenciação. (F- fármaco, GT- grupo transportador) *Adaptado de: BUNDGAARD, 1991.*

Inicialmente, o termo pró-fármaco foi introduzido por Albert, em 1957, para descrever qualquer composto que necessite de biotransformação para exercer seus efeitos farmacológicos.

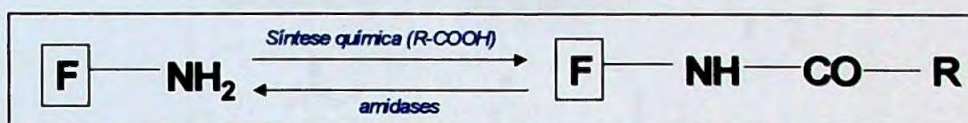
Segundo WERMUTH (1984), as formas latentes podem ser classificadas em pró-fármacos clássicos, bioprecusores e fármacos dirigidos. Essa classificação dependerá do grupo transportador empregado.

Os *pró-fármacos clássicos* resultam da ligação transitória entre fármaco e grupo transportador (WERMUTH, GAINAULT, MARCHANDEAU, 1996). O planejamento desses pró-fármacos pode ser dividido em três pontos básicos:

- 1- Identificação do problema associado ao fármaco;
- 2- Identificação das propriedades físico-químicas a serem alteradas;
- 3- Escolha do transportador adequado, no caso de pró-fármacos clássicos, e da ligação a ser cindida no compartimento biológico desejado.

A eficácia de um fármaco pode ser limitada por suas propriedades físico-químicas, por exemplo, baixa permeabilidade na membrana plasmática. Pela ligação desse fármaco com um grupo transportador adequado, pode-se superar o problema da baixa permeabilidade permitindo que o fármaco atravesse a membrana. Uma vez ultrapassada a barreira, o pró-fármaco é revertido ao protótipo por sistemas enzimáticos ou não. A formação do pró-fármaco confere propriedade química transitória, que altera ou elimina propriedades indesejáveis no fármaco (WERMUTH, GAINAULT, MARCHANDEAU, 1996; FRIIS, BUNDGAARD, 1996). No entanto, alguns critérios devem ser considerados durante o planejamento do pró-fármaco (FRIIS, BUNDGAARD, 1996):

- existência de grupos funcionais no fármaco capazes de permitir uma possível ligação química;
- possibilidade de bioativação do fármaco por sistemas presentes no organismo;
- estabilidade química do pró-fármaco;
- viabilidade sintética;
- regeneração, *in vivo*, do fármaco inicial, em quantidades ideais.



Esquema I: amidas como pró-fármacos de aminas. Observa-se a existência de grupos funcionais (NH_2 e COOH) nos compostos capazes de permitir a formação da ligação amida; a presença de enzimas no organismo (amidases) permite a bioativação do fármaco e a estabilidade química da ligação.

Um pró-fármaco ideal deve ser totalmente inativo; a ligação entre o fármaco e o grupo transportador deve ser preferencialmente covalente; a bioativação deve ser preferencialmente mais rápida que outras reações possíveis (por exemplo, reações metabólicas ou de eliminação) e tanto pró-fármaco quanto grupo transportador devem ser destituídos de toxicidade intrínseca (BUNDGAARD, 1991).

No processo de latenciação de um fármaco é importante saber se existem na molécula do protótipo grupos funcionais suscetíveis de introdução de unidades de transporte. Os grupos mais utilizados são: hidroxila, tiol, carbonila, carboxila e amina. Esses grupos funcionais presentes tanto no fármaco quanto no grupo transportador determinam o tipo e a labilidade da ligação química formada entre eles: éster, amida, carbamato, enamina, éter, fosfamidás, entre outras. A velocidade e a natureza da liberação do fármaco (enzimática ou química) estão relacionadas com o tipo da ligação química. No planejamento do pró-fármaco também é importante considerar

os sistemas enzimáticos, o pH dos fluidos biológicos, das células dos tecidos e dos órgãos alvo (CHUNG, FERREIRA, 1999).

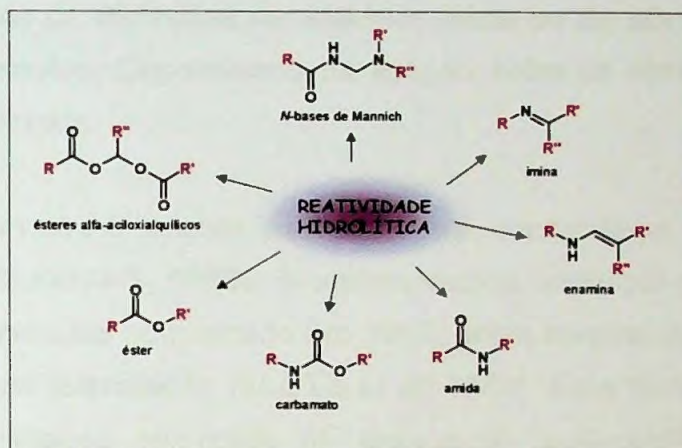


FIGURA 14 – Alguns grupos funcionais suscetíveis à hidrólise em condições fisiológicas (Fonte: San Román et al., 1995).

Os pró-fármacos clássicos podem ser subdivididos em duplos ou triplos (WERMUTH, GAIGNAULT, MARCHANDEAU, 1996) e pró-fármacos recíprocos (SINGH, SHARMA, 1996). O termo duplo é utilizado quando o fármaco não está ligado diretamente ao grupo transportador. Nesse tipo de pró-fármaco tem-se o fármaco conectado ao espaçante, ao qual se liga, também, o grupo transportador, obtendo-se um sistema fármaco-espaçante-grupo transportador. O espaçante proporciona maior acesso das ligações às enzimas, quando for o caso, facilitando a liberação do fármaco de sua forma de transporte. Esse tipo de sistema é importante, visto que no processo de latenciação vários fármacos ligados diretamente aos grupos transportadores não são facilmente cindidos por enzimas lisossômicas, dificultando a liberação da porção ativa (LAAKSO *et al.*, 1987). Pró-fármacos triplos são aqueles que além de ligações por meio de espaçante apresentam liberação por vias química e enzimática.

O termo pró-fármaco recíproco é aplicado quando o transportador também apresenta atividade intrínseca. Esse tipo de pró-fármaco consiste de

dois fármacos, em geral, de atividade sinérgica, em que um atua como transportador do outro (SINGH, SHARMA, 1996). Essa forma de transporte permite a obtenção de derivados de atividade mista ou de atividade única por mecanismos diferentes. Dependendo da ligação entre os fármacos, permite, ainda, liberação dirigida.

Tal conceito não é recente, mas, não raro, confunde-se com hibridação molecular (KOROLKOVAS, 1988). A sulfassalazina, exemplo de pró-fármaco recíproco, foi introduzida no mercado em 1942, antes mesmo da introdução do conceito da própria latenciação (KLOTZ *et al*; 1980). Este fármaco libera, por ação de azorredutases presentes no organismo, sulfapiridina e ácido 5-aminossalicílico, dois compostos farmacologicamente ativos (SINGH, SHARMA, 1996). No entanto, observou-se que o ácido 5-aminossalicílico era o fármaco responsável pela atividade terapêutica da sulfassalazina. Conseqüentemente, o termo pró-fármaco recíproco não seria corretamente aplicado neste caso. Por outro lado desenvolveram-se outros pró-fármacos derivados do ácido 5-aminossalicílico, como o pró-fármaco recíproco de duas moléculas desse fármaco, conhecido como olsalazina.

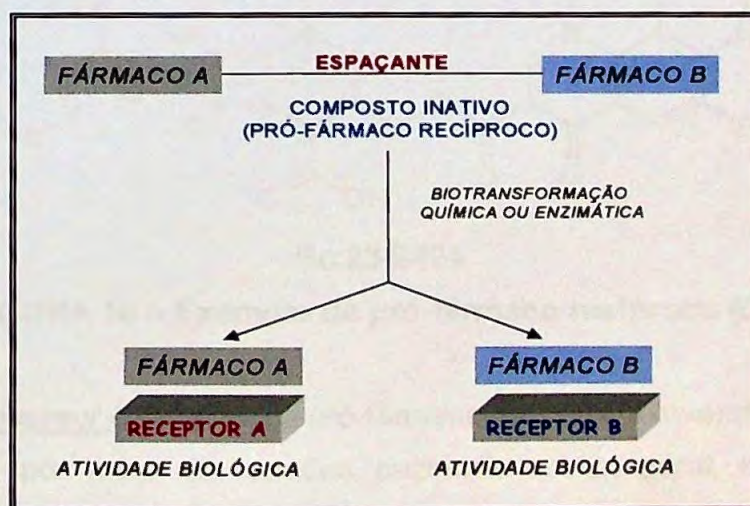
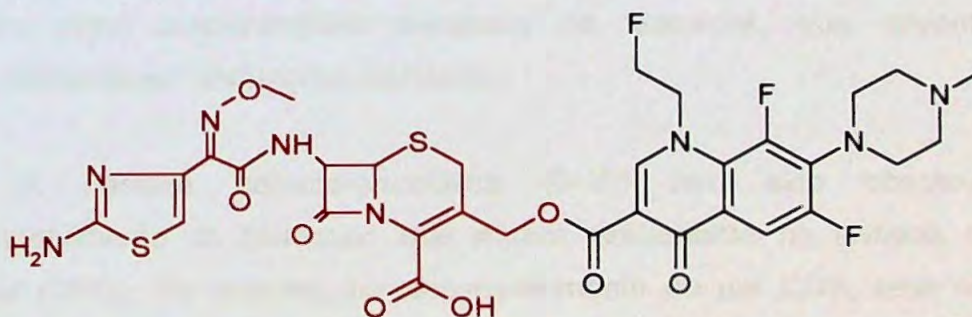


FIGURA 15: Representação esquemática de pró-fármaco recíproco.

Entre os exemplos mais recentes podem-se citar as cefalosporinas de ação mista, conhecidas como DAC (Dual Action Cephalosporins), cujo propósito é ampliar o espectro de ação das mesmas. As cefalosporinas podem dar origem a pró-fármacos recíprocos, quando ligadas na posição 3' a substituintes com atividade terapêutica. ALBRECHT e colaboradores (1990, 1991) desenvolveram série de DAC, em que se associam, mediante ligação nessa posição, quinolonas, melhorando a atividade, solubilidade, estabilidade e farmacocinética do beta-lactâmico matriz. Resultam, dessa forma, antibióticos de ação complementar, uma vez que as quinolonas atuam em cepas resistentes a β -lactâmicos enquanto as cefalosporinas são eficazes contra estreptococos. Ademais, os mecanismos de ação são diferentes, as primeiras atuando na DNA-girase e as últimas, na transpeptidase. Com base no mesmo princípio, pró-fármacos recíprocos de β -lactâmicos não-clássicos, mais propriamente das carbapenemas, com fluorquinolonas encontram-se em ensaios clínicos avançados. Exemplo desse tipo de pró-fármaco recíproco encontra-se à Figura 16.



Ro:23-9424

FIGURA 16 – Exemplo de pró-fármaco recíproco (DAC).

Bioprecursor é um tipo de pró-fármaco, em que a reversão ao composto ativo se dá por meio de reações enzimáticas, em geral, não hidrolíticas. Sistemas de óxido-redução são utilizados pelo organismo para liberar o fármaco

(WERMUTH, 1996). Diferentemente dos pró-fármacos clássicos, esse tipo de forma latente não apresenta grupo transportador.

Exemplo de fármaco bioprecursor é o da mostarda nitrogenada com seletividade para tumores contendo alta concentração em nitrorredutases. O grupo NO_2 presente na forma inativa deve ser reduzido pelas nitrorredutases do tumor a NH_2 , que é a forma ativa.

Alguns pró-fármacos possuem, ao mesmo tempo, características de pró-fármacos clássicos e bioprecursores e são, dessa maneira, chamados de pró-fármacos mistos.

Sistema misto, em que o transportador deve ser biotransformado antes de permitir a liberação do fármaco e que se presta a conferir especificidade de localização, é o CDS – *Chemical Delivery System* (PROKAI, PROKAI-TATRAI, BODOR, 2000). Tal sistema, idealizado por BODOR, em 1989, permite que se atinjam altas concentrações cerebrais de fármacos, que devem atuar especialmente em disfunções cerebrais.

A barreira hemato-encefálica (BHE) tem sido obstáculo ao desenvolvimento de fármacos que atuem diretamente no sistema nervoso central (SNC). No entanto, no desenvolvimento de um CDS, esta estrutura torna-se vantajosa. Esta barreira é geralmente permeável a compostos lipofílicos, mas exclui os hidrofílicos.

O sistema de liberação químico (CDS) baseia-se no fato de que, inicialmente, o composto deve ser suficientemente lipofílico para atingir o compartimento cerebral. A molécula deve, então, sofrer conversões enzimáticas e/ou químicas para promover sua retenção no SNC e, posteriormente, sofrer conversões para a liberação do fármaco. Espera-se, também, que a eliminação

periférica seja acelerada devido à fácil conversão do CDS no organismo. Os CDS que possuem estes atributos são desenvolvidos de forma que um fármaco contendo um grupo hidroxila, amino, ou ácido carboxílico seja covalentemente ligado a um grupo funcional contendo uma unidade diidropindínica, que serve como um alvo "redox" (PROKAI, PROKAI-TATRAI, BODOR, 2000).

Um CDS pode ser descrito como uma molécula biologicamente inerte, que requer etapas de conversões químicas ou enzimáticas para liberar o fármaco ativo, aumentando a sua concentração em um alvo particular. Na abordagem do CDS maior concentração da dose administrada é conduzida ao sítio de ação.

Pode-se concluir que a escolha do transportador adequado afeta o grau de absorção, distribuição, velocidade de liberação do fármaco, seletividade e tempo de ação do composto.

Um fármaco de ação seletiva é um dos objetivos da latenciação, visto que a alta especificidade é capaz de reduzir efeitos adversos que são resultantes da distribuição e ação inespecífica dos fármacos em outros alvos. Fármacos dirigidos são formas latentes em que o transportador é capaz de transportar o fármaco seletivamente do local de administração até o sítio de ação, minimizando as reações adversas e diminuindo a toxicidade (SCHACHT, VANSTEENKISTE, SEYMOUR, 1996).

Nesse tipo de planejamento os transportadores devem interagir especificamente com os sítios presentes na superfície das células alvo. O quadro 1 apresenta os principais sistemas transportadores nessa forma latente.

QUADRO 1 – Principais sistemas transportadores em fármacos dirigidos

Macromoleculares	Celulares	Sintéticos
Anticorpos monoclonais	Eritrócitos	Polímeros sintéticos
Albumina	Fibroblastos	Polímeros de metacrilamida
Lectinas		
Hormônios		
Glicoproteínas		

Fonte: SCHACHT, VANSTEENKISTE, SEYMOUR, 1996.

Dentre esses transportadores, os macromoleculares são mais empregados, capazes de proporcionar formas latentes altamente seletivas.

Variante de grande especificidade de ação, que engloba a concepção de fármaco dirigido, é a do processo ADEPT – *Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy* (MELTON *et al.*, 1996; CAO, LAM, 2002; WESTWELL, 2002). Por esse planejamento, inicialmente se administra um conjugado anticorpo monoclonal-enzima não existente no organismo e, em seguida, pró-fármaco, cuja ligação ao transportador é cindida especificamente pela enzima componente do conjugado.

Processo mais avançado de latenciação e variante do ADEPT, com vistas à máxima seletividade é o GDEPT – *Gene-directed Enzyme Prodrug Therapy*). Esse processo consiste em transferir, por via viral, por exemplo, genes que codificam produção de determinada enzima. Numa segunda etapa, administra-se pró-fármaco cuja ligação do fármaco ao transportador é seletivamente cindida por essa enzima expressa pelo gene transfectado. Tal processo tem sido estudado para a quimioterapia antineoplásica (KIRN *et al.*, 2002).

2.4 Síntese de peptídeos

Três metodologias são empregadas para a síntese de peptídeos (BODANSZKY, BODANSZKY, 1984):

1. Síntese Química: que utiliza reagentes químicos para a formação das ligações peptídicas;
2. Síntese Enzimática: que utiliza enzimas para a formação das ligações peptídicas;
3. Tecnologia do DNA recombinante: empregada principalmente para proteínas ou peptídeos longos.

A escolha dessas metodologias depende do tamanho da cadeia peptídica a ser sintetizada, da natureza dos aminoácidos e da quantidade de produto desejada. Entretanto, a síntese química é ainda bastante utilizada, visto já estar bem estabelecida.

A síntese química de peptídeos pode ser subdividida em síntese clássica ou em solução, empregando-se a abordagem experimental de síntese orgânica, e síntese em fase sólida, em que os aminoácidos são acoplados um a um em suporte sólido, sem qualquer interrupção para o isolamento e caracterização dos intermediários formados. No final do processo, o peptídeo é desligado do suporte polimérico.

A síntese química em solução necessita de etapas de proteção, de acoplamento e de desproteção acompanhada por isolamento e caracterização de cada um dos intermediários ou produtos formados, o que implica operações de extração, lavagem, precipitação, cristalização, filtração, cromatografias, secagem, entre outras.

A união entre dois aminoácidos por meio de uma ligação peptídica compreende a condensação do grupo amino alfa de um aminoácido à carboxila de outro, com eliminação de uma molécula de água.

Métodos simples de proteção dos grupos funcionais de aminoácidos foram desenvolvidos para viabilizar a síntese 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 (JULIANO, 1990).

Agentes acoplantes como DCC (dicicloexilcarbodiimida) e HOBt (1-hidroxibenzotriazol) são muito utilizados na síntese química de peptídeos. O DCC ativa a carboxila do aminoácido levando à formação de um intermediário ativo, que reagirá, posteriormente, com o grupo amino do outro aminoácido, resultando no dipeptídeo.

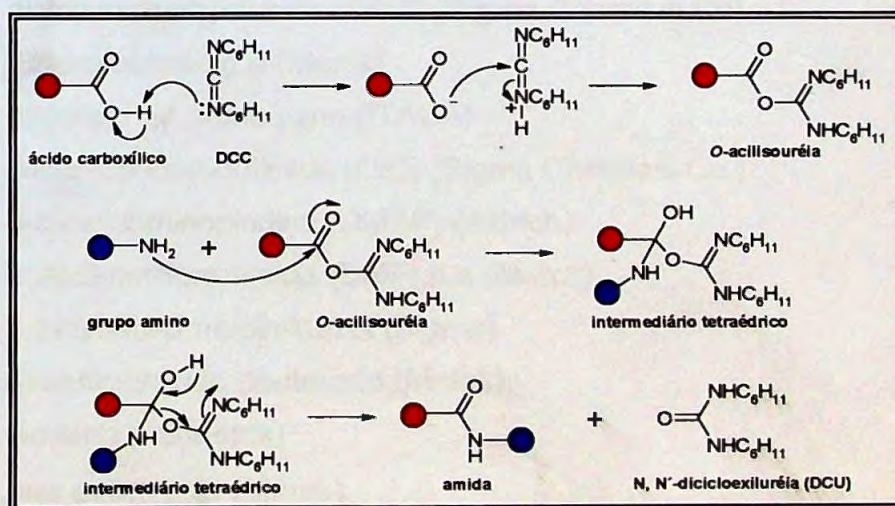


FIGURA 17 – Mecanismo de formação de ligação peptídica pela condensação de ácido carboxílico e amina, promovida pelo DCC. Adaptado: BODANSKY, 1984.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 Reagentes e solventes

- acetona p.a (Merck)
- ácido acético p.a (Merck)
- ácido cítrico (Merck)
- ácido sulfúrico 95-98 % p/p (Merck)
- argônio (White Martins)
- ácido trifluoracético (Sigma Chemical Co.)
- anidrido succínico (Reagen)
- Boc-Arg(Tos)-OH (Bachem)
- Boc-Lys(Cl-Z)-OH (Bachem)
- carbonato de sódio (Synth)
- cloreto de benzoíla (Merck)
- cloreto de tionila (Merck)
- clorofórmio p.a (Merck)
- dicicloexilcarbodiimida (DCC) (Sigma Chemical Co)
- diclorometano p.a (Merck)
- difosfato de primaquina (ITACÁ)
- diisopropilcarbodiimida (DIC) (Sigma Chemical Co.)
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Aldrich)
- *N,N*-dimetilformamida (DMF) p.a (Merck)
- 1,2-dimetil-5-nitroimidazol (Sigma)
- dimetilsulfóxido deuterado (Merck)
- dioxano p.a(Merck)
- éter etílico p.a. (Merck)
- 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Sigma)
- 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) (Sigma Chemical Co.)

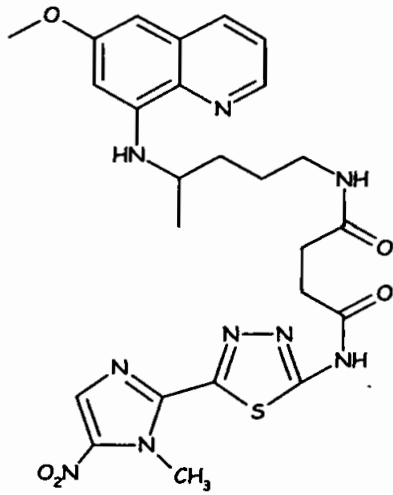
- megazol (sintetizado de acordo com o método de ALBRIGTH e SHEPHARD, 1973)
- metanol p.a. (Merck)
- *N*-metilmorfolina (Merck)
- nitrito de sódio (Synth)
- sulfato de sódio anidro (Merck)
- tiossemicarbazida (Synth)
- trietilamina (Et₃N) (Sigma Chemical S.A.)

1.2 Equipamentos

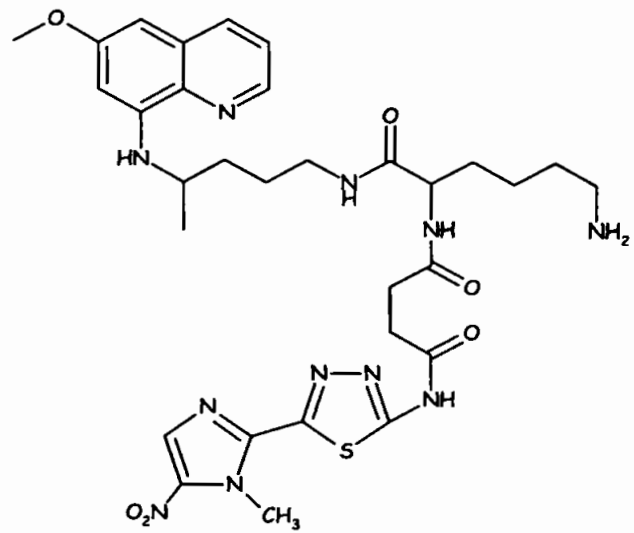
- aparelho capilar Büchi para determinação de ponto de fusão;
- bomba de alto vácuo, modelo E2M5 EDWARDS;
- espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advance DPX-300;
- kugelrohr (fominho para destilação) BÜCHI;
- lâmpada de radiação ultravioleta Spectroline, modelo ENF-260C;
- aparelho de espectrometria de absorção no infravermelho (IV), FTIR-Bomem, modelo MB-120;
- liofilizador Christ, modelo ALPHA 1-2.

2. MÉTODOS

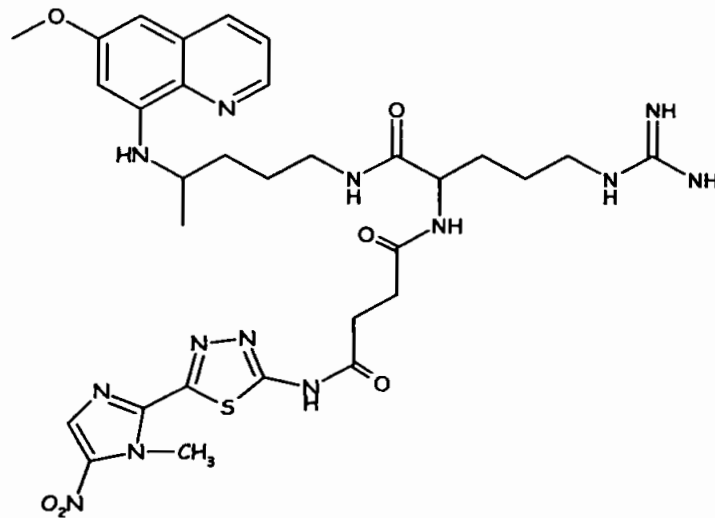
A seguir estão representadas as estruturas dos produtos finais propostos no projeto. A estrutura I refere-se ao pró-fármaco recíproco de megazol e primaquina com espaçante succínico. As estruturas II, III e IV correspondem aos pró-fármacos que apresentam como espaçante lisina, arginina, lisina-arginina respectivamente.



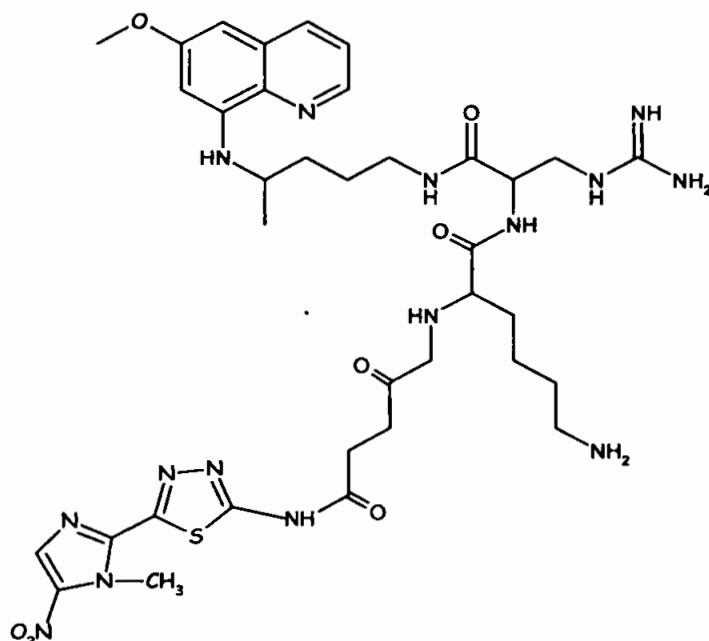
Estrutura I: primaquina-succinil-megazol



Estrutura II: megazol-succinil-Lisina-primaquina

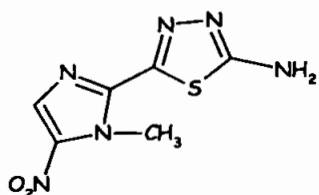


Estrutura III: megazol-succinil-arginina-primaquina

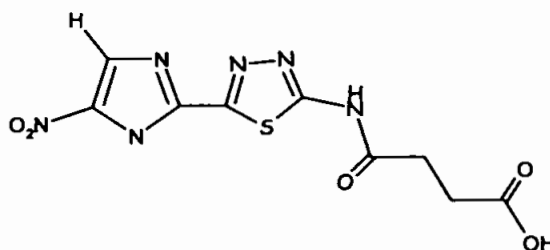


Estrutura IV: primaquina-arginina-lisina -succinil-megazol

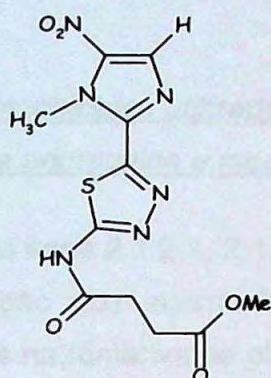
A seguir estão representadas as estruturas dos intermediários utilizados nas tentativas de obtenção dos compostos descritos acima. A estrutura I corresponde ao megazol, produto de partida previamente sintetizado. As estruturas II e III correspondem aos derivados desse composto, succinilmegazol e éster metílico do succinilmegazol respectivamente. A estrutura IV, correspondente a succinilprimaquina refere-se ao derivado da primaquina



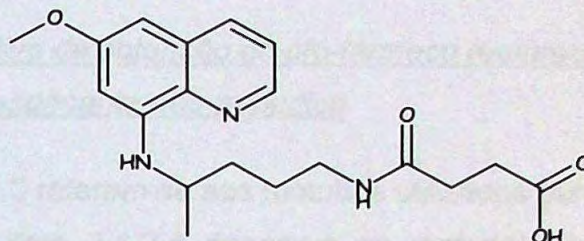
Estrutura I: megazol



Estrutura II: succinilmegazol



Estrutura III: éster metílico do succinilmegazol

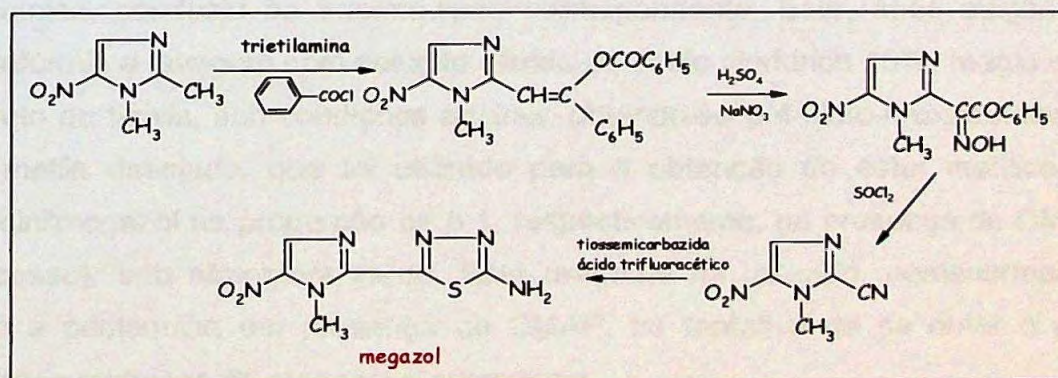


Estrutura IV: succinilprimaquina

2.1 Síntese

2.1.1 Megazol

O megazol foi sintetizado de acordo com ALBRIGTH, SHEPHARD, 1973. O método de síntese constituiu-se de 4 etapas, utilizando-se como material de partida o 1,2-dimetil-5-nitroimidazol, que, por reação com o cloreto de benzoíla em presença de uma amina terciária, conduziu ao intermediário benzoato correspondente. Este reagiu com nitrito de sódio em presença de ácido sulfúrico, formando a respectiva oxima, que, sob ação do cloreto de tionila, produziu a nitrila em posição 2. Este intermediário reagiu facilmente com a tiossemicarbazida na presença de ácido trifluoracético, levando ao megazol.



ESQUEMA II - Etapas envolvidas na síntese do megazol.

2.1.2 Metodologias utilizadas na tentativa de obtenção do pró-fármaco recíproco de primaquina e megazol com espaçante não-peptídico

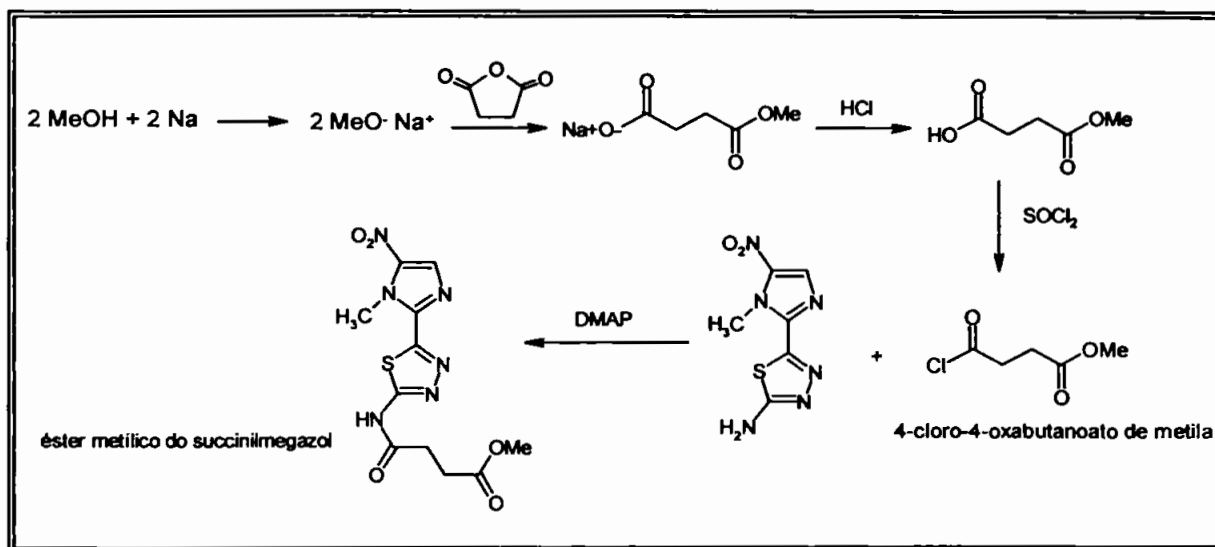
Os itens 2.1.2.1, 2.1.2.2 e 2.1.2.3 referem-se aos métodos utilizados para a obtenção dos intermediários e o item 2.1.2.4 descreve as metodologias utilizadas na tentativa de obtenção do composto desejado.

2.1.2.1 Síntese do succinilmegazol

A síntese foi realizada por acilação do megazol com o anidrido succínico, na proporção de 1 (megazol) para 1,25 (do acilante). A mistura reacional foi submetida a refluxo por tempo adequado, determinado mediante seguimento cromatográfico em CCD. A reação compreendida encontra-se no esquema IV.

2.1.2.2. Síntese do éster metílico do succinilmegazol

O método compreendeu, inicialmente, a síntese de 4-cloro-4-oxabutanoato de metila. Esta constituiu-se de quatro etapas, iniciando-se com uma reação exotérmica entre o metanol e o sódio metálico, sob condições anidras, obtendo-se o metóxido de sódio, que, por reação com o anidrido succínico, conduziu ao intermediário correspondente. Este, após adição de clorofórmio e lavagem com solução diluída de ácido clorídrico 10%, reagiu com cloreto de tionila, sob condições anidras, obtendo-se o 4-cloro-4-oxabutanoato de metila desejado, que foi utilizado para a obtenção do éster metílico do succinilmegazol na proporção de 8:1, respectivamente, na presença de DMAP (excesso), sob atmosfera inerte. Este reagente foi utilizado, posteriormente, com a primaquina em presença de DMAP, na tentativa de se obter o pró-fármaco recíproco de megazol e primaquina.



ESQUEMA III: Etapas envolvidas na síntese do 4-cloro-4-oxabutanoato de metila e posterior obtenção do éster metílico do succinilmegazol.

2.1.2.3. Síntese da succinilprimaquina

A síntese da succinilprimaquina foi realizada, utilizando-se fosfato de primaquina e anidrido succínico, na proporção de 1(fosfato de primaquina) para 1,25 (do acilante), na presença de trietilamina. A mistura reacional foi submetida a refluxo, obtendo-se a succinilprimaquina. A reação compreendida encontra-se no esquema IV.

2.1.2.4. Síntese do produto final derivado de primaquina e megazol com espaçante não-peptídico

Método A

A síntese foi efetuada partindo-se da succinilprimaquina, descrita em 2.1.2.2. O megazol foi, posteriormente, submetido a reação com esse derivado, utilizando-se DCC/DMAP em DMF. A reação foi mantida sob refluxo e o tempo determinado mediante seguimento por CCD.

Método B

A síntese foi efetuada utilizando-se succinilmegazol, como o descrito em 2.1.2.1. Fosfato de primaquina foi, posteriormente, submetido a reação com esse derivado, utilizando-se DCC/DMAP, em DMF e trietilamina, sob agitação à temperatura ambiente, com seguimento mediante cromatografia em camada delgada (CCD).

Método C

A síntese foi efetuada partindo-se da succinilprimaquina, como o descrito em 2.1.2.2 O megazol foi, posteriormente, submetido à reação com esse derivado, utilizando-se DIC/HOBT em DCM. A reação foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação e o tempo determinado mediante seguimento por CCD.

Método D

A síntese foi efetuada partindo-se do succinilmegazol, descrito em 2.1.2.1. Fosfato de primaquina foi, posteriormente, submetido à reação com esse derivado, utilizando-se DIC/HOBT em DCM e trietilamina, sob agitação à temperatura ambiente com seguimento mediante CCD.

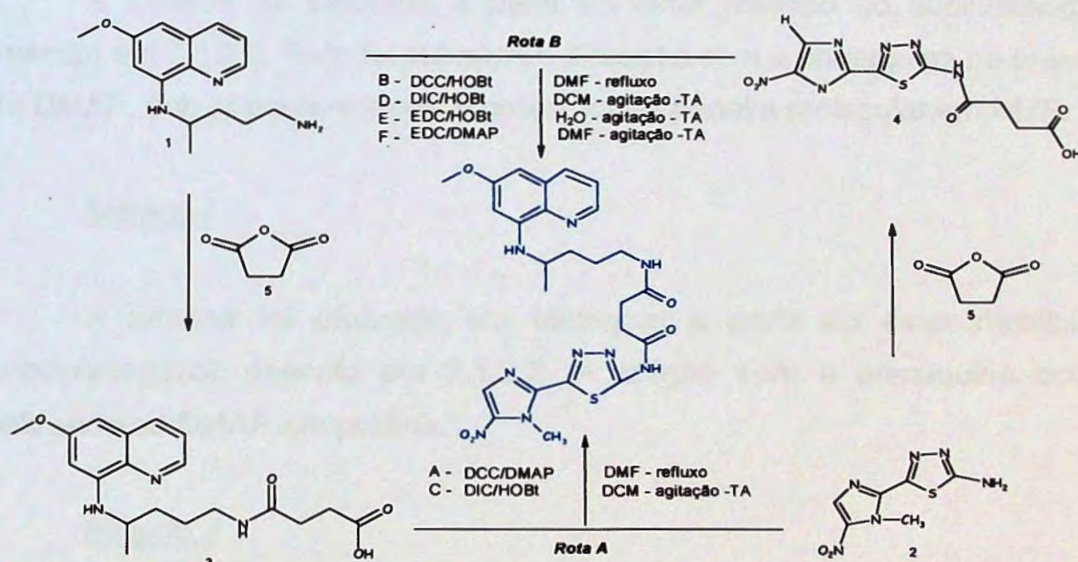
Método E

A síntese foi efetuada a partir da succinilprimaquina, descrita em 2.1.2.2. Megazol foi, posteriormente, submetido à reação com esse derivado, utilizando-se EDC como agente acoplante e a água como meio reacional. A reação foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação, e o tempo determinado mediante seguimento por CCD.

Método F

A síntese foi efetuada partindo-se do succinilmegazol, descrito em 2.1.2.1. Fosfato de primaquina foi, posteriormente, submetida à reação com esse derivado, utilizando-se EDC/DMAP, em DMF e trietilamina. A reação permaneceu inicialmente sob agitação em banho de gelo e em seguida à temperatura ambiente por tempo determinado mediante seguimento por CCD.

Os esquemas das metodologias propostas anteriormente encontram-se a seguir:



ESQUEMA IV: Rotas sintéticas propostas para a síntese de megazol e primaquina com espaçante não-peptídico. Primaquina (1) reage com anidrido succínico (5) para formar succinilprimaquina (3). Megazol (2) reage com anidrido succínico (5) para formar succinilmegazol (4). Succinilmegazol (4) reage com primaquina (1) (Rota B) de acordo com os métodos B, D, E e F apresentados, na tentativa de formação do megazol-succinil-primaquina (6). Succinilprimaquina (3) reage com megazol (2) (Rota A), através dos métodos A e C apresentados, para formar megazol-succinil-primaquina (6).

Método G

A síntese foi efetuada a partir do éster metílico do succinilmegazol, descrito em 2.1.2.2. Este foi submetido à reação com a primaquina na presença de DMAP em DMF para a formação do produto desejado.

Método H

A síntese foi efetuada a partir do éster metílico do succinilmegazol, descrito em 2.1.2.2. Este foi submetido à reação com a primaquina na presença de DMAP, sob atmosfera inerte e presença de peneira molecular em DMF.

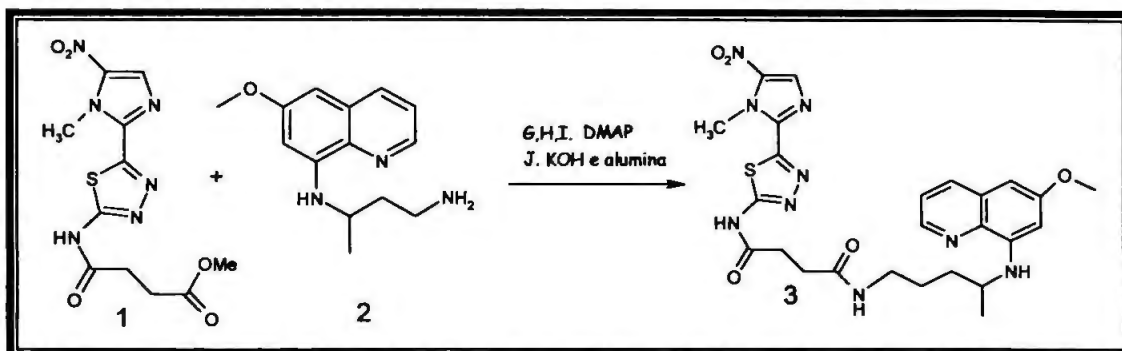
Método I

A síntese foi efetuada em ultra-som a partir do éster metílico do succinilmegazol, descrito em 2.1.2.2. A reação com a primaquina ocorreu utilizando-se DMAP em piridina.

Método J

A síntese foi efetuada em microondas a partir do éster metílico do succinilmegazol, como o descrito em 3.2.1.2.2. A reação com a primaquina ocorreu utilizando-se KOH em alumina básica.

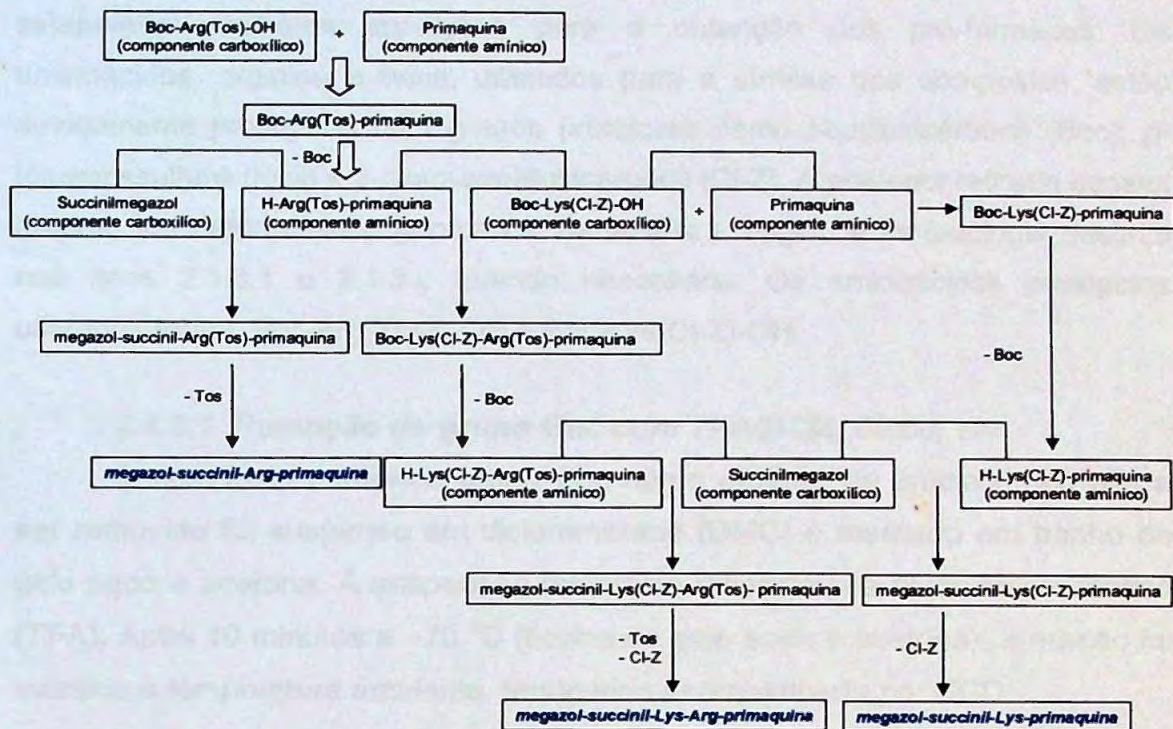
As reações compreendidas encontram-se a seguir.



ESQUEMA V: Rotas sintéticas propostas para a síntese de megazol e primaquina com espaçante não-peptídico partindo-se do éster metílico do succinilmegazol. Éster metílico do succinilmegazol (1) reage com primaquina (2) através dos métodos G, H e I ou através do método J para formar megazol-succinil-primaquina (3).

2.1.3 Metodologias utilizadas na tentativa de obtenção do pró-fármaco recíproco de primaquina e megazol com espaçante peptídico e aminoácido

Descreve-se, a seguir, a metodologia geral utilizada para a síntese dos derivados peptídicos, os aminoácidos utilizados e os métodos de desproteção descritos nos itens 2.1.3.1 e 2.1.3.2.



ESQUEMA VI: Metodologia para a obtenção dos derivados de aminoácido e peptídico. O acoplamento entre os componentes amínicos e os componentes carboxílicos foi realizado por acilação, utilizando-se como agente condensante carbodiimidás e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). Boc-Arg(Tos)-OH reagiu com primaquina para formar Boc-Arg(Tos)-primaquina. Após a retirada do grupo Boc obteve-se H-Arg(Tos)-primaquina. Este reagirá com succinilmegazol para obter megazol-succinil-Arg(Tos)-primaquina, que sofrerá desproteção do grupo Tosil para obtenção de megazol-succinil-Arg-primaquina. H-Arg(Tos)-primaquina reage com Boc-Lys(Cl-Z)-OH para formar Boc-Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)-primaquina que, após retirada do grupo Boc, reagirá com succinilmegazol para formação de megazol-succinil-Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)-primaquina. Esse composto será submetido à desproteção obtendo-se megazol-succinil-Lys-Arg-primaquina. Boc-Lys(Cl-Z)-OH reagiu com primaquina para formar Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina. Após retirada do grupo Boc obteve-se H-Lys(Cl-Z)-primaquina. Este reagiu com succinilmegazol para obtenção de megazol-succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina que, será submetido à desproteção do grupo (Cl-Z) para formação de megazol-succinil-Lys-primaquina.

O item 2.1.3.3 descreve as metodologias utilizadas na tentativa de se estabelecer melhores condições para a obtenção dos pró-fármacos. Os aminoácidos, arginina e lisina, utilizados para a síntese dos compostos, estão devidamente protegidos com grupos protetores como *t*-butiloxicarbonil (Boc), *p*-toluenossulfonil (tosil) e 2-cloro-benziloxicarbonil (Cl-Z). A posterior retirada desses grupos, em determinados pontos da via sintética, seguiu a metodologia descrita nos itens 2.1.3.1 e 2.1.3.2 quando necessária. Os aminoácidos protegidos utilizados foram: Boc-Arg(Tosil)-OH e Boc-Lys(Cl-Z)-OH.

2.1.3.1. Remoção do grupo Boc com TFA/DCM, 50:50, v/v

O composto contendo grupo Boc como protetor de amino grupo alfa a ser removido foi suspenso em diclorometano (DMC) e resfriado em banho de gelo seco e acetona. À suspensão resultante adicionou-se ácido trifluoracético (TFA). Após 10 minutos a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (banho de gelo seco e acetona), a reação foi mantida à temperatura ambiente, tendo sido acompanhada por CCD.

2.1.3.2 Remoção do grupo Tos E Cl-Z utilizando HF

O produto a ser desprotegido foi colocado em frasco de teflon e conectado ao sistema HF.

A seguir, resumem-se os métodos empregados nas etapas cumpridas para a obtenção do composto final

Os itens 2.1.3.3 e 2.1.3.4 referem-se aos métodos utilizados para a obtenção dos derivados de primaquina com aminoácidos. O item 2.1.3.5 descreve as metodologias utilizadas na tentativa de obtenção do composto megazol-succinil-lisina-primaquina.

2.1.3.3 Síntese de H-lisina(Cl-Z)-primaquina e H-Arginina(Tos)-primaquina

Síntese do Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina e Boc-Arg(Tos)-primaquina

Método A

Esta síntese seguiu a metodologia descrita por CHUNG *et al.* (1997). Tal metodologia consiste em acoplar o Boc-Lys(Cl-Z)-OH ou Boc-Arg(Tos)-OH com a primaquina, utilizando-se DIC e HOBt em DMF e trietilamina.

Método B

Esta metodologia consiste em acoplar o Boc-Lys(Cl-Z)-OH ou Boc-Arg(Tos)-OH com a primaquina utilizando-se EDC e HOBt em DMF e trietilamina. O tempo reacional foi determinado mediante seguimento por CCD.

Remoção do grupo Boc do composto Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina e Boc-Arg(Tos)-primaquina com TFA/DCM, 50:50, v/v

A desproteção do grupo Boc para obtenção de H-Lys(Cl-Z)-primaquina ou H-Arg(Tos)-primaquina seguiu a metodologia descrita no item 2.1.3.2.1.

2.1.3.4 Síntese de Lisina(Cl-Z)-Arginina(Tos)-primaquina

A síntese desse composto iniciou-se com o acoplamento entre a primaquina e o Boc-Arg(Tos)-OH e posterior retirada do grupo Boc como descrito no item 2.1.3.3. Após a obtenção do composto H-Arg(Tos)-primaquina.TFA, este reagiu com Boc-Lys(Cl-Z)-OH seguindo a metodologia B descrita anteriormente. Ao composto resultante realizou-se a desproteção do grupo protetor Boc obtendo-se Lisina(Cl-Z)-Arginina(Tos)-primaquina.TFA.

2.1.3.5 Síntese de megazol-succinil- lisina-primaquina

Descrevem-se a seguir as metodologias utilizadas na tentativa de obtenção do composto megazol-succinil-lisina-primaquina.

Método A

A síntese foi efetuada utilizando-se Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA, como citado no item 2.1.3.3. Succinilmegazol foi, posteriormente, submetido à reação com esse derivado, utilizando-se EDC/HOBt, em DMF e trietilamina, sob agitação à temperatura ambiente, com seguimento mediante CCD.

Método B

A síntese foi efetuada utilizando-se Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA, como citado no item 2.1.3.3. Succinilmegazol foi, posteriormente, submetido à reação com esse derivado, utilizando-se EDC/HOBt, em DMF e excesso de trietilamina, sob agitação à temperatura ambiente, com seguimento mediante CCD.

Método C

1ª etapa: Retirada do TFA

A retirada do TFA foi realizada, utilizando-se Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA e trietilamina, na proporção de 1 (Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA) para 4 (da trietilamina), em DMF. A mistura reacional permaneceu sob agitação à temperatura ambiente, tendo sido acompanhada por CCD.

2ª etapa: Acoplamento de H-Lys(Cl-Z)-primaquina e succinilmegazol

H-Lys(Cl-Z)-primaquina foi solubilizada em DMF e, em seguida adicionaram-se succinilmegazol, EDC e DMAP. A reação procedeu-se a temperatura ambiente, com tempo determinado mediante seguimento por CCD.

Método D

A síntese foi efetuada utilizando-se Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA, como citado no item 2.1.3.3. Succinilmegazol (excesso) foi, posteriormente, submetido à reação com esse derivado, utilizando-se EDC, em DMF e trietilamina, sob agitação à temperatura ambiente, com seguimento mediante CCD.

Método E

A síntese foi efetuada com base na formação do cloreto do succinilmegazol a partir do cloreto de tionila, para posterior reação com Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA em DMF e trietilamina.

Método F

A síntese foi efetuada com base na formação do cloreto do succinilmegazol a partir do cloreto de tionila, para posterior reação com excesso de Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA em DMF e trietilamina.

Método G

1ª etapa: Retirada do TFA

A retirada do TFA foi realizada, utilizando-se Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA e trietilamina, na proporção de 1 (Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA) para 4 (da

triethylamina), em DMF. A mistura reacional permaneceu sob agitação à temperatura ambiente, tendo sido acompanhada por CCD.

2ª etapa: Acoplamento de H-Lys(Cl-Z)-primaquina e éster metílico do succinilmegazol

A síntese foi efetuada a partir do éster metílico do succinilmegazol, descrito em 2.1.2.2. Este foi submetido à reação com a H-Lys(Cl-Z)-primaquina na presença de DMAP, sob atmosfera inerte e presença de peneira molecular em DMF.

Método H

1ª etapa: Síntese de Succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina

A síntese foi realizada, utilizando-se H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA e anidrido succínico, na proporção de 1 (H-Lys(Cl-Z)-primaquina) para 2,5 (do acilante), na presença de triethylamina. A mistura reacional foi submetida a refluxo.

2ª etapa: Acoplamento de Succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina e megazol

Succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina foi solubilizado em DMF sob banho de gelo seco e acetona. Em seguida, adicionaram-se megazol, EDC e DMAP. A reação permaneceu inicialmente sob agitação em banho de gelo seco e, em seguida, à temperatura ambiente por tempo determinado mediante seguimento por CCD.

2.2. Métodos Analíticos

2.2.1 Determinação da faixa de fusão

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

2.2.2 Análise no Infravermelho (IV)

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

2.2.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H

A análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) dos compostos obtidos foi efetuada em espectrômetro Bruker 300 MHz, modelo Advance DPX-300 da FCF-USP, empregando-se DMSO- d_6 como solvente.

2.2.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^{13}C

A análise de RMN ^{13}C dos compostos obtidos foi efetuada em espectrômetro Bruker 300 MHz, modelo Advance DPX-300 da FCF-USP e as medidas foram realizadas em 75 MHz, empregando-se DMSO- d_6 como solvente.

2.2.5. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

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

2.2.6. 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.

2.3. Avaliação da atividade biológica

Formas tripomastigotas

Os ensaios biológicos dos compostos foram realizados pelo Professor Dr. Sérgio Albuquerque, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto.

Inicialmente realizou-se ensaio *in vitro* sob as formas tripomastigotas (sanguíneas), utilizando-se cepas Y de *Trypanosoma sp.* Foi avaliada a porcentagem de lise parasitária e calculada a concentração inibitória (IC₅₀) dos compostos. Os ensaios foram realizados utilizando-se sangue de camundongos albinos infectados, obtido por punção cardíaca no pico parasitêmico (7^o dia da infecção - cepa Y). O sangue infectado foi diluído com sangue de camundongo sadio e soro bovino fetal, de forma a se obter concentração final de sangue a 70%, com aproximadamente 10⁶ formas tripomastigotas/mL. Soluções estoques

das substâncias foram preparadas por dissolução em DMSO. Adicionaram-se alíquotas desta solução estoque ao sangue infectado, de forma a se obter concentrações finais de 8, 32, 128 μM sendo que o ensaio foi realizado em placas de microtitulação (96 poços). O material foi incubado a 4 °C por 24 horas, sob agitação constante, sendo que, após este período, verificou-se a atividade quantitativamente (BRENER, 1962). Como controle de atividade, utilizou-se violeta de genciana nas mesmas concentrações acima relatadas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A determinação da atividade foi verificada, quantitativamente, pela contagem das formas tripomastigotas, de acordo com o método descrito por BRENER (1962), e determinação da porcentagem de lise parasitária, por meio da comparação com o grupo controle sem tratamento. Outro parâmetro analisado foi a determinação do IC_{50} . A tabela a seguir apresenta as associações testadas.

TABELA II: Associações testadas em formas tripomastigotas de cepas Y

COMPOSTOS
primaquina
megazol
primaquina + megazol
succinilprimaquina
succinilmegazol
éster metílico do succinilmegazol
succinilprimaquina + megazol
primaquina + succinilmegazol
megazol-succinil-primaquina (pró-fármaco)

** controle positivo – violeta-de-genciana a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\text{IC}_{50} = 76 \mu\text{M}$);
***controle negativo – sangue infectado + 5% de DMSO.

IV. EXPERIMENTOS

1. SÍNTESE DO MEGAZOL

1.1. Síntese de benzoato derivado

Reagiu-se o 1,2-dimetil-5-nitroimidazol (3,5 g - 25 mmol) com cloreto de benzoíla (8,7 mL - 75 mmol), na presença de trietilamina (10,4 mL - 75 mmol), em dioxano (51 mL). A reação permaneceu sob agitação e refluxo por 18 horas. Após completar a reação resfriou-se e adicionou-se éter etílico para precipitação. O produto foi filtrado e o precipitado lavado com éter etílico. O produto foi recristalizado em clorofórmio e após a filtração o precipitado foi lavado com éter etílico. A reação compreendida encontra-se no esquema II.

1.2. Síntese de oxima derivada

O benzoato (3,5 g - 10 mmol) foi dissolvido em H_2SO_4 , sob banho de gelo. Em seguida, $NaNO_2$ (1,37 g - 20 mmol) foi adicionado lentamente. A reação permaneceu sob agitação e banho de gelo durante 1 hora. Em seguida, procedeu-se à hidrólise com gelo picado. O produto foi filtrado e o precipitado lavado com água gelada. A reação compreendida encontra-se no esquema II.

1.3. Síntese do 1-metil-2-ciano-5-nitroimidazol

Reagiu-se a oxima (1,88 g - 6,5 mmol) com o cloreto de tionila (9,5 mL). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente durante 4 horas após o início da ebulição. Após completar a reação, o produto foi submetido à destilação para a retirada do cloreto de tionila. O produto foi neutralizado com NH_4OH , em seguida filtrado e o precipitado lavado com éter etílico. A reação compreendida encontra-se no esquema II.

1.4. Síntese do megazol

Reagiu-se o 1-metil-2-ciano-5-nitroimidazol (0,3 g – 2 mmol) com a tiossemicarbazida (0,18 g - 2 mmol) em ácido trifluoracético (4,03 mL - 54 mmol). A reação permaneceu a 40 °C, durante 12 horas. Após completar esse período o produto foi neutralizado com NH₄OH para a precipitação. Em seguida, realizou-se a filtração e o precipitado foi lavado com água gelada. A reação compreendida encontra-se no esquema II.

2. SÍNTESE DO PRÓ-FÁRMACO RECÍPROCO DE PRIMAQUINA E MEGAZOL COM ESPAÇANTE NÃO-PEPTÍDICO

Os itens 2.1, 2.2 e 2.3 descrevem os experimentos efetuados para a obtenção dos intermediários e o item 2.4 descreve os experimentos correspondentes à tentativa de obtenção do composto desejado.

2.1 Síntese do succinilmegazol

Megazol (0,15 g - 0,7 mmol) foi dissolvido em etanol (30 mL) por cerca de 30 minutos com auxílio de ultra-som e levado, posteriormente, para refluxo. Ao iniciar o refluxo, anidrido succínico foi adicionado (0,8 g - 0,8 mmol) e a reação permaneceu sob refluxo por 4 horas. Após esse período, o produto foi resfriado e em seguida, procedeu-se à filtração. O precipitado foi submetido à secagem em bomba de alto vácuo. A reação compreendida encontra-se no esquema IV.

2.2 Síntese do éster metílico do succinilmegazol

2.2.1 Síntese de 4-cloro-4-oxabutanoato de metila

Metanol anidro (40 mL) foi mantido em agitação para posterior adição de sódio metálico (2,99 g - 0,13 mol). Após ter sido completada a reação (final da liberação do gás), adicionou-se anidrido succínico (12,96 g - 0,13 mol), sob agitação. A reação permaneceu sob refluxo por 4 horas. Após completar esse período, o metanol foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se sólido cristalino de coloração amarelada. Adicionou-se clorofórmio (25 mL) ao sólido obtido e procedeu-se à lavagem desta fase com solução diluída de ácido clorídrico 10% (25 mL). Após a secagem com sulfato de sódio, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. Ao sólido obtido, adicionou-se cloreto de tionila (50,8 mL – 0,7 mol) e a reação permaneceu a 90 °C, por 5 horas. Após completar esse período procedeu-se à destilação para a retirada do cloreto de tionila em excesso, obtendo-se um líquido incolor correspondente ao 4-cloro-4-oxabutanoato de metila. A reação compreendida encontra-se no esquema III.

2.2.2 Obtenção do éster metílico do succinilmegazol

Megazol (0,21 g - 1 mmol) foi dissolvido em tetraidrofurano e, em seguida, adicionou-se DMAP (8 g - 8 mmol). O sistema foi fechado e levado para refluxo sob atmosfera de argônio. Em seguida, adicionou-se 4-cloro-4-oxabutanoato de metila (1 mL - 8 mmol) por gotejamento lento, com auxílio de uma seringa. A reação permaneceu sob refluxo por 5 horas. Após completar esse período, a suspensão foi filtrada e o precipitado lavado com água destilada. O produto foi submetido à secagem em dessecador com pentóxido de fósforo. A reação compreendida encontra-se no esquema III.

2.3. Síntese da succinilprimaquina

Fosfato de primaquina (16 g - 38 mmol) foi dissolvido em etanol e, em seguida, trietilamina foi adicionada (31 mL - 228 mmol). Ao iniciar o refluxo, adicionou-se anidrido succínico (5,2 g - 52 mmol) e a reação permaneceu por mais uma hora. O produto foi resfriado sob agitação e, em seguida, adicionou-se água e o solvente foi evaporado. Após a precipitação, procedeu-se à filtração. O produto foi recristalizado em acetona. A reação compreendida encontra-se no esquema IV.

2.4 Síntese do produto final derivado de primaquina e megazol com espaçante não-peptídico

Método A

Succinilprimaquina (0,30 g - 0,84 mmol) foi dissolvida em DFM (8 mL) e, em seguida, DCC (0,20 g - 1 mmol) foi adicionado. A mistura permaneceu sob agitação por 40 minutos. Após completar esse período, DMAP (0,01 g - 0,084 mmol) e megazol (0,20 g - 0,94 mmol) foram adicionados, permanecendo sob refluxo por aproximadamente 38-40 horas. A reação foi acompanhada por CCD (CHCl₃:MeOH, 95:5). Após o término da reação, adicionou-se água e procedeu-se à filtração. O produto foi submetido à secagem em bomba de alto vácuo. A reação compreendida encontra-se no esquema IV.

Método B

Fosfato de primaquina (0,16 g - 0,35 mmol) foi dissolvido em DMF (30 mL) e trietilamina (0,27 mL - 2,1 mmol), sob banho de gelo seco e acetona. Em seguida, adicionou-se succinilmegazol (0,14 g - 0,45 mmol) e HOBt (0,06 g - 0,45 mmol) e DCC (0,09 g - 0,45 mmol) foram adicionados lentamente, também sob banho de gelo. A reação procedeu-se à temperatura ambiente, sob

agitação, por aproximadamente 38-40 horas, tendo sido acompanhada por CCD (CHCl_3 :MeOH:HAc, 95:5:3, v/v/v). Após o término da reação, adicionou-se água e procedeu-se à filtração. O produto foi submetido à secagem em bomba de alto vácuo. A reação compreendida encontra-se no esquema IV.

Método C

Megazol (0,74 g - 3,5 mmol) foi dissolvido em diclorometano (45 mL) resfriado em banho de gelo seco e acetona. Em seguida, adicionaram-se succinilprimaquina (1,43 g - 4 mmol), HOBt (0,54 g - 4 mmol) e DIC (0,50 g - 4 mmol). A reação permaneceu à temperatura ambiente, sob agitação, durante 52 horas, tendo sido acompanhada por CCD (CHCl_3 :MeOH:ACOH, 95:5:3, v/v/v). Após completar esse período, a suspensão foi filtrada. O produto foi submetido à secagem em dessecador com pentóxido de fósforo. A reação compreendida encontra-se no esquema IV.

Método D

Fosfato de primaquina (0,36 g - 0,8 mmol) foi dissolvido em DCM (35 mL), resfriado em banho de gelo seco e acetona e neutralizado pela adição de trietilamina (0,61 mL - 4,8 mmol). O pH da solução foi ajustado para 7-8. Em seguida, adicionaram-se succinilmegazol (0,3 g - 0,96 mmol), HOBt (0,13 g - 0,96 mmol) e DIC (0,12 g - 0,96 mmol). A reação permaneceu à temperatura ambiente, sob agitação, durante 52 horas, tendo sido acompanhada por CCD (CHCl_3 :MeOH:ACOH, 95:5:3, v/v/v). Após completar esse período, adicionou-se éter etílico para precipitação e procedeu-se à filtração. O produto foi submetido à secagem em dessecador com pentóxido de fósforo. A reação compreendida encontra-se no esquema IV.

Método E

A suspensão succinilprimaquina (0,36 g - 1,0 mmol) em água (40 mL) permaneceu em ultra-som por 40 minutos. Em seguida, adicionaram-se o agente acoplante EDC (0,19 g - 1,0 mmol) e HOBt (0,27 g - 2,0 mmol). Esta suspensão foi vertida à solução de megazol (0,19 g - 0,93 mmol) em DMF (55 mL), sendo a mistura reacional mantida a 0 °C por 4 h, sob agitação magnética, seguida de nova adição de EDC (0,19 g - 1,0 mmol), e mantida à temperatura ambiente por 24 h, também sob agitação. Após 72 horas sob agitação à temperatura ambiente, adicionaram-se novamente EDC (0,38 g - 2,0 mmol) e HOBt (0,27 g - 2,0 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação por mais 72 horas. Durante todo esse período a reação foi acompanhada por CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). A reação compreendida encontra-se no esquema IV.

Método F

Fosfato de primaquina (0,23 g - 0,5 mmol) foi dissolvido em DMF (38 mL) e trietilamina (0,42 mL - 3,3 mmol) sob banho de gelo seco e acetona. Em seguida, adicionaram-se succinilmegazol (0,2 g - 0,64 mmol), DMAP (0,006 g - 0,05 mmol) e EDC (0,12 g - 0,64 mmol). A reação permaneceu sob banho de gelo por aproximadamente 1 hora e por 24 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Após o término da reação, adicionou-se água e procedeu-se à filtração. O produto foi submetido à secagem sob pressão reduzida. A reação compreendida encontra-se no esquema IV.

Método G

Fosfato de primaquina (0,16 g - 0,36 mmol) foi solubilizado em DMF (8 mL) e trietilamina (0,25 mL - 2 mmol). Em seguida, adicionaram-se éster metílico do succinilmegazol (0,1 g - 0,31 mmol) e DMAP (0,007 g - 0,061 mmol). A reação permaneceu sob refluxo por 6 horas. Após completar esse período, DMF foi evaporado sob pressão reduzida. Ao produto resultante, adicionou-se água e procedeu-se à filtração. A reação compreendida encontra-se no esquema V.

Método H

Fosfato de primaquina (0,16 g - 0,36 mmol) foi solubilizado em DMF (8 mL) e trietilamina (0,25 mL - 2 mol), sob banho de gelo seco e acetona. Em seguida, adicionaram-se éster metílico do succinilmegazol (0,1 g - 0,36 mmol) e DMAP (0,007 g - 0,061 mmol). A reação permaneceu sob refluxo por 16 horas, sob atmosfera inerte e peneira molecular. Após completar esse período, DMF foi evaporado sob pressão reduzida. Ao produto resultante, adicionou-se água e procedeu-se à filtração. A reação compreendida encontra-se no esquema V.

Método I

Fosfato de primaquina (0,16 g - 0,36 mmol) foi dissolvido em piridina (13 mL). Em seguida, adicionaram-se o éster metílico do succinilmegazol (0,1 g - 0,36 mmol) e DMAP (0,007 g - 0,061 mmol). A reação permaneceu em ultrassom por 24 horas. Durante todo esse período a reação foi acompanhada por CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). A reação compreendida encontra-se no esquema V.

Método J

Em grau de porcelana adicionaram-se fosfato de primaquina (0,45 g - 1 mmol), éster metílico do succinilmegazol (0,32 g - 1 mmol) e alumina básica

(0,2 g). Os produtos foram triturados com auxílio de um pistilo. Em seguida, a reação procedeu-se em microondas em posição central, durante 5 minutos. Após completar esse período, o produto foi ressuspenso em DMF e transferido para um balão de fundo redondo. Em seguida, procedeu-se à destilação para a retirada do solvente. A reação compreendida encontra-se no esquema V.

3. SÍNTESE DO PRÓ-FÁRMACO RECÍPROCO DE PRIMAQUINA E MEGAZOL COM ESPAÇANTE PEPTÍDICO

Os itens 3.1, 3.2 e 3.3 referem-se aos experimentos utilizados na obtenção dos derivados de primaquina com aminoácidos, para posterior acoplamento com o succinilmegazol. O item 3.4 descreve os experimentos utilizados na tentativa de obtenção do composto final, utilizando-se como espaçante a lisina.

3.1 Síntese de Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA

3.1.1 Síntese do Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina

Método A

Fosfato de primaquina (0,27 g - 0,6 mmol) foi dissolvido em DMF (5 mL) e trietilamina (0,5 mL - 3,6 mmol), sob banho de gelo e acetona. Boc-Lys(Cl-Z)-OH (0,33 g - 0,8 mmol) foi adicionado e em seguida, adicionaram-se HOBt (0,11 g - 0,8 mmol) e DIC (0,12 mL - 0,8 mmol). A reação foi efetuada à temperatura ambiente durante 12 horas. Solução de carbonato de sódio 0,2 M (mesmo volume de DMF) foi adicionada à mistura de reação e o produto foi extraído com éter etílico e lavado com solução de ácido cítrico 0,2 M até o aparecimento de apenas uma mancha na fase orgânica, mediante seguimento

com CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Após a secagem com sulfato de sódio, os solventes foram eliminados em rotaevaporador, à temperatura ambiente e o produto foi suspenso em água e liofilizado.

Método B

Fosfato de primaquina (0,27 g - 0,6 mmol) foi dissolvido em DMF e trietilamina (0,5 mL - 3,6 mmol), sob banho de gelo e acetona. Boc-Lys(Cl-Z)-OH (0,33 g - 0,8 mmol) foi adicionado e em seguida, adicionaram-se HOBt (0,11 g - 0,8 mmol) e EDC (0,15 g - 0,8 mmol). A reação permaneceu sob banho de gelo seco por aproximadamente 1 hora e por 24 horas sob agitação em temperatura ambiente, tendo sido acompanhada por CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Solução de carbonato de sódio 0,2 M (mesmo volume de DMF) foi adicionada à mistura de reação e o produto foi extraído com éter etílico e lavado com solução de ácido cítrico 0,2 M até o aparecimento de apenas uma mancha na fase orgânica, mediante seguimento com CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Após a secagem com sulfato de sódio, os solventes foram eliminados em evaporador rotatório à temperatura ambiente e o produto foi suspenso em água e liofilizado.

3.1.2. Remoção do grupo Boc do composto Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina com TFA/DCM, 50:50, v/v

Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina (0,19 g - 0,3 mmol) foi suspenso em DCM (2 mL), sob banho de gelo seco e acetona. Em seguida, adicionou-se TFA (2 mL) e a reação foi mantida a -70 °C, sob agitação por 10 minutos e sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período, diclorometano e TFA foram eliminados em evaporador rotatório à temperatura ambiente e o produto foi lavado com éter etílico. A porção etérea foi descartada

e o produto resultante foi submetido à secagem em bomba de alto vácuo. Em seguida, o produto foi suspenso em água e liofilizado.

3.2. Síntese de Arg(Tos)-primaquina.TFA

3.2.1 Síntese do Boc-Arg(Tos)-primaquina

Método A

Fosfato de primaquina (0,27 g - 0,6 mmol) foi dissolvido em DMF (5 mL) e trietilamina (0,5 mL – 3,6 mmol), sob banho de gelo e acetona. Boc-Arg(Tos)-OH (0,35 g - 0,8 mmol) foi adicionado e em seguida, adicionaram-se HOBt (0,11 g - 0,8 mmol) e DIC (0,12 mL - 0,8 mmol). A reação foi efetuada à temperatura ambiente durante uma noite. Solução de carbonato de sódio 0,2 M (mesmo volume de DMF) foi adicionada à mistura de reação e o produto foi extraído com éter etílico e lavado com solução de ácido cítrico 0,2 M até o aparecimento de apenas uma mancha na fase orgânica, mediante seguimento com CCD. Após a secagem com sulfato de sódio, os solventes foram eliminados em rotaevaporador à temperatura ambiente e o produto foi suspenso em água e liofilizado.

Método B

Fosfato de primaquina (0,27 g - 0,6 mmol) foi dissolvido em DMF (5 mL) e trietilamina (0,5 mL – 3,6 mmol), sob banho de gelo e acetona. Boc-Arg(Tos)-OH (0,35 - 0,8 mmol) foi adicionado e em seguida, adicionaram-se HOBt (0,11 g - 0,8 mmol) e EDC (0,15 g - 0,8 mmol). A reação permaneceu sob banho de gelo seco por aproximadamente 1 hora e por 24 horas, sob agitação à temperatura ambiente, tendo sido acompanhada por CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Solução de carbonato de sódio 0,2 M (mesmo volume DMF) foi adicionada à mistura de reação e o produto foi extraído com éter etílico e lavado com solução de ácido cítrico 0,2 M até o aparecimento de apenas uma mancha na fase orgânica,

mediante seguimento com CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Após a secagem com sulfato de sódio, os solventes foram eliminados em rotaevaporador à temperatura ambiente e o produto foi suspenso em água e liofilizado.

3.2.2. Remoção do grupo Boc do composto Boc-Arg(Tos)-primaquina com TFA/DCM, 50:50, v/v

Boc-Arg(Tos)-primaquina (0,19 g - 0,3 mmol) foi suspenso em DCM (2 mL), sob banho de gelo seco e acetona. Em seguida, adicionou-se TFA (2 mL) e a reação foi mantida a -70 °C, sob agitação por 10 minutos e sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período, DCM e TFA foram eliminados em rotaevaporador à temperatura ambiente e o produto foi lavado com éter etílico. A porção etérea foi descartada e o produto resultante foi submetido à secagem em bomba de alto vácuo. Em seguida, o produto foi suspenso em água e liofilizado.

3.3. Síntese de Lys(Cl-Z) Arg(Tos)-primaquina.TFA

Arg(Tos)-primaquina.TFA (0,37 g - 0,55 mmol) foi dissolvido em DMF (5 mL) e trietilamina (0,07 mL - 0,5 mmol), sob banho de gelo e acetona. Boc-Lys(Cl-Z)-OH (0,27 g - 0,66 mmol) foi adicionado e em seguida, HOBt (0,09 g - 0,66 mmol) e EDC (0,13 g - 0,66 mmol). A reação permaneceu sob banho de gelo seco por aproximadamente 1 hora e por 24 horas, sob agitação à temperatura ambiente, tendo sido acompanhada por CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Solução de carbonato de sódio 0,2 M (mesmo volume de DMF) foi adicionada à mistura de reação e o produto foi extraído com éter etílico e lavado com solução de ácido cítrico 0,2 M até o aparecimento de apenas uma mancha na fase orgânica, mediante seguimento com CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Após a secagem com sulfato de sódio, os solventes foram eliminados em

rotaevaporador à temperatura ambiente, o produto foi suspenso em água e liofilizado.

3.3.1. Remoção do grupo Boc do composto Boc-Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)-primaquina com TFA/DCM, 50:50, v/v

Boc-Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)-primaquina (0,31 g - 0,3 mmol) foi suspenso em DCM (2 mL), sob banho de gelo seco e acetona. Em seguida, adicionou-se TFA (2 mL) e a reação foi mantida a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação por 10 minutos e sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período, DCM e TFA foram eliminados em rotaevaporador à temperatura ambiente e o produto foi lavado com éter etílico. A porção etérea foi descartada e o produto resultante foi submetido à secagem em bomba de alto vácuo. Em seguida, o produto foi suspenso em água e liofilizado.

3.4. Síntese de megazol-succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina

Método A

Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (0,19 g - 0,3 mmol) foi suspenso em DMF (5 mL) e trietilamina (0,04 mL - 0,3 mmol), sob banho de gelo seco e acetona. Succinilmegazol (0,11 g - 0,36 mmol) foi adicionado e, em seguida, HOBt (0,04 g - 0,36 mmol) e EDC (0,07 g - 0,36 mmol). A reação permaneceu sob banho de gelo seco por aproximadamente 1 hora e, por 24 horas, sob agitação à temperatura ambiente, tendo sido acompanhada por CCD (CHCl_3 : MeOH: HAc, 95:5:3). Solução de carbonato de sódio 0,2 M (mesmo volume de DMF) foi adicionada à mistura de reação e o produto foi extraído com éter etílico e lavado com solução de ácido cítrico 0,2 M até o aparecimento de apenas uma mancha na fase orgânica, mediante seguimento com CCD (CHCl_3 : MeOH: HAc, 95:5:3). Após a secagem com sulfato de sódio, os solventes foram eliminados em

rotaevaporador à temperatura ambiente e o produto foi submetido à secagem em bomba de alto vácuo.

Método B

Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (0,2 g - 0,3 mmol) foi suspenso em DMF (5 mL) e trietilamina (0,04 mL - 0,3 mmol), sob banho de gelo seco e acetona. Succinilmegazol (0,11 g - 0,36 mmol) foi adicionado e, em seguida, HOBt (0,04 g - 0,36 mmol) e EDC (0,07 g - 0,36 mmol). A reação permaneceu sob banho de gelo seco por aproximadamente 1 hora e, posteriormente, sob agitação à temperatura ambiente por 12 horas, seguida de nova adição de trietilamina (0,04 mL). Manteve-se à temperatura ambiente por mais 24 horas, também sob agitação, acompanhando-se por CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Solução de carbonato de sódio 0,2 M (mesmo volume de DMF) foi adicionada à mistura de reação e o produto foi extraído com éter etílico e lavado com solução de ácido cítrico 0,2 M até o aparecimento de apenas uma mancha na fase orgânica, mediante seguimento com CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Após a secagem com sulfato de sódio, os solventes foram eliminados em rotaevaporador à temperatura ambiente e o produto foi submetido à secagem em bomba de alto vácuo.

Método C

- 1ª etapa

Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (0,19 g - 0,3 mmol) foi suspenso em DMF (5 mL) e trietilamina (0,1 mL - 0,72 mmol), sob banho de gelo seco e acetona. Essa mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por aproximadamente 18 horas, tendo sido acompanhada por CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Após esse período adicionou-se água e o produto foi extraído com éter etílico. Após a secagem com sulfato de sódio, os solventes foram

eliminados em rotaevaporador à temperatura ambiente e o produto foi suspenso em água e liofilizado.

- 2ª etapa

H-Lys(Cl-Z)-primaquina (0,07 g - 0,14 mmol) foi dissolvido em DMF (10 mL), sob banho de gelo seco e acetona. Em seguida, juntou-se succinilmegazol (0,036 g - 0,12 mmol), DMAP (0,0017 g - 0,014 mmol) e EDC (0,02 g - 0,12 mmol). A reação permaneceu sob banho de gelo por aproximadamente 1 hora e por 28 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Após o término da reação, adicionou-se água e procedeu-se à filtração. O produto foi suspenso em água e liofilizado.

Método D

Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (0,19g – 0,3 mmol) foi suspenso em DMF e trietilamina (0,04 mL – 0,3 mmol), sob banho de gelo seco e acetona. Succinilmegazol (0,2g – 0,6 mmol) e EDC (0,05 g – 0,3 mmol) foram adicionados. A reação permaneceu sob banho de gelo seco por aproximadamente 1 hora, e em seguida, sob agitação à temperatura ambiente por mais 24 horas, acompanhando-se por CCD. Após o término da reação adicionou-se água e procedeu-se à filtração. O produto resultante foi suspenso em água e liofilizado.

Método E

Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (0,84 g – 1,34 mmol) foi dissolvido em DMF e trietilamina (0,3 mL – 2,68 mmol) e, em seguida, adicionou-se succinilmegazol (0,4 g – 1,34 mmol). O sistema foi fechado sob atmosfera de argônio e cloreto de tionila (0,1 mL – 1,34 mmol) foi adicionado por gotejamento lento, com

auxílio de uma seringa. A reação permaneceu à temperatura ambiente por 24 horas.

Método F

Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (1,68 g – 2,68 mmol) foi dissolvido em DMF e trietilamina (0,57 mL – 4 mmol) e, em seguida, adicionou-se succinilmegazol (0,4 g – 1,34 mmol). O sistema foi fechado sob atmosfera de argônio e cloreto de tionila (0,1 mL – 1,34 mmol) foi adicionado por gotejamento lento, com auxílio de uma seringa. A reação permaneceu à temperatura ambiente por 24 horas.

Método G

- 1ª etapa

Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (0,19 g - 0,3 mmol) foi suspenso em DMF (5 mL) e trietilamina (0,1 mL – 0,72 mmol), sob banho de gelo seco e acetona. Essa mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por aproximadamente 18 horas, tendo sido acompanhada por CCD (CHCl₃: MeOH: HAc, 95:5:3). Após esse período adicionou-se água e o produto foi extraído com éter etílico. Após a secagem com sulfato de sódio, os solventes foram eliminados em rotaevaporador à temperatura ambiente e o produto foi suspenso em água e liofilizado.

- 2ª etapa

Lys(Cl-Z)-primaquina (0,07 g - 0,14 mmol) foi dissolvido em DMF (10 mL), em seguida, adicionaram-se éster metílico do succinilmegazol (0,1 g - 0,31 mmol) e DMAP (0,007 g - 0,061 mmol). A reação permaneceu sob refluxo por 12 horas. Após completar esse período, DMF foi evaporado sob pressão reduzida. Ao produto resultante, adicionou-se água e procedeu-se à filtração.

Método H

-1ª etapa

Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (0,28 g - 0,44 mmol) foi dissolvido em EtOH (10 mL) e trietilamina (0,7 mL – 5 mmol). Em seguida, adicionou-se anidrido succínico (0,05 g – 0,5 mmol). Ao iniciar o refluxo, adicionou-se nova porção de anidrido succínico (0,05 g – 0,5 mmol). A reação permaneceu sob refluxo por mais 6 horas. Após completar esse período, o solvente foi evaporado em rotaevaporador e o restante foi lavado com água destilada e filtrado. Em seguida, o produto resultante foi suspenso em água e liofilizado.

2ª etapa

Succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina foi dissolvido em trietilamina sob banho de gelo seco e acetona. Em seguida adicionaram-se megazol, DMAP e EDC. A reação permaneceu sob banho de gelo seco por aproximadamente 1 hora, e em seguida, sob agitação à temperatura ambiente por mais 24 horas tendo sido acompanhada por CCD. Após completar esse período, adicionou-se água e procedeu-se à filtração. O produto resultante foi suspenso em água e liofilizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. RESULTADOS

1.1 Síntese

Os resultados referentes ao rendimento, à faixa de fusão e às características físicas dos produtos obtidos estão dispostos nas tabelas III (síntese do megazol), IV (síntese dos intermediários utilizados na tentativa de obtenção do pró-fármaco com espaçante succínico), V (síntese do pró-fármaco com espaçante não-peptídico) e VI (síntese dos derivados de primaquina e megazol com espaçante peptídico).

TABELA III: Caracterização dos intermediários da síntese do megazol

Produto obtido	Rendimento (%)	P.f. (°C)	Características
1,2-dimetil-5-nitroimidazol	42	122-125	Sólido cristalino branco
benzoato derivado	51	173-175	Sólido cristalino amarelo
oxima derivada	69	175-180	Sólido cristalino branco
1-metil-2-ciano-5-nitroimidazol	52	68-70	Sólido cristalino caramelo
megazol	43	270-271	Sólido cristalino amarelo forte

TABELA IV: Caracterização dos intermediários utilizados na obtenção do derivado de primaquina e megazol com espaçante não-peptídico

Produto obtido	Rendimento (%)	P.f. (°C)	Características
succilmegazol	92	280 ^a	Sólido cristalino amarelo claro
4-cloro-4-oxabutanoato de metila	40	ND	Líquido incolor densidade 1,223 ± 0,006 g/mL
éster metílico do succinilmegazol	75	ND*	Sólido cristalino amarelo claro
succinilprimaquina	59	142-145	Sólido cristalino amarelo

a – ponto de decomposição

ND – não determinado / * produto não disponível

TABELA V: Caracterização do derivado de megazol e primaquina com espaçante não-peptídico

Produto obtido	Rendimento (%)	P.f. (°C)	Características
megazol-succinil- primaquina	72	184 ^a	Sólido cristalino amarelado

a- ponto de fusão com decomposição

TABELA VI: Caracterização dos derivados de primaquina com espaçante peptídico

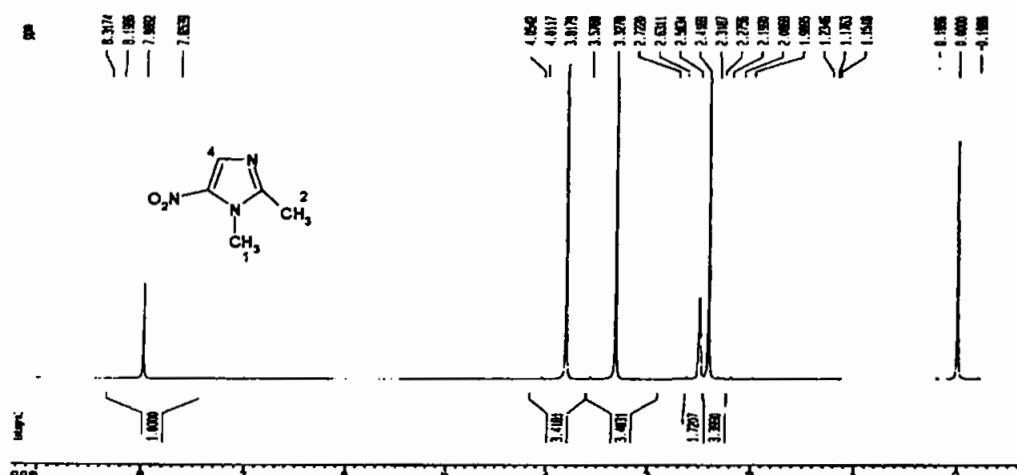
Produto obtido	Rendimento (%)	P.f. (°C)	Características
Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina	51	125-128	Sólido cristalino amarelo
H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA	90	ND	Sólido cristalino amarelo
Boc-Arg(Tos)-primaquina	30	138-140	Sólido cristalino amarelo
H-Arg(Tos)-primaquina.TFA	ND	ND	Sólido cristalino amarelo
Boc-Lys(Cl-Z)- Arg(Tos)- primaquina	ND	152-160	Sólido cristalino amarelo
Succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina	85	ND	Sólido cristalino amarelo

ND – não determinado (produtos higroscópicos)

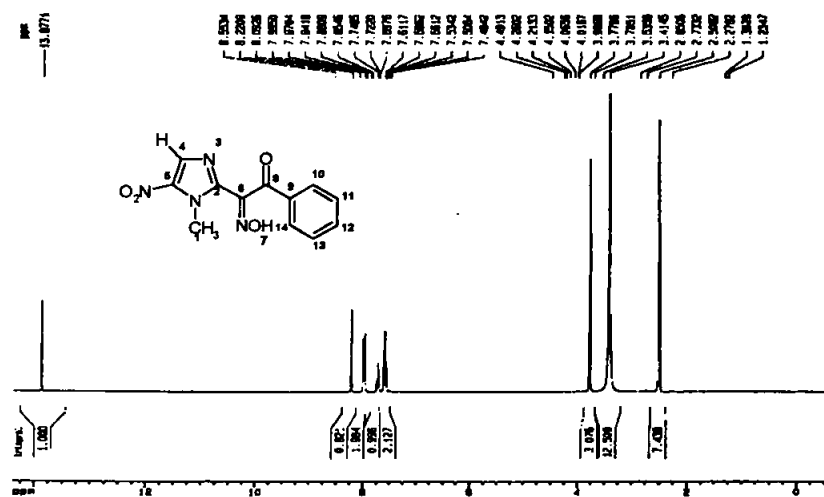
1.2. Análises espectroscópicas dos compostos

1.2.1. Análises espectroscópicas dos intermediários da síntese do megazol

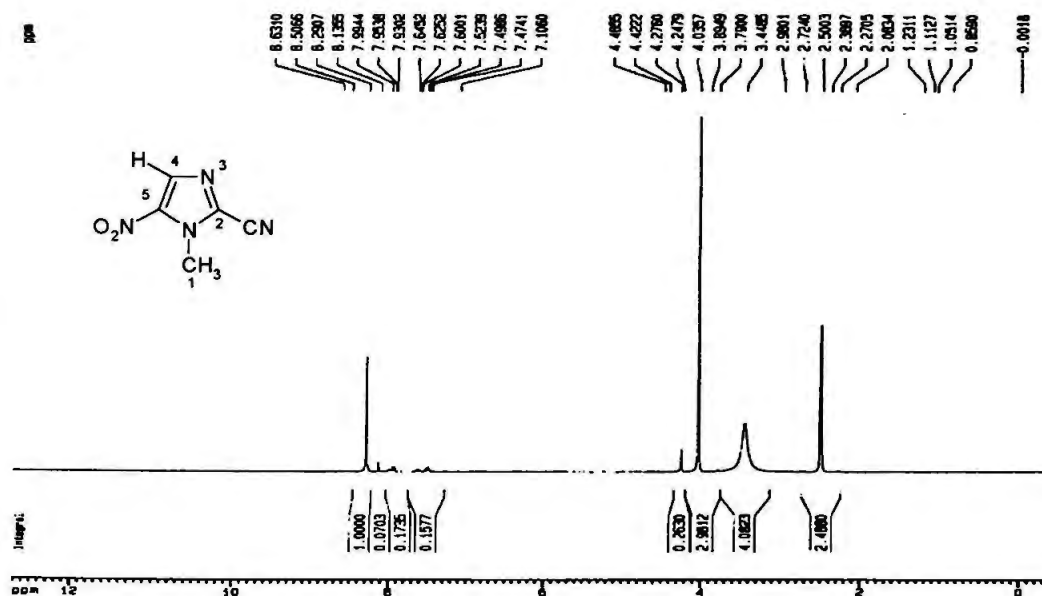
As tabelas VII a XIII apresentam dados obtidos nas análises espectroscópicas de RMN ¹H, RMN ¹³C e infravermelho dos intermediários da síntese do megazol.

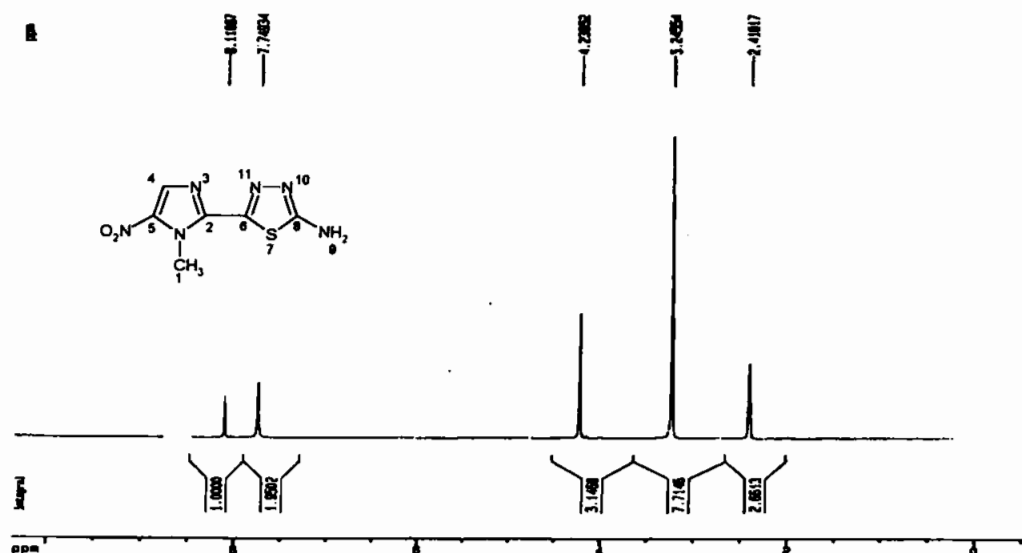
Espectro 1 - RMN ^1H de 1,2-dimetil-5-nitroimidazol.TABELA VII: Análise de RMN ^1H de 1,2-dimetil-5-nitroimidazol

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)
2,41 (s, 3H, H ₂); 3,81 (s, 3H, H ₁); 7,98 (s, 1H, H ₄)

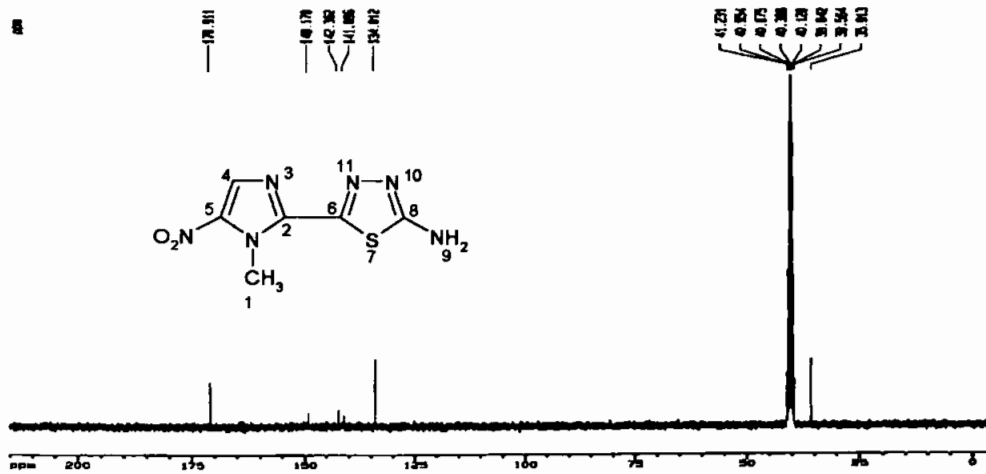
Espectro 3 - RMN ¹H de oxima derivada.TABELA XI: Análise de RMN ¹H de oxima

RMN - 1H (DMSO-d ₆ , 300MHz, δ=ppm)
3,77 (s, 3H, H ₁); 7,56-7,61 (t, 2H, H ₁₃ , H ₁₁); 7,69 – 7,74 (t, 1H, H ₁₂); 7,95-7,99 (d, 1H, H ₁₄ , H ₁₀); 8,22 (s, 1H, H ₄); 13,83 (s, 1H, H ₇)

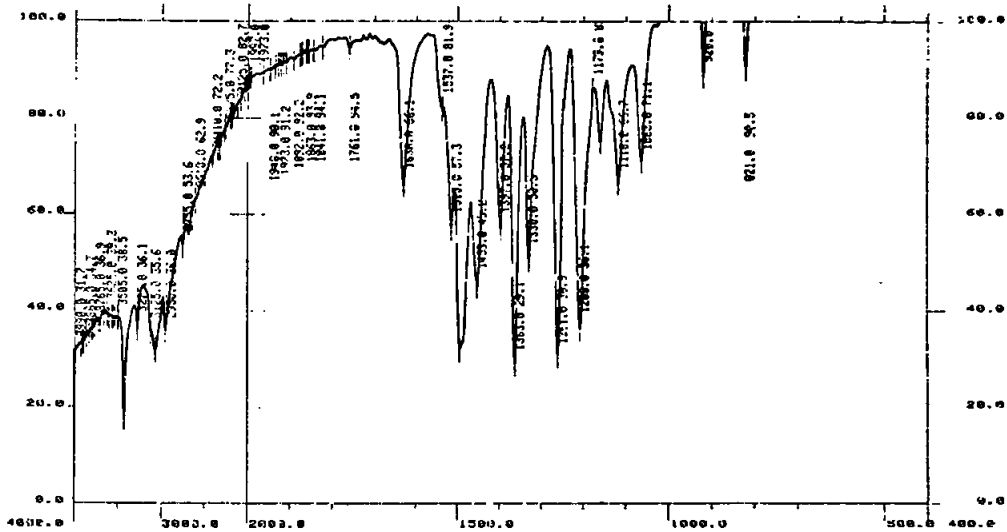
Espectro 4 - RMN ¹H de 1-metil-2-ciano-5-nitroimidazol.TABELA X: Análise de RMN ¹H de 1-metil-2-ciano-5-nitroimidazolRMN - 1H (DMSO-d₆, 300MHz, δ=ppm)3,79 (t, 3H, H₁); 8,29 (s, 1H, H₄)

Espectro 5 - RMN ¹H de megazol.TABELA XI: Análise de RMN ¹H de megazol

RMN - 1H (DMSO-d ₆ , 300MHz, δ=ppm)
4,23 (t, 3H, H ₁); 7,74 (d, 2H, H ₉); 8,11 (s, 1H, H ₄)

Espectro 6 - RMN ¹³C do megazol.TABELA XII: Análise de RMN ¹³C do megazol

RMN C ¹³ (DMSO-d ₆ , 75 MHz, δ=ppm)
35,91 (C ₁); 134,01 (C ₄); 141,09(C ₅);142,36(C ₂); 149,17(C ₈); 170,91(C ₆)



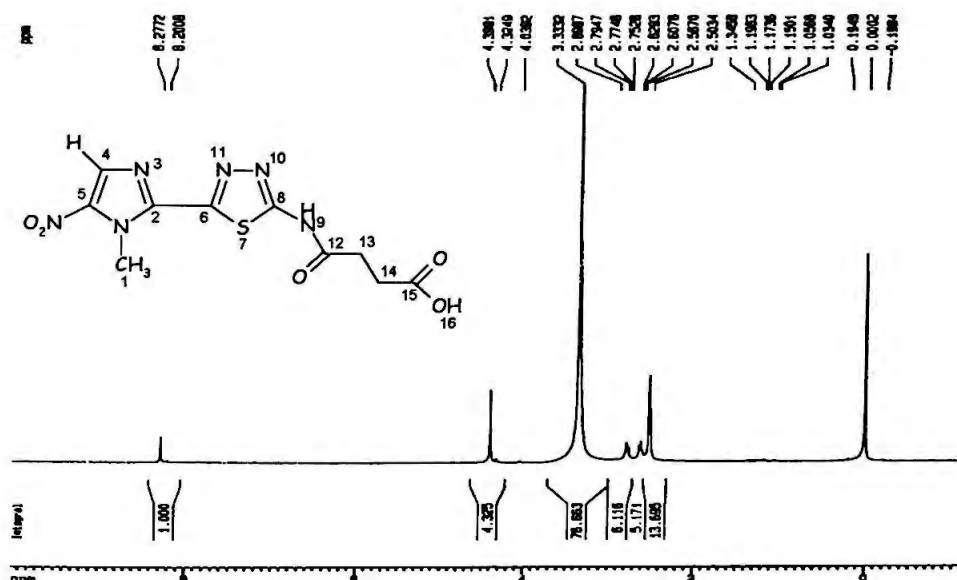
Espectro 7: Espectrometria no infravermelho de megazol.

TABELA XIII: Análise no IV de megazol

ν (KBr, cm^{-1})
3400 (ν_{NH}), 2960 (ν_{CH}), 1523 ($\nu_{\text{ass. NO}_2}$), 1347 ($\nu_{\text{sim. NO}_2}$), 852 ($\delta_{\text{C-N, NO}_2}$)

1.2.2 Análises espectroscópicas dos intermediários utilizados na tentativa de síntese do composto primaquina e meqazol com espaçante não-peptídico

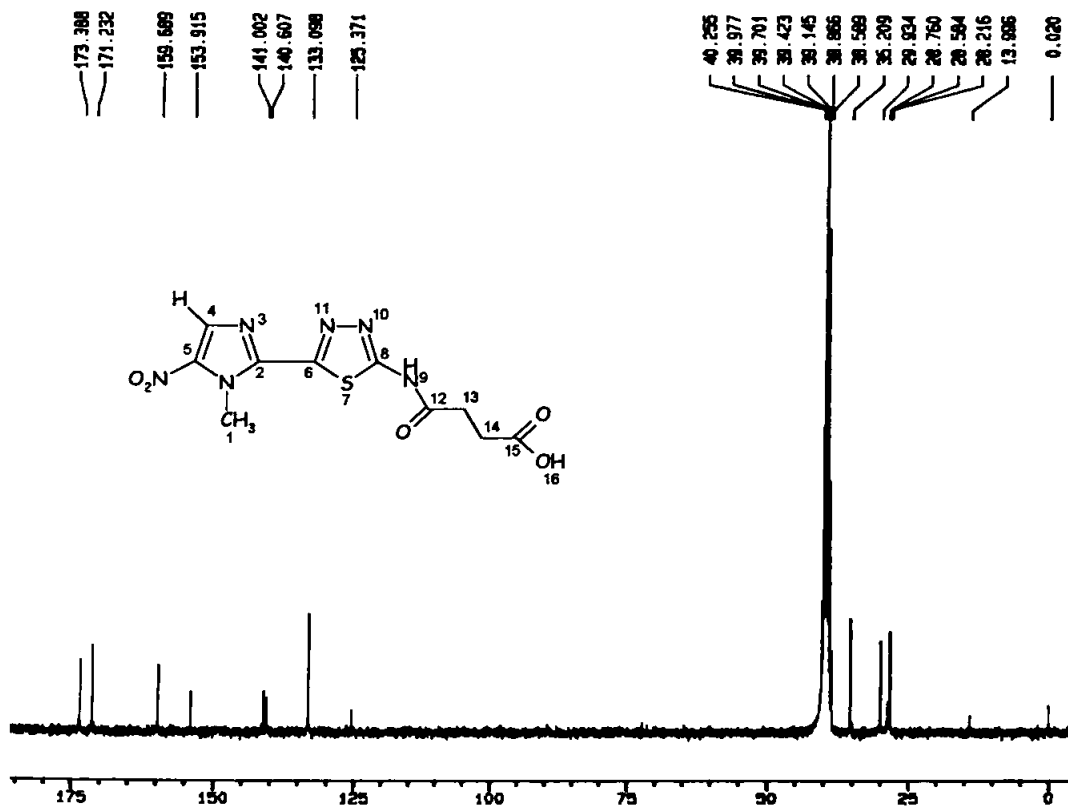
As tabelas XIV a XVIII apresentam as atribuições das análises espectrométricas do succinilmegazol (tabelas XIII e XIV), 4-cloro-4-oxabutanoato de metila (tabela XV), éster metílico do succinilmegazol (tabela XVI) e, succinilprimaquina (tabela XVII).



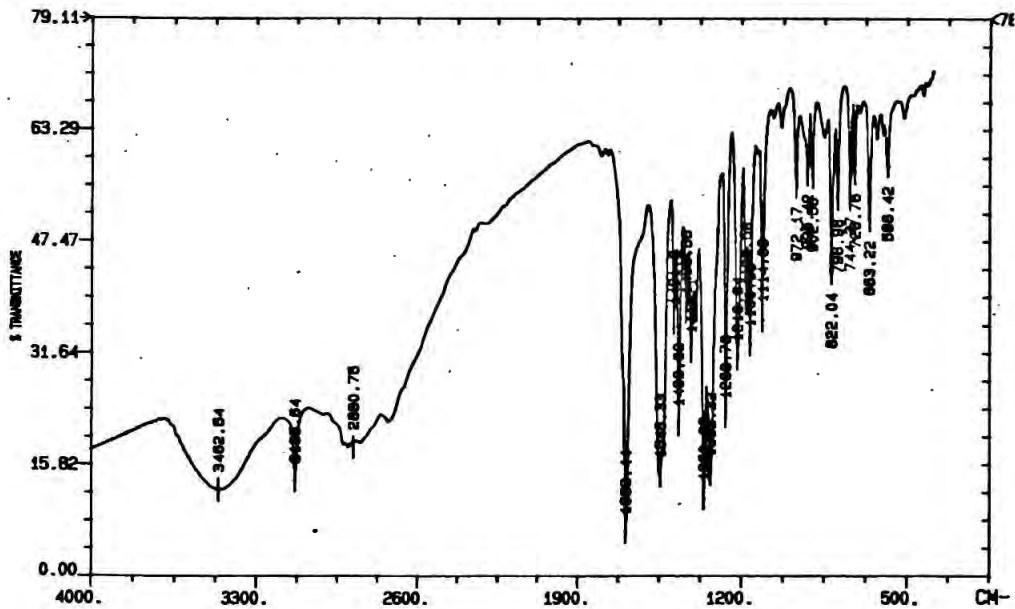
Espectro 8 - RMN ^1H do succinilmegazol.

TABELA XIV: Análise de RMN ^1H de succinilmegazol

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)
2,58 (t, 2H, H ₁₄); 2,75 (t, 2H, H ₁₃); 4,39(s, 3H, H ₁); 8,27(s, 1H, H ₄)

Espectro 9 - RMN ^{13}C do succinilmegazol.TABELA XV: Análise de RMN ^{13}C do succinilmegazol

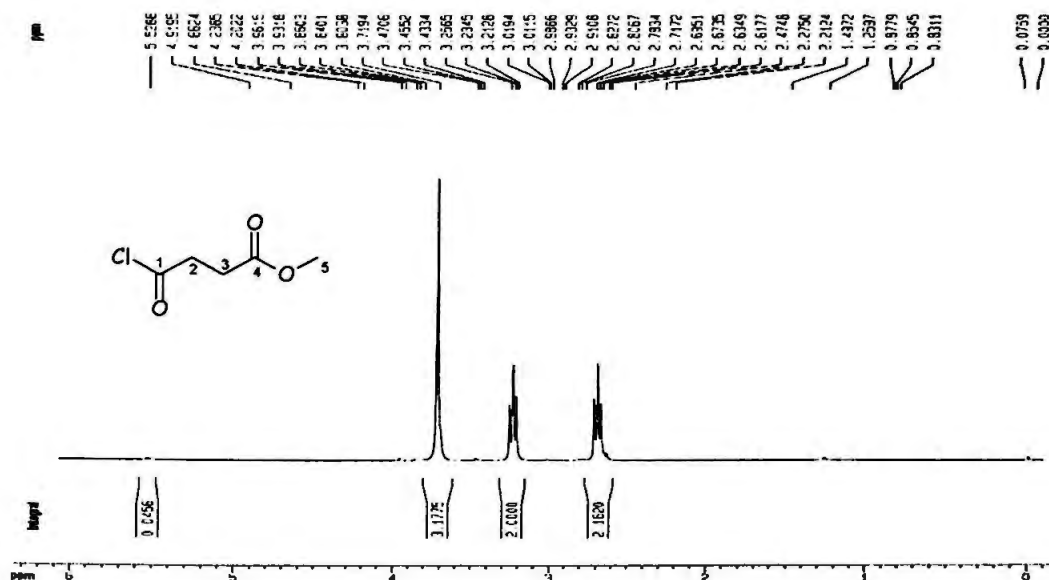
RMN C^{13} (DMSO- d_6 , 75 MHz, δ =ppm)
28,76 (C_{13}) ; 29,93 (C_{14}); 35,20 (C_1); 133,09 (C_4); 140,60(C_5); 141 (C_2)153,91 (C_8); 159,68(C_6); 171,23(C_{12}); 173,38 (C_{15})



Espectro 10 - Espectrometria no infravermelho de succinilmegazol.

TABELA XVI: Análise no IV do succinilmegazol

ν (KBr, cm^{-1})
3462 (ν_{NH} , NHCO), 3135 (ν_{OH} , COOH), 2880 (ν_{CH} , CH_3), 1693 (ν C=O, NHCO), 1546 (ν N-C, NHCO), 1523 ($\nu_{\text{ass.}}\text{NO}_2$), 1347 ($\nu_{\text{sim.}}\text{NO}_2$), 852 ($\delta_{\text{C-N}}$, NO_2)



Espectro 11 - RMN ^1H do 4-cloro-4-oxabutanoato de metila.

TABELA XVII: Análise de RMN ^1H do 4-cloro-4-oxabutanoato de metila

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, δ =ppm)
2,80 (t, 2H, H3); 3,23 (t, 2H, H2); 3,71 (s, 3H, H5)

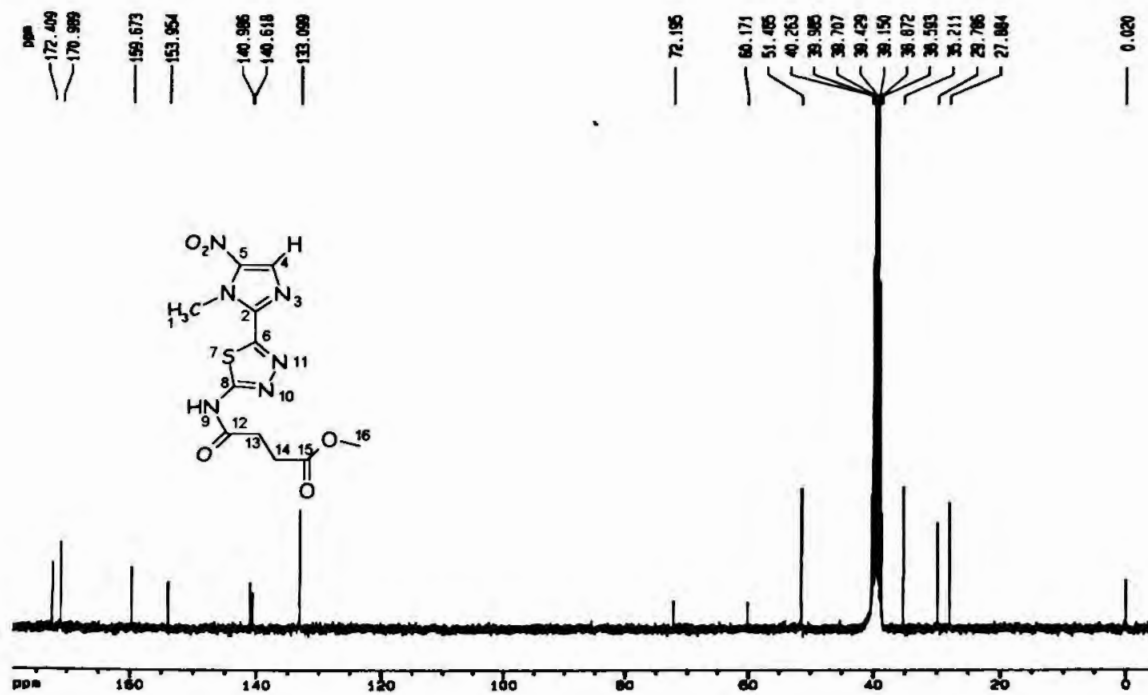
Michelle Carneiro Polli



Espectro 12 - RMN ^1H do éster metílico do succinilmegazol.

TABELA XVIII: Análise de RMN ^1H de éster metílico do succinilmegazol

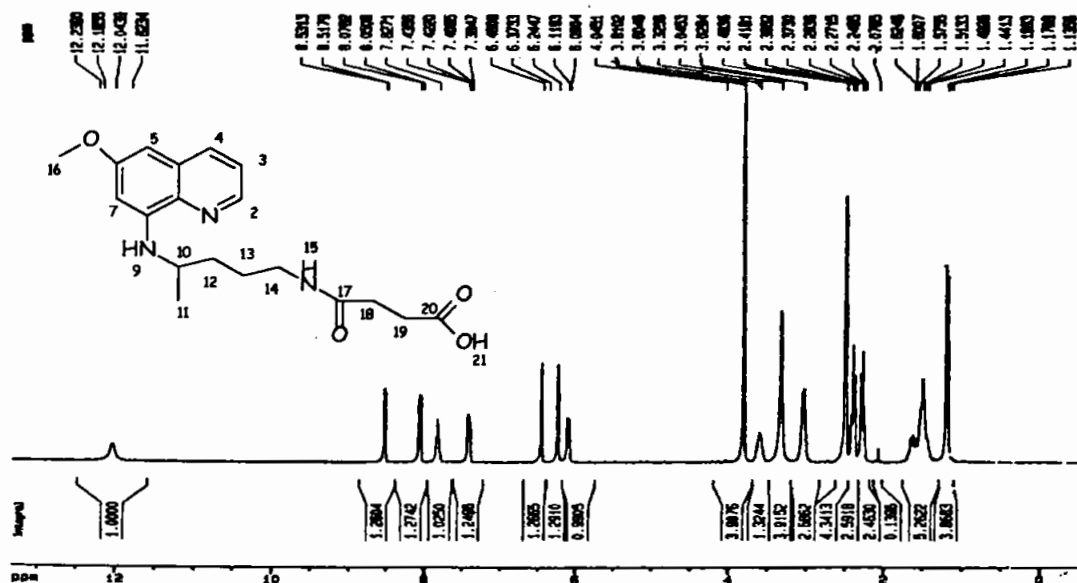
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)
2,69 (t, 2H, H ₁₃); 2,83 (t, 2H, H ₁₄); 3,60 (s, 3H, H ₁₆); 4,38 (s, 3H, H ₁); 8,29 (s, 1H, H ₄)



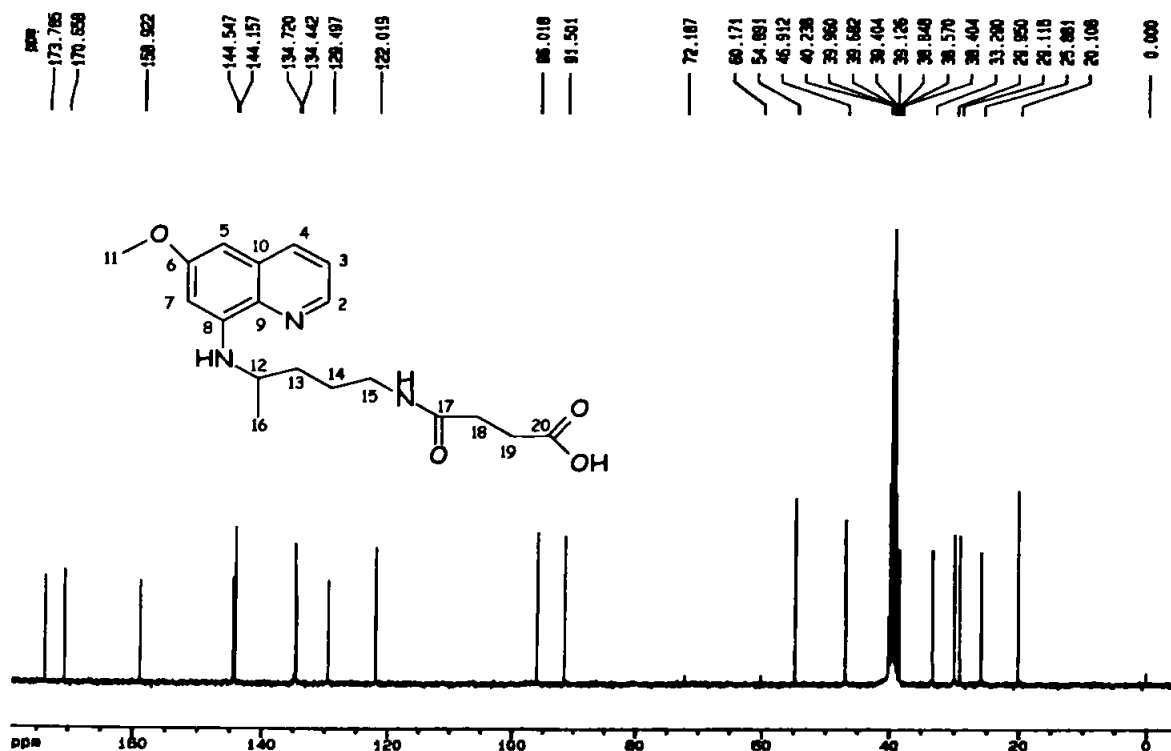
Espectro 13 - RMN ^{13}C do éster metílico do succinilmegazol.

TABELA XIX: Análise de RMN ^{13}C éster metílico do succinilmegazol

RMN C^{13} (DMSO- d_6 , 75 MHz, δ =ppm)
27,88 (C ₁₃) ; 29,78 (C ₁₄); 35,21 (C ₁); 51,46 (C ₁₆); 133,09 (C ₄); 140,61(C ₅); 140,98 (C ₂); 153,95 (C ₈); 159,67(C ₆); 170,98(C ₁₂); 172,40 (C ₁₅)

Espectro 14 - RMN ^1H da succinilprimaquina.TABELA XX: Análise de RMN ^1H succinilprimaquinaRMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)

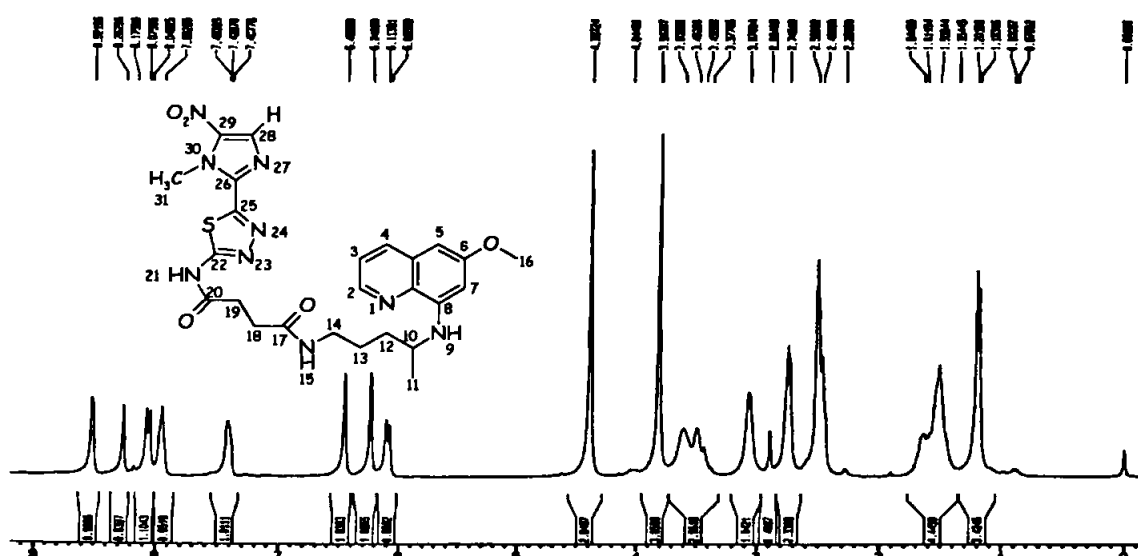
1,08 (m, 2H, H₁₂); 1,19 (d, 3H, H₁₁); 1,51 (m, 2H, H₁₃); 2,28 (t, 2H, H₁₉); 2,41 (t, 2H, H₁₈); 3,02 (t, 2H, H₁₄); 3,60 (m, 1H, H₁₀); 3,81 (s, 3H, H₁₆); 6,09 (s, 1H, H₉); 6,29 (s, 1H, H₅); 6,49 (s, 1H, H₇); 7,40 (t, 1H, H₃); 7,82 (s, 1H, H₁₅); 8,05 (d, 1H, H₄); 8,51 (d, 1H, H₂), 12,23 (s, 1H, H₂₁)

Espectro 15 - RMN ^{13}C da succinilprimaquina.TABELA XXI: Análise de RMN ^{13}C da succinilprimaquina

RMN C^{13} (DMSO- d_6 , 75 MHz, δ =ppm)
20,10 (C_{16}); 25,88 (C_{14}); 29,11 (C_{18}); 29,95 (C_{19}); 33,29 (C_{13}); 46,91 (C_{12});
54,89 (C_{11}); 91,50 (C_7); 96,01 (C_5); 122,01 (C_3); 129,49 (C_4); 134,44 (C_{10});
134,72 (C_9); 144,15 (C_2); 144,54 (C_8); 158,92 (C_6); 170,65 (C_{17}); 173,78 (C_{20})

1.2.3 Análise espectroscópica do composto primaquina e megazol com espaçante não-peptídico

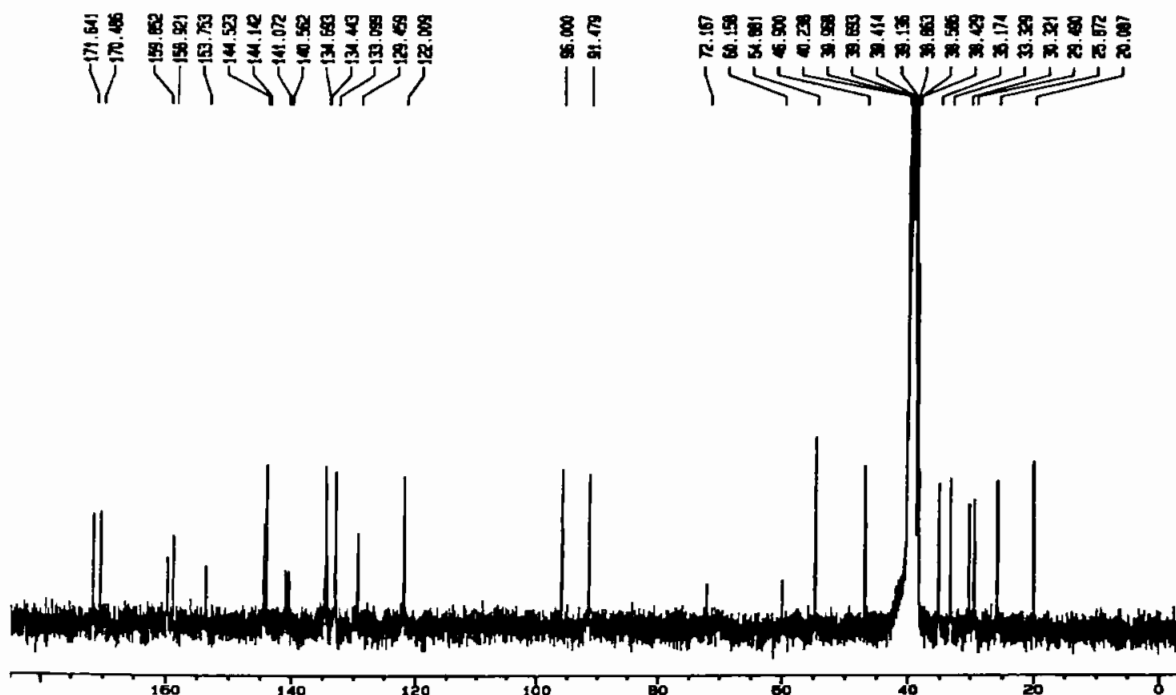
As tabelas XXII, XXIII e XXIV apresentam os dados obtidos nas análises espectrométricas de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e, infravermelho do pró-fármaco de megazol e primaquina com espaçante succínico. O item 1.2.3.1 apresenta os dados de análise elementar do produto obtido.



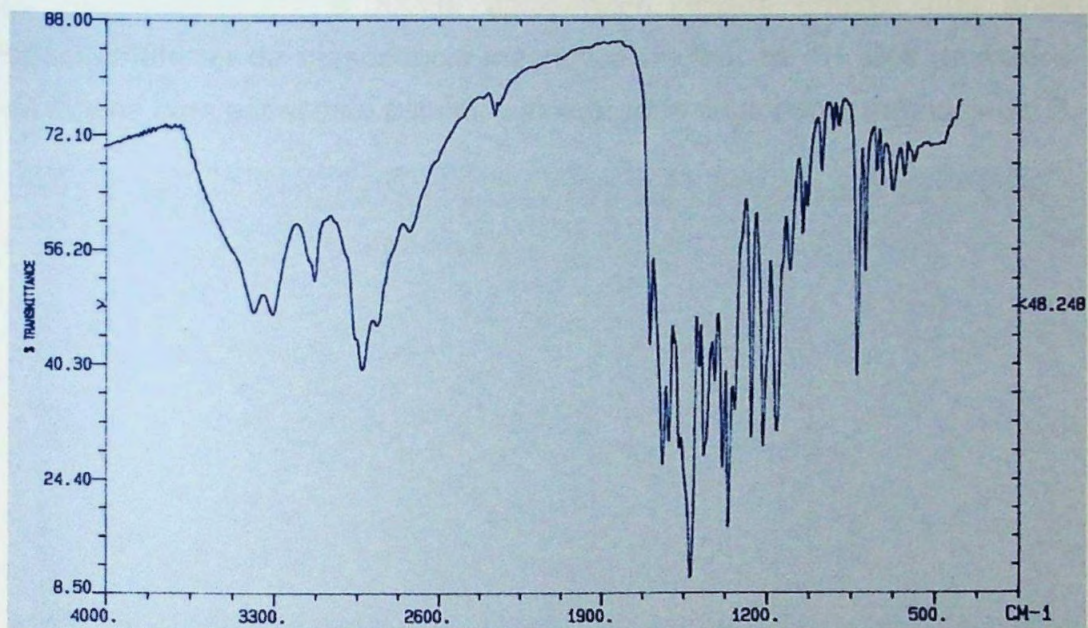
Espectro 16 - RMN ^1H do pró-fármaco obtido.

TABELA XXII: Análise de RMN ^1H do pró-fármaco obtido

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)
1,19 (d, 3H, H ₁₁); 1,50-1,64 (m, 4H, H ₁₂ , H ₁₃); 2,50 (t, 2H, H ₁₄), 2,74 (sl, 2H, H ₁₉); 3,07 (sl, 2H, H ₁₈); 3,60 (m, 1H, H ₁₀), 3,81 (s, 3H, H ₁₆); 4,38 (s, 3H, H ₃₁); 6,10 (s, 1H, H ₉); 6,24 (s, 1H, H ₅); 6,45 (s, 1H, H ₇); 7,42 (t, 1H, H ₃); 7,95 (s, 1H, H ₁₅); 8,05 (d, 1H, H ₄); 8,26 (s, 1H, H ₂₈); 8,52 (d, 1H, H ₂).
sl – sinal largo

Espectro 17 - RMN ^{13}C do pró-fármaco obtido.TABELA XXIII: Análise de RMN ^{13}C do pró-fármaco

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz, δ =ppm)
20,08 (C ₁₁); 25,87 (C ₁₄); 29,49 (C ₁₈); 30,32 (C ₁₉); 33,32 (C ₁₃); 35,17 (C ₃₁); 46,90 (C ₁₂); 54,88 (C ₁₆); 91,47 (C ₇); 96,00 (C ₅); 122,00 (C ₃); 129,45 (C ₄); 133,09 (C ₂₈); 134,44 (C ₁₀); 134,69 (C ₉); 140,56 (C ₂₉); 141,07 (C ₂₆); 144,14 (C ₂); 144,52 (C ₈); 153,75 (C ₂₂); 158,92 (C ₆); 159,85 (C ₂₅); 170,48 (C ₁₇); 171,64 (C ₂₀)



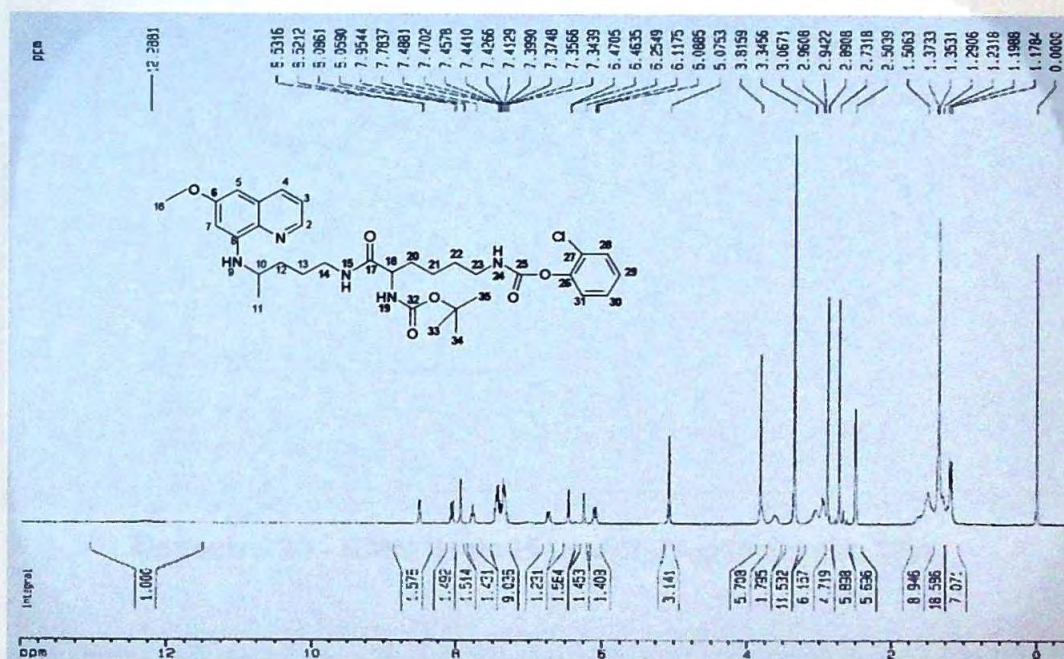
Espectro 18 - Espectro de IV do pró-fármaco recíproco obtido.

TABELA XXIV: Análise no IV do pró-fármaco obtido

ν (KBr, cm^{-1})
3384 (ν_{NH} , NHCO), 2918 ($\nu_{\text{CH}_{\text{alif.}}}$), 1696 ($\nu_{\text{C=O}}$, NHCO), 1529 ($\nu_{\text{ass. NO}_2}$), 1363 ($\nu_{\text{sim. NO}_2}$), 852 ($\delta_{\text{C-N}}$, NO_2)

1.2.4. Análises espectroscópicas dos derivados de primaquina com espaçante aminoácido e peptídico

As tabelas XXI a XXVIII apresentam, dados obtidos nas análises espectrométricas de ressonância magnética nuclear de ^1H , dos derivados de primaquina com espaçante peptídico sintetizados seguindo a metodologia B.

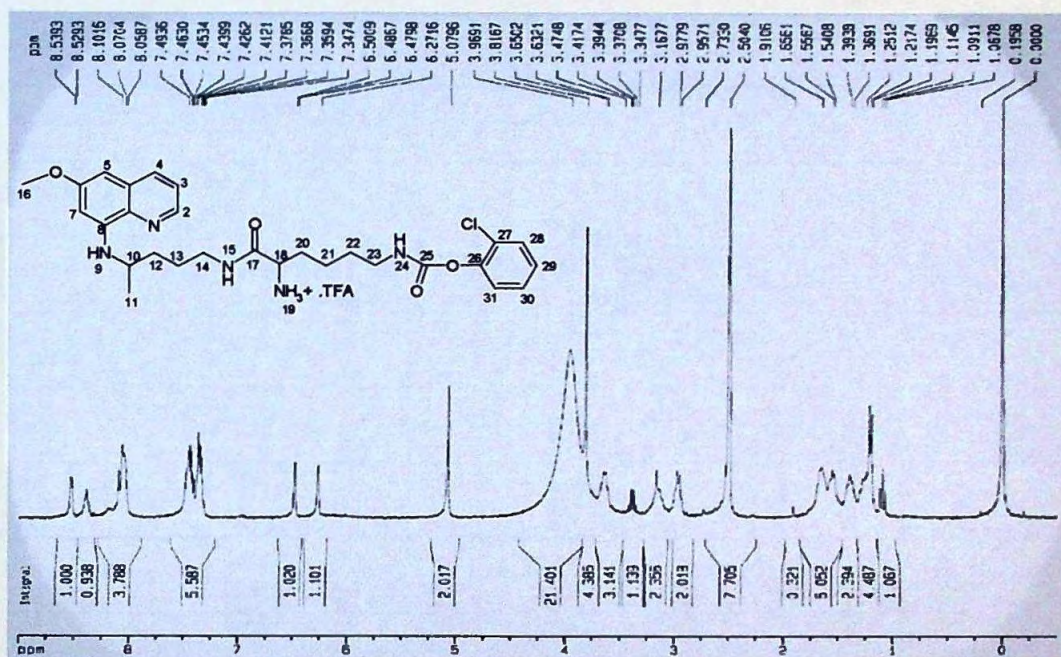


Espectro 19 - RMN ^1H de Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina (método B).

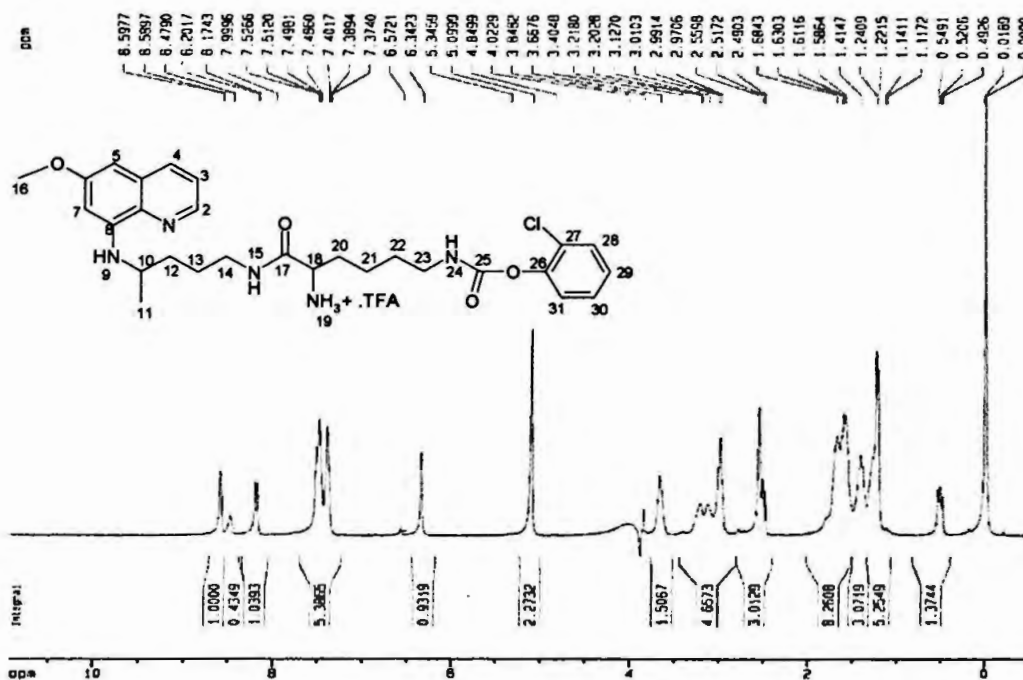
TABELA XXVI: Análise de RMN ^1H Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina/Método B

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)

1,17-1,19 (d, 3H, H₁₁); 1,35-1,37 (m, 13H, H₂₁, H₂₂, H₃₃, H₃₄, H₃₅); 1,50 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₂₀), 2,96-2,94 (m, 4H, H₁₄, H₂₃), 3,77 (m, 3H, H₁₀, H₁₈), 3,81 (s, 3H, H₁₆); 6,09 (d, 1H, H₉); 6,25 (s, 1H, H₇); 6,46 (d, 1H, H₅); 7,04 (d, 1H, H₁₉); 7,48-7,34 (m, 6H, H₃, H₂₄, H₃₁, H₃₀, H₂₉, H₂₈); 7,78 (s, 1H, H₁₅); 8,06 (d, 1H, H₄); 8,52 (d, 1H, H₂).

Espectro 20 - RMN ^1H de H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TFATABELA XXVII: Análise de RMN ^1H H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TFARMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)

1,20 (d, 3H, H₁₁); 1,37-1,39 (m, 4H, H₂₁, H₂₂); 1,55-1,65 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₂₀); 2,96 (t, 4H, H₁₄, H₂₃), 3,16 (t, 1H, H₁₈); 3,63-3,65 (m, 1H, H₁₀) 3,81 (s, 3H, H₁₆); 6,27 (s, 1H, H₇), 6,49 (d, 1H, H₅); 7,34-7,49 (m, 6H, H₃, H₂₄, H₃₁, H₃₀, H₂₉, H₂₈); 8,08 (t, 4H, NH₃⁺, H₄); 8,47 (s, 1H, H₁₅); 8,53 (d, 1H, H₂).

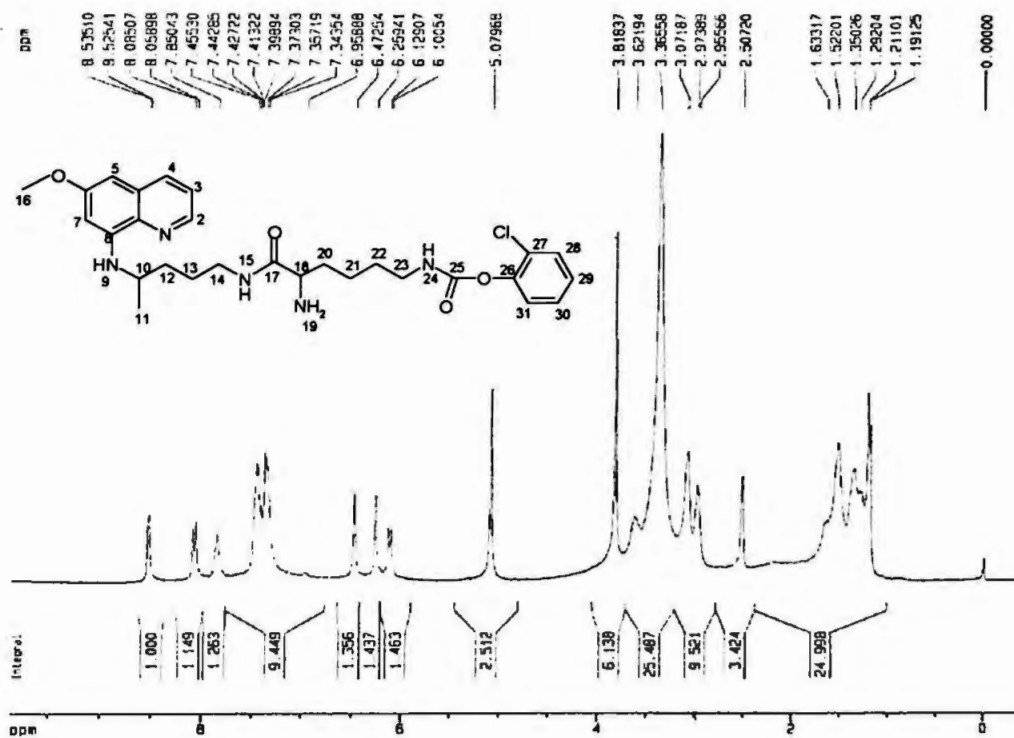


Espectro 21 - RMN ^1H de H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (D_2O).

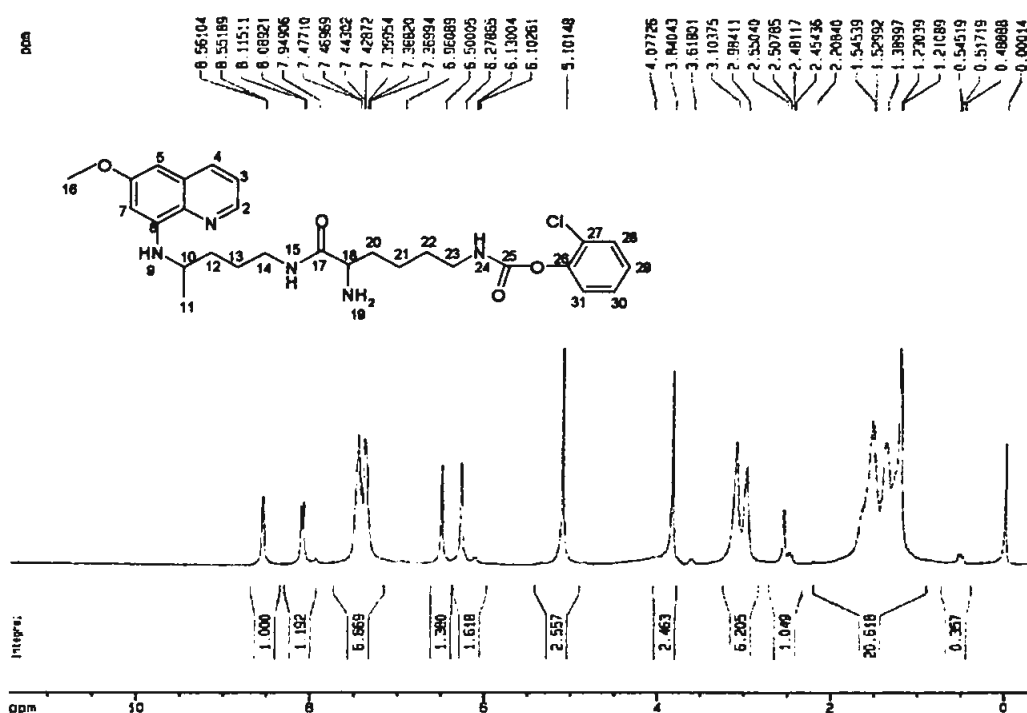
TABELA XXVIII: Análise de RMN ^1H H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (D_2O)

RMN ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz, δ =ppm)

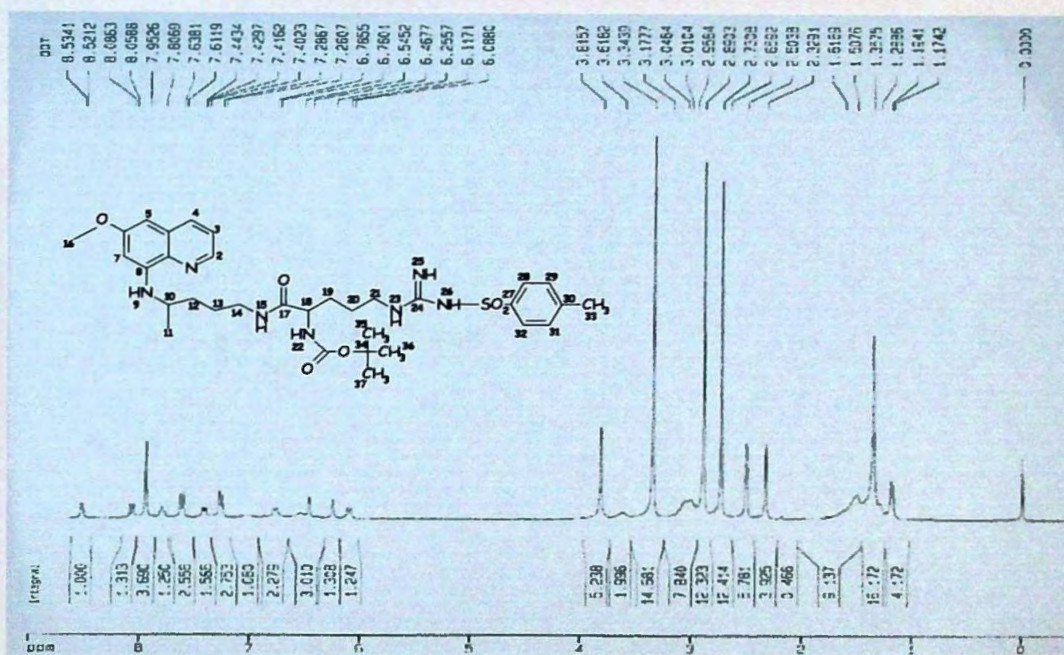
1,20 (d, 3H, H_{11}); 1,37-1,39 (m, 4H, $\text{H}_{21}, \text{H}_{22}$); 1,55-1,65 (m, 6H, $\text{H}_{12}, \text{H}_{13}, \text{H}_{20}$); 2,96 (t, 4H, $\text{H}_{14}, \text{H}_{23}$); 3,16 (t, 1H, H_{18}); 3,63-3,65 (m, 1H, H_{10}); 3,81 (s, 3H, H_{16}); 6,27 (s, 1H, H_7); 6,49 (d, 1H, H_5); 7,34-7,49 (m, 6H, $\text{H}_3, \text{H}_{24}, \text{H}_{31}, \text{H}_{30}, \text{H}_{29}, \text{H}_{28}$); 8,18 (t, 1H, H_4); 8,53 (d, 1H, H_2).

Espectro 22 - RMN ^1H de H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TABELA XXIX: Análise de RMN ^1H H-Lys(Cl-Z)-primaquinaRMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)

1,20 (d, 3H, H_{11}); 1,37-1,39 (m, 4H, H_{21}, H_{22}); 1,55-1,65 (m, 6H, H_{12}, H_{13}, H_{20}); 2,96 (t, 4H, H_{14}, H_{23}); 3,16 (t, 1H, H_{18}); 3,63-3,65 (m, 1H, H_{10}); 3,81 (s, 3H, H_{16}); 6,11 (d, 1H, H_9); 6,27 (s, 1H, H_7); 6,49 (d, 1H, H_5); 7,34-7,49 (m, 6H, $H_3, H_{24}, H_{31}, H_{30}, H_{29}, H_{28}$); 7,85 (s, 1H, H_{14}); 8,08 (t, 1H, H_4); 8,53 (d, 1H, H_2).

Espectro 23 - RMN ^1H de H-Lys(Cl-Z)-primaquina (D_2O).TABELA XXX: Análise de RMN ^1H H-Lys(Cl-Z)-primaquina (D_2O)RMN ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz, δ =ppm)

1,20 (d, 3H, H_{11}); 1,37-1,39 (m, 4H, $\text{H}_{21}, \text{H}_{22}$); 1,55-1,65 (m, 6H, $\text{H}_{12}, \text{H}_{13}, \text{H}_{20}$); 2,96 (t, 4H, $\text{H}_{14}, \text{H}_{23}$); 3,16 (t, 1H, H_{18}); 3,63-3,65 (m, 1H, H_{10}); 3,81 (s, 3H, H_{16}); 6,27 (s, 1H, H_7); 6,49 (d, 1H, H_5); 7,34-7,49 (m, 6H, $\text{H}_3, \text{H}_{24}, \text{H}_{31}, \text{H}_{30}, \text{H}_{29}, \text{H}_{28}$); 8,08 (t, 1H, H_4); 8,53 (d, 1H, H_2).

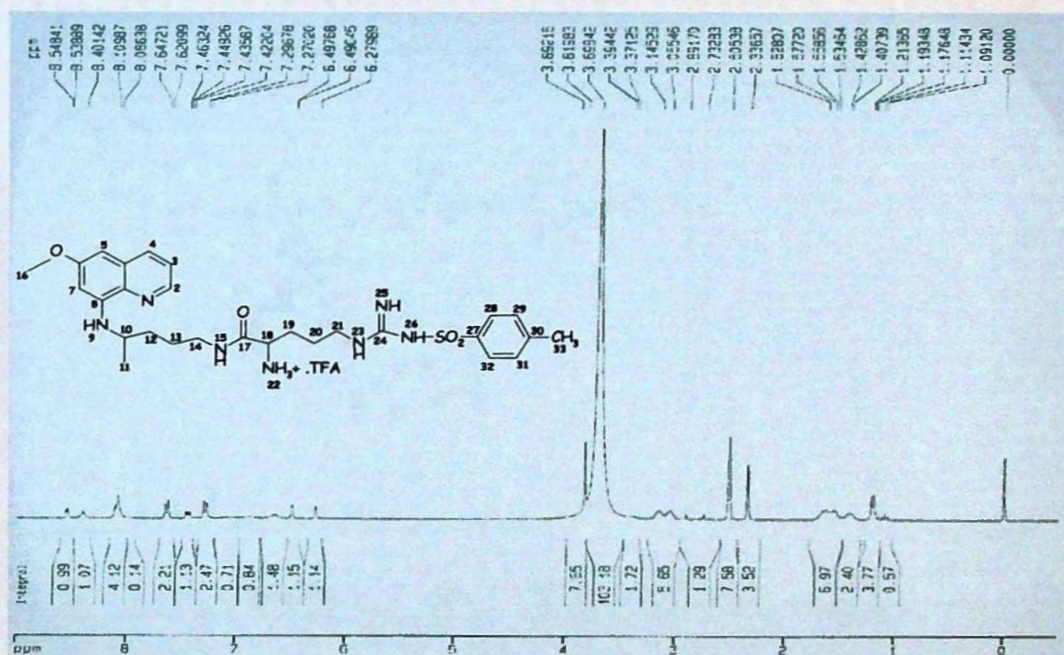


Espectro 24 - RMN ^1H de Boc-Arg(Tos)-primaquina (método B).

TABELA XXXI: Análise de RMN ^1H Boc-Arg(Tos)-primaquina/Método B

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)

1,18 (d, 3H, H₁₁); 1,35 (m, 13H, H₁₉, H₂₀, H₃₅, H₃₆, H₃₇); 1,61 (m, 4H, H₁₂, H₁₃), 2,32(s, 3H, H₃₃); 3,01-3,04(m, 3H, H₁₄, H₂₁); 3,61 (m, 2H, H₁₀, H₁₈); 3,81 (s, 3H, H₁₆); 6,11 (d, 1H, H₉); 6,25 (s, 1H, H₇); 6,46 (s, 1H, H₅); 6,77 (d, 1H, H₂₂); 7,27(d, 2H, H₂₉, H₃₁); 7,42 (t, 1H, H₃); 7,63 (d, 2H, H₂₈, H₃₂); 8,06 (d, 1H, H₄); 8,54 (d, 1H, H₂).

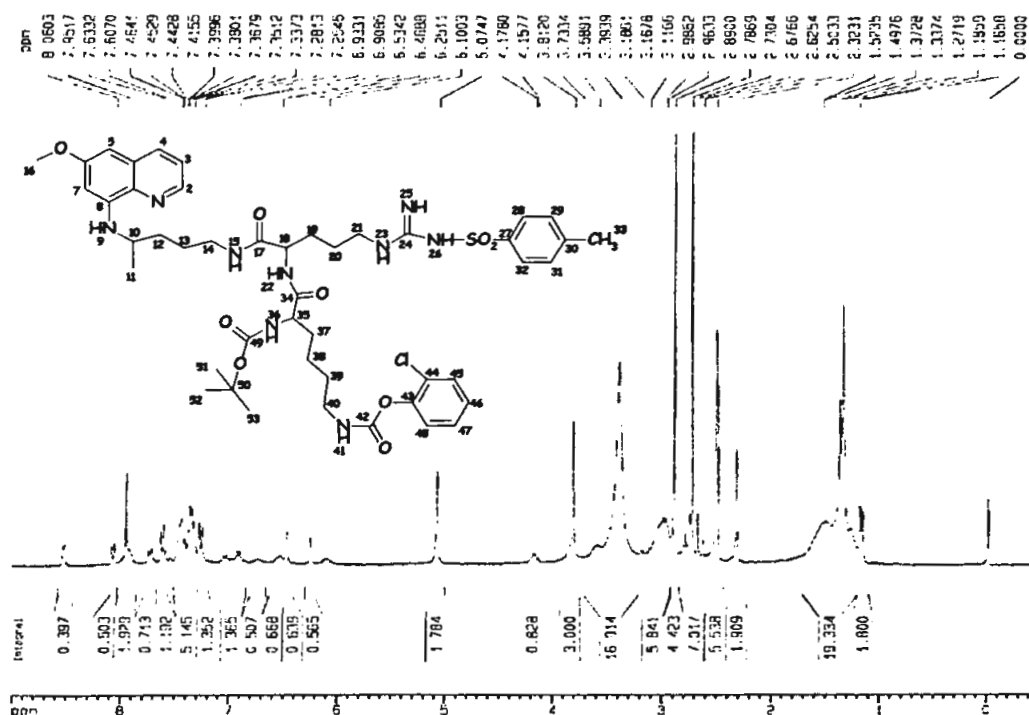


Espectro 25: RMN ^1H de H-Arg(Tos)-primaquina .TFA.

TABELA XXXII: Análise de RMN ^1H H-Arg(Tos)-primaquina.TFA/Método B

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)

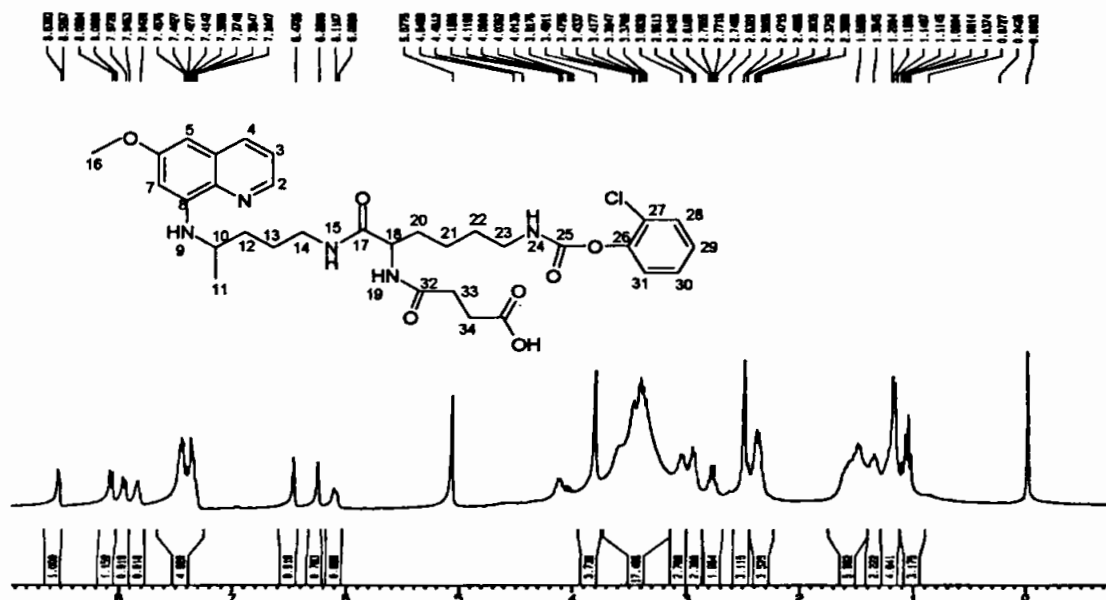
1,18 (d, 3H, H₉); 1,40 -1,42 (m, 4H, H₁₉, H₂₀); 1,53-1,62 (m, H₁₂, H₁₃), 2,33(s, 3H, H₃₃); 3,05-3,14(t, 3H, H₁₈, H₂₁); 3,81 (s, 3H, H₁₆); 6,27 (s, 1H, H₇); 6,49 (s, 1H, H₅); 7,28(d, 2H, H₃₁, H₂₉); 7,44 (t, 1H, H₃); 7,63 (d,2H, H₂₈, H₃₂); 8,09 (t, 4H, NH₃⁺, H₄); 8,40 (s, 1H, H₁₅) 8,53 (d, 1H, H₂).



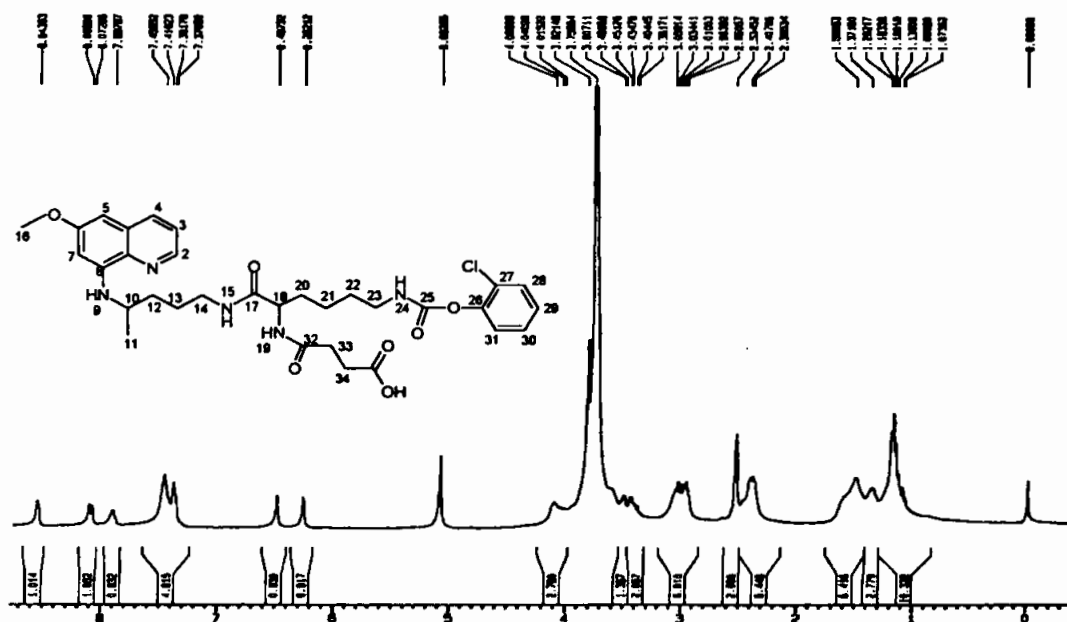
Espectro 26 - RMN ¹H de Boc-Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)-primaquina.

TABELA XXXIII: Análise de RMN ¹H Boc-Lys(Cl-Z)-Arg(Tos)-primaquina /Método B

RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 300 MHz, δ=ppm)
1,17 (d, 3H, H ₁₁); 1,33-1,52 (bl, 21H, H ₁₂ , H ₁₃ , H ₁₉ , H ₂₀ , H ₃₉ , H ₄₀ , H ₅₁ , H ₅₂ , H ₅₃); 2,27 (s, 3H, H ₃₃); 2,75 (t, 1H, H ₃₅); 2,96-2,98 (m, 7H, H ₁₄ , H ₁₈ , H ₂₁ , H ₄₀); 3,58 (m, 1H, H ₁₀); 3,81 (s, 3H, H ₁₆); 6,25 (s, 1H, H ₇); 6,46 (s, 1H, H ₅); 7,26 (d, 2H, H ₂₉ , H ₃₁); 7,33-7,46 (m, 5H, H ₄₁ , H ₄₅ , H ₄₆ , H ₄₇ , H ₄₈); 7,61 (d, 2H, H ₂₈ , H ₃₂); 8,07 (d, 1H, H ₄); 8,52 (d, 1H, H ₂).

Espectro 27 - RMN ^1H de Succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina.TABELA XXXIV: Análise de RMN ^1H Succinil-Lys(Cl-Z)-primaquinaRMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ =ppm)

1,20 (d, 3H, H₁₁); 1,36 (m, 4H, H₂₁, H₂₂); 1,50 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₂₀); 2,35-2,40 (m, 4H, H_{33a}, H_{33b}, H_{34a}, H_{34b}); 2,96 (t, 4H, H₁₄, H₂₃), 3,06 (t, 1H, H₁₈); 3,63-3,65 (m, 1H, H₁₀) 3,81 (s, 3H, H₁₆); 6,09 (d, 1H, H₉); 6,26 (s, 1H, H₇), 6,47 (d, 1H, H₅); 7,34-7,45 (m, 6H, H₃, H₂₄, H₃₁, H₃₀, H₂₉, H₂₈); 7,84 (s, 1H, H₁₅); 7,95 (d, 1H, H₁₉); 8,07 (d, 1H, H₄); 8,52 (d, 1H, H₂).



Espectro 28 - RMN ^1H de Succinil-lys(Cl-Z)-primaquina (D_2O).

TABELA XXXV: Análise de RMN ^1H Succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina (D_2O)

RMN ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz, δ =ppm)

1,20 (d, 3H, H_{11}); 1,36 (m, 4H, $\text{H}_{21}, \text{H}_{22}$); 1,50 (m, 6H, $\text{H}_{12}, \text{H}_{13}, \text{H}_{20}$); 2,38-2,40 (m, 4H, $\text{H}_{33a}, \text{H}_{33b}, \text{H}_{34a}, \text{H}_{34b}$); 2,96 (t, 4H, $\text{H}_{14}, \text{H}_{23}$), 3,06 (t, 1H, H_{18}); 3,63-3,65 (m, 1H, H_{10}) 3,81 (s, 3H, H_{16}); 6,26(s, 1H, H_7), 6,47 (d, 1H, H_5); 7,34-7,45 (m, 5H, $\text{H}_3, \text{H}_{31}, \text{H}_{30}, \text{H}_{29}, \text{H}_{28}$); 7,84 (s, 1H, H_{15}); 8,08 (t, 1H, H_4); 8,53 (d, 1H, H_2).

1.3 Análise Elementar do pró-fármaco obtido

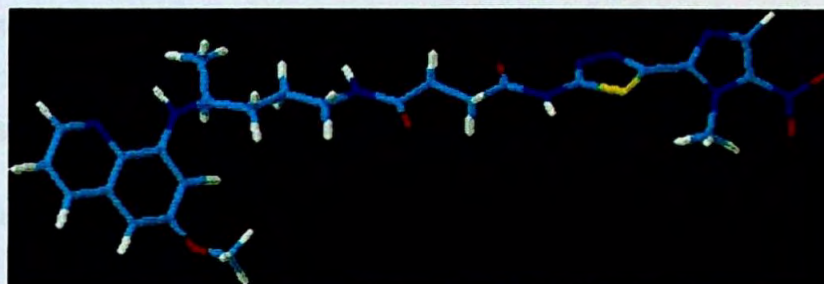


TABELA XXXVI: Análise elementar do pró-fármaco obtido

Peso Molecular	Fórmula Molecular	Composição Molecular (calculada)	Composição Molecular (obtida)
567.63	$C_{25}H_{29}N_9O_5S$	C 52,90% H 5,15% N 22,21%	C 53,39% H 5,52% N 21,83%

1.4 Avaliação Biológica

A seguir estão dispostos os resultados do teste biológico realizado para forma tripomastigota *in vitro*. A tabela XXXVII apresenta a porcentagem de lise parasitária nas três concentrações testadas e o valor das concentrações inibitórias que estão representadas também na forma de gráfico.

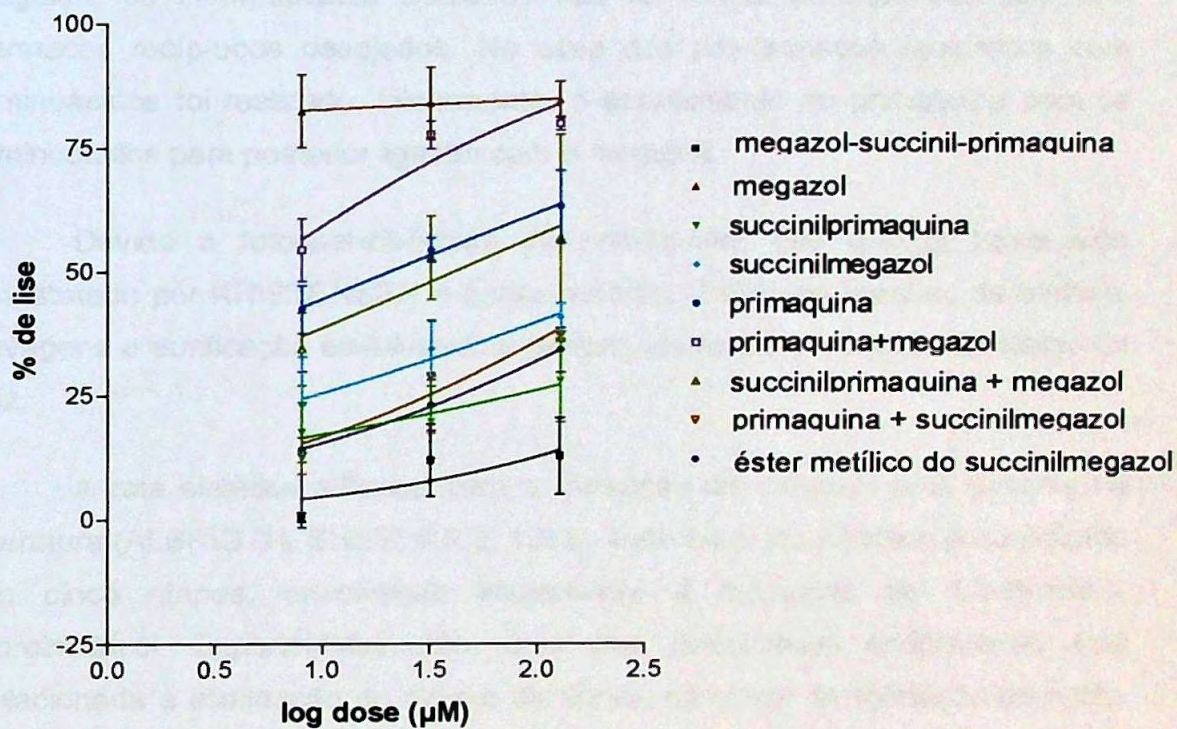
TABELA XXXVII: % de lise parasitária (forma tripomastigota) - cepa y –

SUBSTÂNCIA	Concentração (μM) x % de lise (\pm SD)			IC ₅₀ (μM)
	8,0	32,0	128,0	
primaquina	42,4 \pm 4,8	54,4 \pm 2,4	63,2 \pm 7,3	20,4
megazol	82,4 \pm 7,3	84,0 \pm 7,3	84,8 \pm 3,7	0,24
primaquina + megazol	54,4 \pm 6,4	77,6 \pm 2,8	80,0 \pm 1,4	4,72
succinilprimaquina	17,6 \pm 6,0	19,6 \pm 7,3	28,0 \pm 8,3	9.122,0
succinilmegazol	23,2 \pm 9,6	34,4 \pm 5,5	40,8 \pm 2,8	411,6
succinilprimaquina + megazol	34,4 \pm 7,3	52,8 \pm 8,4	56,8 \pm 1,9	40,8
primaquina + succinilmegazol	12,8 \pm 3,7	28,8 \pm 11,3	37,2 \pm 0,7	360,4
megazol-succinil-primaquina (pró-fármaco recíproco)	0,5 \pm 0,9	12,0 \pm 7,3	12,8 \pm 7,7	5.897,0

** controle positivo – violeta-de-genciana a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC₅₀ = 76 μM);

*** controle negativo – sangue infectado + 5% de DMSO.

CURVA DE IC₅₀ DAS SUBSTÂNCIAS AVALIADAS



2. DISCUSSÃO

2.1 Síntese e análise

A síntese dos compostos seguiu a ordem anteriormente descrita em Material e Métodos, ou seja, sintetizaram-se, inicialmente, o megazol e, em seguida, os intermediários utilizados nas tentativas de obtenção dos pró-fármacos recíprocos desejados. No caso dos pró-fármacos recíprocos com aminoácidos foi realizado, inicialmente, o acoplamento da primaquina com os aminoácidos para posterior ligação com o megazol.

Devido à fotossensibilidade da primaquina, fato que já havia sido constatado por KRISTENSEN e colaboradores (1993), as reações de síntese, lavagens e purificação envolvendo a primaquina foram realizadas ao abrigo da luz.

A rota sintética utilizada para a obtenção do megazol está descrita na literatura (ALBRIGTH, SHEPHARD, 1973). Este caminho sintético é constituído de cinco etapas, envolvendo inicialmente a formação do 1,2-dimetil-5-nitroimidazol. Experimentalmente, uma das dificuldades encontradas está relacionada à eliminação do cloreto de tionila, na etapa de formação da nitrila. O rendimento global deste método está em torno de 5-7%, o que se constitui em limitação para a obtenção de quantidade suficiente do derivado para as etapas subseqüentes. Com o objetivo de diminuir uma etapa da rota de obtenção do megazol, optou-se por utilizar como material de partida 1,2-dimetil-5-nitroimidazol, eliminando a metilação a partir do 2-metil-5-nitroimidazol.

O megazol foi caracterizado no IV (Tabela XIII) e por RMN H^1 (Tabela XI) e RMN ^{13}C (Tabela XII).

Com relação à succinilprimaquina, a análises de RMN 1H e ^{13}C (espectros XX e XXI) realizadas em DMSO- d_6 confirmaram a formação do produto com rendimento de 59%. Após a obtenção do espectro adicionou-se

D₂O com o objetivo de se identificar os prótons ligados aos nitrogênios. Tal procedimento foi realizado, também, na análise espectrométrica de RMN ¹H dos produtos resultantes da primaquina com aminoácidos.

O succinilmegazol foi obtido com rendimento de 45%. A análise de RMN ¹H (espectro 8) forneceu subsídio importante para a determinação estrutural do composto. Relacionou-se a ausência do sinal dos prótons amínicos do megazol (em δ 7,74) com a formação da ligação amídica, uma vez que não foi possível identificar o sinal do próton amídico. Considera-se aqui a possibilidade de esse próton, devido à mobilidade, ter trocado com o solvente deuterado. Por outro lado, o resultado da análise de espectroscopia no infravermelho (espectro 10) confirmou a presença da ligação amídica por meio de absorção característica de estiramento NH em 3462 cm⁻¹ e, em 1693 cm⁻¹, relativa ao estiramento C=O da amida. O succinilmegazol apresentou ponto de fusão com decomposição em 280 °C.

Com relação à síntese do éster metílico do succinilmegazol, após análises espectrométricas foi possível concluir que houve a formação do produto com rendimento de 64%. No entanto, observou-se, inicialmente, a presença de dois dupletos em δ 6,97 e 8,22 ppm. Estes dupletos, juntamente com o sinal observado em δ 3,16 ppm, evidenciaram a presença de DMAP (espectro não apresentado). A proporção desses sinais em relação àqueles referentes ao éster metílico do succinilmegazol levou à conclusão de que o DMAP estava presente em alta concentração. Este fato pode ser justificado pela pouca solubilidade desse catalisador em tetraidrofurano e, também, pela sua proporção em relação ao megazol (1:8). No entanto, deve-se considerar que o DMAP presente está na forma de cloridrato, por captar o HCl liberado a partir da reação de acilação com o 4-cloro-4-oxabutanoato de metila para obtenção do produto. O fato de o DMAP estar na forma de cloridrato conduz à hidrossolubilidade, o que facilita a purificação do produto apenas com a lavagem em água destilada. Os espectros 12 e 13

referem-se às análises de RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente, do éster metílico do succinilmegazol após a purificação com lavagem em água destilada. A ausência do sinal em δ 7,74 ppm referente aos prótons amínicos do megazol confirma a formação do produto.

Para a síntese do pró-fármaco de megazol e primaquina com espaçante não-peptídico, foram propostas diversas rotas sintéticas, resumidas na tabela XXXVIII:

TABELA XXXVIII: Metodologias empregadas na síntese do pró-fármaco de megazol e primaquina com espaçante não-peptídico

Método A (succinilprimaquina e megazol)	DCC/DMAP/DMF Refluxo 72 horas	Formação do produto (presença de DCU)
Método B (succinilmegazol e primaquina)	DCC /HOBt /DMF Agitação- temperatura ambiente – 52 horas	Formação do produto (presença de DCU)
Método C (succinilprimaquina e megazol)	DIC/HOBt/DCM Agitação – temperatura ambiente – 52 horas	Não ocorreu formação do produto
Método D (succinilmegazol e primaquina)	DIC /HOBt /DCM Agitação – temperatura ambiente – 52 horas	Não ocorreu formação do produto
Método E (succinilmegazol e primaquina)	EDC/HOBt/H ₂ O Agitação 0 °C – 4 horas Adição de EDC – agitação- temperatura ambiente 72 horas	Não ocorreu a formação do produto
Método F (succinilmegazol e primaquina)	EDC/DMAP/DMF Agitação – banho de gelo – 1 hora e temperatura ambiente – 11 horas	Formação do produto
Método G (éster metílico do succinilmegazol–primaquina)	DMAP/DMF Refluxo 6 horas	Não ocorreu a formação do produto
Método H (éster metílico do succinilmegazol–primaquina)	DMAP/DMF/Peneira Molecular/ Atmosfera inerte/ Refluxo 16 horas	Não ocorreu a formação do produto
Método I (éster metílico do succinilmegazol–primaquina)	DMAP/Piridina Ultra-som	Não ocorreu a formação do produto
Método J (éster metílico do succinilmegazol–primaquina)	KOH/Alumina Básica Microondas	Não ocorreu a formação do produto

Por meio dos métodos A e B, obteve-se produto com contaminação de dicicloexiluréia (DCU), resultante da reação com DCC. Empregando-se os métodos C e D concluiu-se que os produtos obtidos correspondiam, apenas, a mistura dos produtos de partida, o que pode ser comprovado por duas faixas de fusão. No caso do método E, a cromatografia em camada delgada que acompanhou a reação indicou que nenhum produto havia sido formado e, conseqüentemente, isolado.

A metodologia A consistia em reagir a succinilprimaquina e o megazol em DMF sob refluxo, utilizando-se como agente acoplante DCC e DMAP como catalisador de acilação. No entanto, a partir de revisões na literatura (ALBERT, 1995), constatou-se que a utilização de DMF poderia diminuir a velocidade de reação e aumentar a taxa de formação da DCU, subproduto do DCC. A adição de HOBt, por exemplo, poderia diminuir a formação da DCU.

Um dos grandes problemas na utilização do DCC na formação de amidas e ésteres é a formação da DCU, cuja solubilidade em solventes orgânicos pode dificultar a purificação do produto final. O DCU é insolúvel em água e parcialmente solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Se o produto desejado fosse solúvel em água, a sua purificação poderia ocorrer apenas com lavagem em água destilada. No entanto, tentativas de purificar o produto trabalhando apenas com diferença de solubilidade em diversos solventes orgânicos não mostraram resultado satisfatório.

Diante do exposto, na segunda tentativa de síntese do pró-fármaco desejado (Método B) utilizou-se succinilmegazol e primaquina em DMF, sob agitação à temperatura ambiente, empregando-se DCC e HOBt. A utilização do succinilmegazol e primaquina teve como objetivo avaliar se havia vantagens em relação à reação de succinilprimaquina e megazol. Esperava-se que com o succinilmegazol e primaquina o tempo de reação fosse menor, visto que o NH₂

do megazol, aromático, é menos reativo que o NH_2 alifático da primaquina. A utilização de HOBt ao invés de DMAP teve por objetivo tentar diminuir a taxa de formação da DCU. No entanto, não se observou nenhuma vantagem em relação à metodologia utilizada anteriormente. O tempo de reação foi longo e a formação do DCU ocorreu também de maneira insatisfatória. A presença da DCU pode ser comprovada pelos sinais na região de δ 1,02 –1,70 ppm e em δ 5,56-5,58 ppm.

A partir desses resultados optou-se pelas metodologias C e D, substituindo o DCC pelo DIC em DCM. O uso do DIC leva à obtenção de subprodutos como a diisopropiluréia e diisopropil-*N*-aciluréia, que apresentam maior solubilidade em solventes orgânicos como o diclorometano. No entanto, após 52 horas de reação os produtos foram isolados e após análises de ponto de fusão e espectrométrica, concluiu-se que os produtos desejados não haviam sido formados, tratando-se apenas da mistura dos produtos de partida, megazol e succinilprimaquina (metodologia C) e succinilmegazol e primaquina (metodologia D).

A metodologia E foi proposta a partir de dados da literatura, que indicavam outra carbodiimida como agente acoplante, que, por estar na forma de cloridrato, apresenta solubilidade em água. Portanto, nessa metodologia, utilizou-se o cloridrato de EDC e HOBt como agentes acoplantes. A reação foi acompanhada por CCD. Após 72 horas de agitação à temperatura ambiente, não se observou qualquer mudança, optando-se por adicionar mais EDC e HOBt, deixando-se sob agitação à temperatura ambiente por mais 72 horas. No entanto, nenhum tipo de reação havia ocorrido ainda que o tempo empregado tivesse sido duplicado. Portanto, nenhum produto resultante dessa metodologia foi isolado e caracterizado.

A metodologia F consistia em reagir o succinilmegazol e a primaquina em DMF, sob refluxo, utilizando-se como agente acoplante o EDC e DMAP, como catalisador. Após 11 horas sob agitação e refluxo, o produto foi isolado. As análises de RMN ^1H e ^{13}C , em DMSO-d_6 , a análise no IV, em KBr, e a análise elementar confirmaram a formação do produto. Para os espectros de ^{13}C tanto do succinilmegazol quanto da succinilprimaquina observou-se que o carbono carbonílico do ácido carboxílico apresentava um deslocamento de 173 ppm. Observou-se também o deslocamento dos carbonos carbonílicos em 171,23 ppm e 170,65 ppm para o succinilmegazol e succinilprimaquina, respectivamente, quando formada a ligação amida. Conseqüentemente, a ausência do sinal em 173 ppm e a presença do sinal em 170,48 ppm observado no espectro de ^{13}C do pró-fármaco, comprovam a formação do produto. Este foi caracterizado como um sólido cristalino amarelo claro com rendimento de 72%. Esta metodologia mostrou-se a mais promissora para a síntese do pró-fármaco recíproco de megazol e primaquina com espaçante não-peptídico.

As metodologias de G a J consistiam em reagir o éster metílico do succinilmegazol com a primaquina. Inicialmente, o éster metílico do succinilmegazol pareceu ser um intermediário de síntese promissor, considerando-se que a formação do produto final envolve a aminólise do éster metílico. Além de, nesse caso, não necessitar de agentes acoplantes para a obtenção de amida, cuja desvantagem seria a formação dos subprodutos, como anteriormente mencionado, o tempo de reação poderia ser diminuído. No entanto, nenhuma das metodologias empregadas para reagir o éster metílico do succinilmegazol e primaquina levou à obtenção do produto desejado.

A síntese de pró-fármacos de primaquina com aminoácidos foi realizada inicialmente, seguindo-se a técnica descrita por CHUNG (1996), empregando-se como reagente de partida derivado de arginina contendo Boc e Tosil, como protetores dos grupos amínicos e guanidínicos, respectivamente. O reagente de

partida derivado de lisina apresentou como protetores dos grupos amínicos Boc e 2-cloro-benziloxicarbonila. Tal metodologia consistia em empregar DIC como agente acoplante. No entanto, após a extração, observou-se a presença do subproduto desta carbodiimida impurificando o produto desejado. Diante dessa dificuldade e pelo fato de o subproduto estar presente em alta concentração, dificultando as etapas subseqüentes de síntese, tentou-se utilizar EDC, cujo subproduto é solúvel em água. Desta maneira, após o método de extração utilizado, seria possível a obtenção dos derivados peptídicos com alto grau de pureza. A primeira tentativa com o EDC foi realizada para o acoplamento do Boc-Lys(Cl-Z)-OH e primaquina. Observando-se o espectro de RMN ^1H do produto isolado concluiu-se que houve a formação do produto desejado. Todos os espectros dos derivados peptídicos de primaquina que foram sintetizados utilizando-se o DIC apresentaram sinais característicos do subproduto da diisopropilcarbodiimida. O espectro do Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina (espectro 19) sintetizado, utilizando-se como agente acoplante o EDC, não apresentou nenhum sinal característico de carbodiimida. A partir desse resultado, foi possível concluir que o EDC seria um agente acoplante mais adequado para a obtenção dos derivados propostos.

Decidiu-se sintetizar novamente os derivados de primaquina e aminoácidos utilizando-se o EDC. Tal decisão se justifica pelo fato de que a presença do subproduto da carbodiimida estaria prejudicando as etapas sintéticas subseqüentes. Portanto, concluiu-se ser mais viável iniciar as sínteses já realizadas em etapa anterior, utilizando-se outra metodologia que viabilizaria a síntese dos compostos finais.

Anteriormente, após o acoplamento dos aminoácidos protegidos com a primaquina, realizou-se a desproteção total dos aminoácidos para que, em etapa posterior, o composto resultante fosse ligado ao succinilmegazol, obtendo-se pró-fármacos recíprocos de megazol e primaquina com aminoácido

como espaçante. No entanto, decidiu-se, posteriormente realizar apenas desproteções parciais dos aminoácidos e, então, reagir com o succinilmegazol, como mostrado no esquema VI. Neste caso, a desproteção total seria realizada apenas para os derivados de primaquina com espaçante peptídico já acoplados ao megazol. Essa decisão baseou-se em dois fatos: 1. maior seletividade da reação no grupo desprotegido e 2. diminuição do tempo de reação.

A remoção do grupo Boc pode ser comprovada comparando-se a região de 1,35-1,37 ppm do espectro de RMN ^1H do composto Boc-Lys(Cl-Z)-primaquina (espectro 19), cuja integral foi de 13 prótons, com a mesma região do espectro de RMN ^1H do composto H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA (espectro 20), cuja integral corresponde a 4 prótons. A diferença de 9 prótons corresponde à ausência das metilas do grupamento Boc. A mesma observação pode ser feita em relação ao composto Boc-Arg(Tos)-primaquina e H-Arg(Tos)-primaquina .TFA (espectros 24 e 25 respectivamente).

A remoção do grupo Boc é realizada utilizando-se TFA/DCM. O produto destas reações, geralmente, apresenta-se sob a forma de sal (H-Arg-(Tos)-primaquina.TFA) e H-Lys-(Cl-Z)-primaquina.TFA). Para a remoção do sal de TFA dos compostos, deve-se adicionar trietilamina, liberando o NH_2 e, dessa maneira, possibilitando posterior acoplamento com o succinilmegazol. Com relação à análise espectrométrica de RMN ^1H do composto Boc-Lys(Cl-Z)-Arg-Tos-primaquina identificou-se o próton metínico ligado ao grupo amínico da Lys entre 2,73-2,78 ppm. A tentativa de síntese deste composto já estava sendo realizada em período anterior. No entanto, sua obtenção foi possível apenas quando se utilizou como material de partida H-Arg(Tos)-primaquina.TFA sintetizada a partir da metodologia B. Provavelmente, tal fato foi devido à ausência do subproduto da carbodiimida utilizada anteriormente, sem descartar a possibilidade de se ter usado quantidade insuficiente de trietilamina para liberação da base livre.

A primeira tentativa de síntese de derivados de megazol e primaquina com espaçante peptídico foi realizada a partir do composto H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA e succinilmegazol. Após 1 hora sob agitação em banho de gelo seco e acetona, a reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. O composto foi submetido à análise espectrométrica de RMN ¹H. O espectro resultante apresentou sinais característicos de H-Lys(Cl-Z)-primaquina e de megazol. No entanto, os sinais referentes à H-Lys(Cl-Z)-primaquina apresentavam-se muito intensos em relação aos sinais referentes ao megazol. A partir desse resultado, foi possível concluir que o composto poderia ter sido obtido com pequeno rendimento e a técnica de extração e purificação não estaria sendo adequada para o isolamento do produto puro. Realizando-se CCD com o produto extraído da reação observou-se a presença da H-Lys(Cl-Z)-primaquina no ponto de origem da placa, em concentração significativa em relação ao produto obtido. Esse resultado indicou que provavelmente a quantidade de trietilamina utilizada não estaria sendo suficiente para liberar o composto, diminuindo, dessa maneira, o rendimento da reação. Na segunda tentativa de síntese decidiu-se utilizar excesso de trietilamina objetivando retirar todo TFA e liberando por completo a H-Lys(Cl-Z)-primaquina. No entanto, a partir dos dados de RMN ¹H do produto obtido ainda não havia sido possível concluir pela formação do derivado desejado. Decidiu-se, então, liberar o composto H-Lys(Cl-Z)-primaquina antes do acoplamento com o succinilmegazol. Portanto, a terceira tentativa de síntese consistiu em adicionar, em uma primeira etapa, trietilamina em solução de DMF contendo H-Lys(Cl-Z)-primaquina.TFA e manter sob agitação para a liberação do composto. Tal procedimento foi acompanhado por CCD. Após 18 horas sob agitação à temperatura ambiente, adicionou-se água e éter etílico para a posterior extração. A fase etérea foi lavada com água destilada para garantir a saída completa do sal de trietilamina formado. A liberação do grupo amino da H-Lys(Cl-Z)-primaquina pode ser comprovada comparando-se os espectros de RMN ¹H do produto na forma de sal (espectros 20 e 21) e do produto na forma

livre (espectros 22 e 23). No primeiro caso, observou-se um sinal em 8,08 ppm, cuja integral correspondia a 4 prótons. Após a obtenção do espectro, adicionou-se D_2O . Nesse caso, foi possível observar a diminuição (de 4 para 1) da integral. Como os prótons ligados ao nitrogênio trocam com a água deuterada, concluiu-se que 3 prótons trocaram com a água e, conseqüentemente, correspondiam a prótons de nitrogênio. O mesmo sinal em 8,08 ppm presente no espectro do composto na forma livre apresentou integral correspondente a 1 próton apenas, que não foi alterada mesmo após a adição de D_2O . A partir dessas observações foi possível concluir que o TFA havia sido liberado. Portanto, a integral de 4 prótons corresponderia aos 3 prótons do NH_3^+ (forma de sal com o TFA) e ao próton H_4 do anel quinolínico do composto. Outra observação importante pode ser feita em relação ao próton amídico. Esse próton é deslocado de campo mais baixo (8,47 ppm) para campo mais alto (7,85 ppm) quando o composto passa da forma de sal para a forma livre. Tal fato ocorre porque, inicialmente, o nitrogênio quaternário é fortemente aceptor e toma o hidrogênio amídico mais ácido. O contrário ocorre quando há liberação do sal. Com a adição de D_2O observou-se a ausência desse sinal em ambos os casos. O mesmo sinal pode ser observado no espectro da succinilprimaquina com as mesmas características e não está presente no espectro da primaquina, indicando ser de fato o próton da amida. Com relação ao próton H_9 foi possível identificá-lo apenas com o composto na forma livre. O sinal em 6,10 ppm pode ser atribuído a esse próton primeiramente por ser um duplete com integral correspondente a um próton. Esse sinal desaparece quando se adiciona D_2O , indicando ser um próton ligado a nitrogênio. Outro aspecto importante é que o mesmo sinal aparece no espectro da succinilprimaquina, também na forma de duplete com integral correspondente a um próton, desaparecendo com a posterior adição de D_2O .

Na segunda etapa da reação para a síntese de megazol-succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina utilizou-se EDC e DMAP. A reação foi acompanhada por CCD e

após 24 horas de agitação à temperatura ambiente houve evidências da formação do produto. Apesar disso houve dificuldades no seu isolamento, o que impediu análises espectroscópicas necessárias.

Outra metodologia utilizando-se carbodiimida (EDC) foi proposta. Neste caso, utilizou-se metade de EDC em relação ao ácido carboxílico objetivando a formação de um anidrido simétrico, que reagiria com a amina alifática originando a ligação desejada. No entanto, a reação foi acompanhada por CCD durante 54 horas e no decorrer desse período observou-se que não ocorreu reação. Portanto, nenhum produto resultante dessa metodologia foi isolado e caracterizado.

A partir desses resultados optou-se por metodologias (métodos E e F), baseadas na formação do cloreto de ácido a partir do cloreto de tionila. Nesse caso, à medida que se adiciona o cloreto no meio reacional ocorre a formação do cloreto de ácido do succinilmegazol. Este sofreria o ataque da amina levando à obtenção do produto desejado. No entanto, nenhuma dessas metodologias levou à formação do composto.

Como observado na tentativa de síntese do pró-fármaco com espaçante succínico, a utilização do éster metílico do succinilmegazol (método G) para a síntese do composto megazol-succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina também não levou à obtenção do produto.

A metodologia H consistia inicialmente na síntese do derivado succínico do composto Lys(Cl-Z)-primaquina, que após sua obtenção reagiria com o megazol utilizando-se EDC e DMAP. A síntese do succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina foi comprovada inicialmente por CCD. A análise espectroscópica de RMN ^1H (espectros 27 e 28) também levou à conclusão de que se formou o produto. A formação da ligação amida pode ser comprovada pelo aparecimento de um

sinal em 7,97 ppm, que desaparece quando se adiciona D₂O, indicando ser um próton ligado ao nitrogênio. Com relação aos prótons succínicos, neste caso são pró-quirais, por estarem vizinhos a um carbono assimétrico. Dessa maneira, não se observa a presença de dois tripletos como ocorre com o succinilmegazol e succinilprimaquina. Esses prótons apresentam sinais na região de 2,5 – 2,35 ppm, que podem ser observado no espectro (espectro 27).

Na segunda etapa da metodologia H, reagiu-se o succinil-lys(Cl-Z)-primaquina com o megazol utilizando-se EDC e DMAP. No entanto, apenas com resultados de RMN ¹H não foi possível concluir a formação do produto.

Após a otimização da rota sintética para a obtenção de megazol-succinil-Lys(Cl-Z)-primaquina, a mesma metodologia deve ser empregada na tentativa de síntese dos pró-fármacos de megazol e primaquina com arg e lys-arg como espaçantes. Optou-se em iniciar essas sínteses utilizando-se a lisina como espaçante devido à maior disponibilidade deste aminoácido protegido em relação à arginina protegida.

2.2 Avaliação Biológica

Inicialmente, realizou-se ensaio *in vitro* de formas tripomastigotas sanguíneas. Utilizou-se como controle positivo violeta-de-genciana a 250 µg/mL, cuja IC₅₀ é de 76 µM, e como controle negativo sangue infectado mais 5% de dimetilsulfóxido.

Foram ensaiados os compostos de partida como primaquina e megazol; o pró-fármaco com espaçante succínico, bem como seus intermediários de síntese, succinilmegazol, e o éster metílico derivado, e succinilprimaquina. Ensaíram-se, também, associações de primaquina com megazol, succinilprimaquina com megazol e primaquina com succinilmegazol. Todas

essas associações foram realizadas na mesma proporção molar e a finalidade seria comparar os resultados com o pró-fármaco recíproco (TabelaXXXVII).

No caso do megazol, a concentração inibitória de 0,24 μM está de acordo com dados da literatura, que demonstram a alta atividade do composto (FILARDI, BRENER, 1982). Com relação ao succinilmegazol, este apresentou-se menos ativo que seu protótipo (megazol), considerando-se a menor porcentagem de lise parasitária e IC_{50} maior (411,6 μM). Os resultados obtidos com primaquina e succinilprimaquina também demonstram menor atividade com relação ao derivado succínico. Esses resultados indicam que provavelmente os derivados succínicos não estejam liberando completamente os fármacos de origem. Tal justificativa está de acordo com o fato de a concentração inibitória para a associação succinilprimaquina e megazol (40,8 μM) ser inferior à concentração inibitória da associação primaquina com succilmegazol (360,4 μM) visto que o megazol é mais ativo que a primaquina. Conseqüentemente, a associação que apresenta o megazol como fármaco livre terá menor concentração inibitória.

Observando-se a porcentagem de lise parasitária e o valor da concentração inibitória obtida para o pró-fármaco recíproco, foi possível concluir que, provavelmente, não houve a liberação completa dos fármacos megazol e primaquina. Tal resultado era esperado, considerando-se que o espaçante succínico não é seletivo para a hidrólise por cruzipaína. No caso de espaçantes peptídicos, considera-se que o megazol e a primaquina sejam liberados pela cruzipaína, com base no reconhecimento da ligação peptídica entre os aminoácidos lisina e arginina na posição P_1 , por parte dessa enzima.

Estudos em culturas de células estão sendo realizados a fim de se confirmar os resultados. Vale mencionar que o alto desvio padrão encontrado para algumas medidas leva, também, à necessidade de novos ensaios *in vitro* relacionados.

VI. CONCLUSÕES

1. O megazol foi obtido a partir de 1,2-dimetil-5-nitroimidazol, com diminuição de uma etapa de síntese, mas o rendimento permaneceu consideravelmente baixo.
2. Obtiveram-se, com rendimentos satisfatórios, os intermediários de síntese dos pró-fármacos recíprocos, tais como succinilmegazol, éster metílico do succinilmegazol e succinilprimaquina.
3. Sintetizaram-se os intermediários aminoacil-primaquina para posterior acoplamento ao succinilmegazol, com o objetivo de obter os derivados megazol-aminoacil-primaquina e megazol-dipeptídio-primaquina.
4. Para a obtenção dos produtos finais foram testadas três carbodiimidias como agentes acoplantes, sendo a EDC a que conduziu a melhores resultados. Também, o ajuste de pH entre 8-9 durante a primeira hora de reação possibilita a obtenção de produtos de maneira satisfatória.
5. Primaquina, megazol, o pró-fármaco com espaçante succínico, bem como seus intermediários de síntese, succinilmegazol e o éster metílico correspondente, succinilprimaquina. e, também, associações de primaquina com megazol, succinilprimaquina com megazol e primaquina com succinilmegazol foram submetidos a ensaio *in vitro* em sangue infectado com *T. cruzi*. O valor de IC₅₀ observado para o pró-fármaco recíproco de megazol e primaquina com espaçante succínico indica que, provavelmente, os fármacos não foram liberados completamente. Tal resultado indicaria a dificuldade de liberação pela cruzipaína, por falta de seletividade em relação ao derivado peptídico.

VII. PERSPECTIVAS PARA DOUTORADO

1. Síntese e caracterização do pró-fármaco recíproco com espaçante peptídico lys-arg;
2. Ensaio *in vitro*, em cultura de amastigotas de *T. cruzi* dos derivados ensaiados em sangue infectado e dos pró-fármacos recíprocos com espaçante peptídico. Comparação com os resultados obtidos.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSOY, S. A family of target site-specific retrotransposons interrupts spliced leader RNA genes in trypanosomatids. *J. Parasitol.*, v.79, p. 645-651, 1993.
- ALBERT, J.S., ANDREW, D.H. 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide. In: Paquette, L. A., ed. *Enciclopédia de reagentes de Compostos Orgânicos*, Chichester: John Wiley & Sons, v.3,1995. p.1751-1754.
- ALBRECHT, H.A, BESKID, G., CHAN, K.K. *et al.* Cephalosporin 3'-quinolone esters with a dual mode of action. *J. Med. Chem.*, v.33, p.77-86, 1990.
- ALBRECHT, H.A., BESKID, G., CHRISTENSON, J.G. *et al.* Dual-action cephalosporins: cephalosporin 3'-quinolone carbamates. *J. Med. Chem.*, v.34, p.2857-2864, 1991.
- ALBUQUERQUE, C. N., PERIÉ, J. J. Nova rota de síntese do megazol [1-metil-2(5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-il)5-nitroimidazol], um antiparasitário ativo contra *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, v. 35, p. 59-64, 1998.
- ANDRADE, Z.A., ANDRADE, S.G. As diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z.A., eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 214-218.
- ANDRADE, Z.A., BRENNER, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.11, p.222-228, 1969.

- AUGUSTO, O., ALVES, M. J.M., COLLI, W., FILARDI, L.S., BRENER, Z. Megazol reductive metabolism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81, suppl, p. 158, 1986.
- AUGUSTO, O., ALVES, M. J.M., COLLI, W., FILARDI, L.S., BRENER, Z. Primaquine can mediate hydroxyl radical generation by *Trypanosoma cruzi* extracts. *Biochem.Biophys.Res.Commun*, v.135, p.1029-1034, 1986.
- AUGUSTO, O., SCHREIBER, J., MASON, R.P. Direct ESR detection of a free radical intermediate during the peroxidase-catalyzed oxidation of the antimalarial drug primaquine. *Biochem.Pharmacol.*, v.37, n.14, p.2791-2797, 1988.
- BARRET, M.P. *et al.* Uptake of the nitroimidazole drug megazol by African trypanosomes. *Biochem. Pharmacol.*, v.59, p.615-620, 2000.
- BERKELHAMMER, G., ASATO, G. 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)1,3,4-thiadiazole: a new antimicrobial agent. *Science*, v.162, p.1146, 1968.
- BODANSZKY, M., BODANSZKY, A. *Principles of peptide synthesis*. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 284p.
- BODOR, N. Brain specific. *Drug Delivery*, v. 5, pat. 4,479,932. Apud: BREWSTER, M.E., BODOR, N. Improved brain delivery of antiviral agents through the use of redox targeting. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v.14, p.177-197, 1994.
- BODOR, N., FARAG, H.H., BREWSTER, M.E. Site-specific, sustained release of drugs to the brain. *Science*, v.214, p.1370-1372, 1981.

- BOLLO, S. *et al.* Cyclic voltametric studies on vitro radical anion formation from megalol and some related nitroimidazole derivates. *J. Electroanal. Chem*, v. 511, p.46-54, 2001.
- BOND, C.S., ZHANG, Y., BERRIMAN, M., CUNNINGHAM, M.L., FAIRLAMB, A.H., HUNTER, W.N. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure*, v. 7, p. 81-89, 1999.
- BORGES, A., CUNNINGHAM, J., TOVAR, J., FAIRLAMB, A.H. Site-directed mutagenesis of the redox-active cysteines of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione reductase. *Eur. J. Biochem.*, v.228, p. 745-752, 1995.
- BOVERIS, A. *et al.* Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biochem.*, v. 188, p. 643-648, 1980.
- BRENER, Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. In: BRENER, Z. *et al.*, eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 379-405.
- BUNDGAARD, H. *Design of prodrugs*, Elsevier: Amsterdam, 1985. 360p.
- BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs Fut.*, v.16, p.443-58, 1991.
- CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 58, p. 79-110, 1989.
- CANÇADO, J.P. Forma aguda da doença de Chagas no Brasil. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 26, p.285-288, 1980.

- CANÇADO, J.P. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benzonidazol. In: BRENER, Z. *et al.*, eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 389-405.
- CAO, Y; LAM, L. In press. Bispecific antibody conjugates in therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v.1, 2002.
- CAZZULO, J.J. Cruzipain, major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: sequence and genome organization of the codifying genes. *Med.-Buenos Aires*, v.59, p.7-10, 1999.
- CAZZULO, J.J., CAZZULO FRANKE, M.C.I., MARTINEZ, J., FRANKE DE CAZZULO, B.M. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim.Biophys.Acta*, v.1037, p.186-191, 1990(a).
- CAZZULO, J.J., STOKA, V., TURK. V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Chem.*, v.378, p.1-10, 1997.
- CHAGAS, J.R., AUTHIE, E., SERVEAU, C., LALMANACH, G., JULIANO, L., GAUTHIER, F. A comparison of the enzymatic properties of the major cysteine proteinase from *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.88, p.85-94, 1997.
- CHANCE, B., SIES, H & BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, v. 59, p. 527-605, 1997.
- CHUNG, M. C, FERREIRA, E. I. O processo da latenciação no planejamento de fármacos. *Quím. Nova*, v.22, n. 1, p. 75-84, 1999.

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

CHUNG, M.C., GONÇALVES, M.F., COLLI, W., FERREIRA, E.I., MIRANDA, M.T.M. Synthesis and *in vitro* activity of dipeptide prodrugs of primaquine potentially antichagasic. *J. Pharm. Sci.*, v. 86, n. 10, p. 1127-1131, 1997.

CHUNG, M.C., GONÇALVES, M.T., COLLI, W., MIRANDA, M.T.M., FERREIRA, E. I. Design, synthesis and *in vitro* evaluation of antichagasic mutual prodrugs of primaquine and nitrofurazone. *Abstracts of XIVth International Symposium on Medicinal Chemistry*, Maastrich, 1996. Abstract P-8.15.

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

CHUNG, M.C., MARTINELLI, T.F., GONÇALVES, M.T., GÜIDO, R.V.C., VARANDA, E.A., POLLI, M.C., BOTELHO, K.C., COLLI, W., MIRANDA, M.T.M., FERREIRA, E.I. Synthesis and *in vitro* antichagasic activity of hydroxymethylnitrofurazone, a prodrug of nitrofurazone – submetido ao periódico *Bioorg. Med. Chem.*

COOMBS, G.H., MOTRAM, J.C. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology*, v.114, p. 61-80, 1997.

- COSTA, F. *et al.* Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*, v.16, p. 768-774, 1998.
- COURA, J.R., CASTRO, S.L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97(1), p.3-24, 2002.
- CRENSHAW, C.A., GLANGES, E., STUART, B.H., PIERCE, J. Nitrofurazone therapy in "middle bums": a review. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.*, v.19, p.487-492, 1976.
- CRUZ, M.L. *Preparação e análise estrutural de iminas derivadas de dextranos oxidados e antimaláricos*. São Paulo, 1995. 219 p. [Tese (doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
- DE CASTRO, S.L., MEIRELLES, M.N.L. Effect of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell *in vitro*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.82, n.2, p.209-218, 1986.
- DE CASTRO, S.L., MEIRELLES, M.N.L. Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivative upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.85, n.1, p.95-99, 1990.
- DEL NERY, *et al.* Characterization of the substrate specificity of the major cysteine protease (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* using a portion-mixing combinatorial library and fluorogenic peptides. *J. Biochem*, v.323, p.427-433, 1997.

- DEZAN, C.M., ALMEIDA, A.E., SILVA, M., NASSUTE, J.C., FERREIRA, E.I., CHUNG, M.C. Síntese do pró-fármaco polimérico succinildroximetilnitrofuril dextrano potencialmente antichagásico. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, v.34, Supl.2, p.88. Res. FM53, 1998 [publicado também no V Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica. *Programa e Resumos*, p. 28, 1998].
- DIAS, J.C.P. *Doença de Chagas: clínica e terapêutica*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, SUCAM, 1990.
- DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: epidemiologia e prevenção. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.63, p.451-455, 1994.
- DIAS, J.C.P. Chagas' disease – American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. In: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter4.html>, 1992.
- DIAS, J.C.P., BRENER, S. Chagas' disease and blood transfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.79, supl., p.139-147, 1984.
- DIAS, J.C.P., JATENE, A.D. Doença de Chagas no Brasil – Situação atual e perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.25, supl.3, p.6-8, 1992.
- DIAS, J.C.P., LOYOLA, C.C.P., BRENER, S. Doença de Chagas em Minas Gerais: Situação atual e perspectivas. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, v. 37, p.7-28, 1985.
- DOCAMPO, R., MORENO, S.J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *T. cruzi*. *Rev. Infect. Dis.*, v.6, p.233-238, 1984.

- DOCAMPO, R., MORENO, S.N.J. Biochemical toxicology of antiparasitics compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of american trypanosomes. *Rev.Biochem.Toxicol.*, v.7, p.159-204, 1985.
- DOCAMPO, R., SCHMUÑIS, G.A. Sterol Biosynthesis Inhibitors: Potential Chemotherapeutics against Chagas Disease. *Parasitol. Today*, v. 13, p. 129-130, 1997.
- DOCAMPO, R., STOPANI, A.O.M. Generation of superoxide anion hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.197, p. 317-321, 1979.
- DODD, M.C., STILLMAN, W.B. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.82, p.11-18, 1944.
- D'SILVA, C., DAUNES, S. Structure-Activity Study on the *in vitro* Antiprotozoal Activity of Glutathione Derivatives. *J. Med. Chem.*, v. 43, p. 2072-2078, 2000.
- FAIRLAMB, A.H., CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 46, p. 695-729, 1992.
- FAIRLAMB, A.H., CERAMI, A. Identification of a novel thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biol. Parasitol.*, v.14, p.187-198, 1985.
- FAIRLAMB, A.H., BLACKBURN, P., ULRICH, P., CHAIT, B.T., CERAMI, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids, *Science*, v.227, p.1485-7, 1985.

- FERGUSON, M.A.J. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell. Sci.*, v. 122, p. 2799-2809, 1999.
- FERREIRA, R.C.C., FERREIRA, LC.S. CL 64,855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug, is also mutagenic in the *Salmonella* microsome assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.81, n.1, p.49-52, 1986.
- FILARDI, L.S., BRENNER, Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 76, p.293-297, 1982.
- FILARDI, L.S., BRENER, Z. Susceptibility and natural-resistance of *Trypanosoma-cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas'-disease. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v.81, p.755-759, 1987.
- FORATTINI, O.P. Biogeografia origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 14, p.265-299, 1980.
- FRIIS, G. J., BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P., LILJEFORS, T., MADSEN, U. (Eds.) *A textbook of drug design and development*. Harwood Academic: Amsterdam, 1996. p. 351-385.
- GARCIA, ES., AZAMBUJA, P. Fisiologia de triatomíneos: Desenvolvimento, Reprodução e Interação com o *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z.A., eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p.41-46.

- GONÇALVES, M.T., CHUNG, M.C., COLLI, W., MIRANDA, M.T.M., FERREIRA, E.I. Ação da associação da primaquina e nitrofurazona em células LLC-MK2 com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 27, supl.1, Res. 328, p. 164, 1994.
- GIRAULT, S. *et al.* New potent inhibitors of Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* in the 2-aminodiphenylsulfide series. *Eur.J. Med. Chem.*, v. 32, p. 39-52, 1997.
- GOAD, L.J. *et al.* The activity of Ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 32, p. 179-190, 1989.
- HARTH, G., ANDREWS, N., MILLS, A.A., ENGEL, J.C., SMITH, R., McKERROW, J.H. Peptide-fluormethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.58, p.17-24,1993.
- HENDERSON, G.B., ULRICH, P. FAIRLAMB, A.H., ROSENBERG, I., PEREIRA, M., SELA, M., CERAMI, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.85, p.5374-8, 1988.
- ISMAIL, S.O., PARAMCHUK, W., SHEYKY, Y.A., REED, S.G., BHATIA, A., GEDAMU, L. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNA from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.86, p. 187-197, 1997.

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

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

KIRN, D. *et al.* The emerging fields of suicide gene therapy and virotherapy. *Trends Mol. Med.*, v.4, p. 568-573, 2002.

KLOTZ, U. *et al.* Therapeutic efficacy of sulfasalazine and its metabolics in patients with ulcerative colits and Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 303, p.1499-1502, 1980.

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

KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico Guanabara*, Ed.2000/2001, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KRAUTH-SIEGEL, R.L., COOMBS, G.H. Enzymes of parasite thiol metabolism as drugs targets. *Parasitol. Today*, v.15, p. 404-409, 1999.

KRAUTH-SIEGEL, R.L., ENDERS, B., HENDERSON, G.B., FAIRLAMB, A.H., SCHIRMER, R.H. Trypanotione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *Eur. J. Biochem.*, v.164, p. 123-128, 1987.

- LAAKSO, T., STJARNKVIST, P., SJOHOLM, I. Biodegradable microspheres. VI: Lysosomal release of covalently bound antiparasitic drugs from starch microparticles. *J. Pharm. Sci.*, v. 76, p. 134-140, 1987.
- KROGSGAARD-LARSEN, P., BUNDGAARD, H. (Eds.). *A textbook of drug design and development*. Harwood: Academic Publishers, 1991. 643p.
- LAGES-SILVA, E., FILARDI, L.S, BRENER, Z. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.85, n.4, p.401-405, 1990.
- LA-SCALEA, M. A., MAN CHIN, C., FERREIRA, E. I. Geração eletroquímica do nitro radical aniônico a partir do nitrofural utilizando-se eletrodo de carbono vítreo. 10º Encontro Nacional de Química Analítica, Química Analítica e qualidade das águas, Santa Maria, RS, 1999. *Livro de Resumos*, Res. EL-4.
- LA-SCALEA, M.A., MAN CHIN, C., CRUZ, M.L., SERRANO, S.H.P., FERREIRA, E.I Dissociation and electrooxidation of primaquine diphosphate as an approach to the study of anti-Chagas prodrugs mechanism of action. *Bioelectrochemistry*, v.53, p.55-59, 2001.
- LA-SCALEA, M.A., SERRANO, S.H.P., FERREIRA, E.I., BRETT, A.M.O. Voltammetric behavior of benznidazole at DNA-modified glassy carbon electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.29, p.561-568, 2002.

- LEIBY, D.A., READ, E.J., LENES, B.A., YUND, A.J., STUMPF, R.J., KIRCHHOFF, L.V., DODD, R.Y. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, in US blood donors. *J. Infect. Dis.*, v. 176, p. 1047-1052, 1997.
- LE TRANT, N., MESHNICK, S.R., KITCHENER, K., EATON, J.W., CERAMI, A. Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.*, v.258, p. 125-130, 1983.
- LOPES, E.R., CHAPADEIRO, E. Doença de Chagas no triângulo mineiro. *Rev. Goiana Med.*, v. 32, p. 109-113, 1986.
- MARCHÉ, S., MICHELS, P.A.M., OPPERDOES, F.R. Comparative study of *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.106, p. 83-91, 2000.
- MARR, J.J., DOCAMPO, R. Chemotherapy for Chagas' disease: a perspective of current therapy and considerations for future research. *Rev. Infect. Dis.*, v.8, p. 884-903, 1986.
- MASANA, M., TORANZO, E.G.D., CASTRO, J.A. Reductive metabolism and activation of benznidazole. *Biochem. Pharmacol.*, v.33, p. 1041-1045, 1984.
- MAYA, J.D. *et al.* Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and Trypanotione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.86. p. 101-106, 1997.
- McCABE, R.E. Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. *J. Infect. Dis.*, v. 158, p.1408-1409,1988.

- McCARTHY-BURKE, C., TAYLOR, Z.A., BUCK, G.A. Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Gene*, v. 82, p. 177-189, 1989.
- McGRATH, M.E., EAKIN, AE., ENGEL, JC., McKERROW, J.H., CRAIK, C.S., FLETTERICK, R.J.. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chaga's disease. *J.Mol.Biol.*, v.247, p.251-9, 1995.
- McKERROW, J.H., SUN, E., ROSENTHAL, P.J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 47, p.821-853, 1993.
- MEHLOTRA, R.K. Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. *Crit. Rev. Microbiol.*, v.22, p. 295-314, 1996.
- MEIRELLES, M.N.L., JULIANO, L., CARMONA, E., SILVA, S.G, COSTA, E.M., MURTA, A.C., SCHARFSTEIN, J. Inibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.52, p. 175-84, 1992.
- MELTON, R.G., KNOX, R.J., CONNORS, T.A. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Drugs Fut.*, v. 21, n. 2, p. 167-181, 1996.
- MENÉNDEZ, J.C; AVENDAÑO, M C. Diseño de fármacos por modulación de su farmacocinética. Estrategias y aplicaciones. In: AVENDAÑO, M C., ed. *Introducción A La Química Farmaceutica*. McGraw-Hill, 2000, p. 197-227.

- MORAIS, M.D., AUGUSTO, O. Peroxidation of the antimalarial drug primaquine: characterization of a benzidine-like metabolite with methaemoglobine-forming activity. *Xenobiotica*, v.23, p.133-119, 1993.
- MORTY, R.E. *et al.* Oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*, a new member of an emerging subgroup of serine oligopeptidases. *J. Biol. Chem.*, v.274, p. 26149-26156, 1999.
- NARE, B., LUBA, J., HARDY, L.W., BEVERLEY, S.M. New approaches to Leishmania chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. *Parasitology*, v. 114, p. S101-S110.
- OTO, H., SHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.*, v.97, p.133-171.
- PENKETH, P.G., KENNEDY, W.P.K., PATTON, C.L., SARTORELLI, A.C. Trypanosomatid hydrogen peroxide metabolism. *FEBS Lett.*, v. 221, p. 427-431, 1987.
- PENETH, P.G., KLEIN, R.A. Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 20, p. 111-121, 1986.
- PEREIRA DA SILVA, L.H., KIRCHNER, Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection in tissue culture. A comparative study on the action of primaquine, carbidumsulphate and the aminonucleoside of stylomycin. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.4, p.16-28, 1962.

- PÉREZ, J. *et al.* Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, v. 27, p. 771-777, 1999.
- PERSSON, K., ASLUND, L., GRAHN, B., HANKE, J., HEBY, O. *Trypanosoma cruzi* has not lost its S-adenosylmethionine decarboxylase: characterization of the gene and the encoded enzyme. *Biochem. J.*, v.333, p. 527-537, 1998.
- RAMEAU, J.P., DEVILLERS, J., DECLERQ, J.P., CHAUVIERE, G., PERIE, J. Molecular structure of 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazol (Megazol) and related compounds: a concerted study using X-ray crystallography, molecular mechanics, and semiempirical methods. *Struct. Chem.*, v.7, p.187-204, 1996.
- RASSI, A. *et al.* Chagas disease – Clinical Features. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M.E., RASSI, A., eds. *Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. ISBT BRAZIL'92, SÃO PAULO, BRAZIL, p.81-102, 1992.
- ROSS, W.J. Chemotherapy of trypanosomiasis and other protozoan diseases. In: WOLF, M.E., ed. *Burger's medicinal chemistry*, 4th ed, v.2, New York: Wiley, 1980. p.440-479.
- RUBIO, M., PIZZI, T. Acción de la primaquina, pentaquina y pentaquina-quinina, sobre formas sanguíneas virulentas de *Trypanosoma cruzi*. *Boll.Chil.Parasitol.*, v.9, p.75-79, 1954.

- SAN ROMÁN, J., GALLARDO, A., LEVENFELD, B. Polymeric drug delivery systems. *Adv. Mater.*, v.7, n.2, p.203-208, 1995.
- SCHARFSTEIN, J., SCHECHTER, M., SENNA, M., PERALTA, J.M., MENDONÇA-PREVIATO, L., MILES, M.A. *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (Gp57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol.*, v.137, p.1336-1341, 1986.
- SCHMUÑIS, G.A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z. *et al.*, eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 1-15.
- SCHNARE, M.N., GRAY, M.W. A candidate U1 small nuclear RNA for trypanosomatid protozoa. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 23691-23694, 1999.
- SERVEAU, C., LALMANACH, G., JULIANO, M. A., SCHARFSTEIN, J., JULIANO, L., GAUTHIER, F. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrate s and inhibitors. *Biochem. J.*, v. 313, p.951-956, 1996.
- SINGH, G., SHARMA, P.D. Mutual prodrugs – a recent trend in prodrug design. *Indian J. Pharm. Sci.*, v.56, n.3, p.69-79, 1996.
- SOUZA, D.H.F *et al.* *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. *Febs Lett.*, v. 424, p. 131-135, 1998.

- SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z. *et al.*, eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 88-123.
- STUART, K. RNA editing in mitochondrial mRNA of trypanosomatids. *Trends Biochem. Sci.*, v.16, p. 68-72, 1991.
- SZAJNMAN, S.H., YAN, W., BAILEY, B.N., DOCAMPO, R., ELHALEM, E., RODRÍGUEZ, J.B. Design and synthesis of aryloxythyl thiocyanate derivatives as potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation. *J. Med. Chem.*, v. 43, p. 1826-1840, 2000.
- TEMPERTON, N.J., WILKINSON, S.R., MEYER, D.J., KELLY, J.M. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 96, p. 167-176, 1998.
- TESTA, B. Drug Metabolism. In: WOLF, M.E., ed. *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. 5.ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. cap.6, p.129-180.
- TRACY, J.W., WEBSTER JR, L.T. Chemotherapy of parasitic infections. In: HARDMAN, J.G. *et al.*, eds. *Goodman & Gilman's. The pharmacological bases of therapeutics*, 9.ed. New York: McGraw Hill, 1996. p. 955-1007.
- TSUHAKO, M.H., ALVES, M.J.M., COLLI, W., BRENER, Z.E., AUGUSTO, O. Restricted bioreductive metabolism of nitroimidazole-thiadiazol derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Biochem. Pharmacol.*, v.38, p.4491-4496, 1989.

- TURRENS, J.F., WATTS, B.P., ZHONG, L., DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADPH fumarate reductase by benzimidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.82, n.1, p.125-129, 1996.
- ULLMAN, B., CARTER, D. Molecular and biochemical studies on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases of the pathogenic haemoflagellates. *Int. J. Parasitol.*, v. 27, p. 203-213, 1997.
- URBINA, J.A. *et al.* Cure of short-and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science.*, v. 273, p. 969-971, 1996.
- URBINA, J.A., VIVAS, J., VISBAL, G., CONTRERAS, L.M. Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by $\Delta^{24(25)}$ – sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with Ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 73, p. 199-210, 1995.
- URSINI, F., MAIORINO, M., BRIGELIUS-FLOHÉ, R., AUMANN, K.D., ROVERI, A., SCHOMBURG, D., FLOHÉ, L. Diversity of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, v. 252, p. 38-53, 1995.
- VÁSQUEZ-VIVAR, J., AUGUSTO, O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. oxidation and redox cyclizing. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.6848-6854, 1992.
- VÁSQUEZ-VIVAR, J., AUGUSTO, O. Oxidative activity of primaquine metabolites on rat erythrocytes in vitro and in vivo. *Biochem.Pharmacol.*, v.47, p.309-316, 1994.

- VIODÉ, C., ALBUQUERQUE, C. N., CHAUVIÈRE, G., HOUÉE-LÉVIN, C., PÉRIE, J. Comparative study by pulse radiolysis of the radical anion derived from compounds used in Chagas' disease therapy. *New J. Chem.*, v.21, 1331-1338, 1997.
- VIODÉ, C., BETTACHE, N., CENAS, N., KRAUTH-SIEGEL, R.L., CHAUVÈRE, G., BAKALARA, N., PÉRIÉ, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles; *Biochem. Pharmacol.*, v.57, p.549-557, 1999.
- WALSH, C., BRADLEY, M., NADEAU, K. Molecular studies on trypanothione reductase, a target for antiparasitic drugs. *Tibs*, v.16 p. 305-309, 1991.
- WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M.E., RASSI, A. *Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISTB – SBHH (Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia)*, 1992.
- WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: JOLLE, G., WOOLDRIGE, K.R.M., Eds. *Drug Design: fact or fantasy?* London: Academic Press, 1984. p. 47-72.
- WERMUTH, C.G., GAIGNAULT, J.C., MARCHANDEAU, C. Designing prodrugs and bioprecursors I. Carrier prodrugs. In: WERMUTH, C.G., ed. *The practice of Medicinal Chemistry*. London: Academic Press, 1996. p. 671-696.
- WESTWELL, A.D. Novel antitumour molecules. *Drug Discovery Today*. v. 7, p. 739-740, 2002.
- WHO in: <http://www.who.int/ctd/html/chagdts/html> , 2000.

ZICKER, F., ZICKER, E.M. Benefícios previdenciários por incapacidades como indicador de morbidade: estudo da doença de Chagas em Goiás. *Rev. Goiana. Med*, v.31, p.125-136, 1985.

LIV.	<i>Doença do Autor</i>
N. E.	<i>-</i>
DATA	<i>20/03/09</i>
PREÇO	<i>-</i>
TOMBAMENTO	<i>21103/03</i>

f: 17.441

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo