

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

**Planejamento e estudo da viabilidade de obtenção do
pró- fármaco recíproco nitrofural-alendronato
potencialmente antichagásico**

Thaís Costa Contente

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Chung Man Chin

Araraquara
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

**Planejamento e estudo da viabilidade de obtenção do
pró- fármaco recíproco nitrofural-alendronato
potencialmente antichagásico**

Thaís Costa Contente

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Chung Man Chin

Araraquara
2006

CANDIDATA: THAIS COSTA CONTENTE

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

Planejamento e estudo da viabilidade de obtenção do pró- fármaco recíproco nitrofural-alendronato potencialmente antichagásico

A comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 14 de Julho de 2006, considerou a candidata:

APROVADA

REPROVADA

- 1) Examinador: (*Prof^a. Dr^a. Elizabeth Igne Ferreira*) -----
- 2) Examinador: (*Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Cruz*) -----
- 3) Presidente: (*Prof^a. Dr^a. Chung Man Chin*) -----

“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio”.

Martin Luther King Jr.

Aos meus pais Arivaldo e Déa, que eu amo tanto, Obrigada pela oportunidade, por toda força e incentivo, pelo apoio, suporte, confiança e amor incondicional. A vocês que sempre acreditaram em mim e que sempre incentivaram as minhas escolhas. Sempre muito obrigada!!!

**“...What you don't have you don't need, now what you don't know
you can feel some how...”
(Beautiful Day - Bono Vox)**

*Ao meu irmão André por ser simplesmente essa pessoa
maravilhosa, que eu tanto amo, que com um simples olhar já me faz
acreditar que vale a pena seguir sempre... em busca da felicidade
plena!!! Para você que nunca teve dúvidas de quão árdua,
longa e vitoriosa seria essa caminhada.*

**“Os pedidos que fazemos aos Céus encontram-se,
na maioria das vezes, em nossas próprias mãos”**

William Shakespeare

*Ao meu querido Diogo,
Meu companheiro, amigo e grande amor,
Obrigada por ter me ajudado a acreditar que tudo isso seria possível,
Obrigada pelo incentivo, pela força, dedicação e paciência.
Agradeço por você fazer parte da minha vida,
por todo seu amor e inspiração.
Te amo !!!*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a. Chung Man Chin por ter aberto as portas deste laboratório e acreditado que eu poderia caminhar junto a este trabalho. Agradeço pela dedicação, orientação e apoio em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a. Adélia Emília de Almeida pela força, amizade, carinho e contribuição durante todos os momentos deste trabalho, inclusive na qualificação.

À Prof^a. Dr^a. Márcia da Silva por toda força, carinho e valiosos comentários.

Ao Prof. Dr. Carlos Nassute pelas valiosas dicas e pela dedicação e paciência durante o estágio de docência.

À Prof^a. Dr^a. Elizabeth Igne Ferreira, por toda atenção, dedicação e por sua grande contribuição a este durante a defesa. Agradeço pela disponibilidade e por todas valiosas dicas e conversas com seu grupo de trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Cruz, pelo início da minha vida na pesquisa e na ciência, por me apresentar a Química Farmacêutica e por um dia ter me dito *“Bem vinda ao mundo dos imortais”*. Agradeço pela enorme e valiosa contribuição a este trabalho durante a qualificação e defesa. Muito obrigada por tudo, sempre!

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto do Laboratório de Análises Toxicológicas, FCF – USP, e seu aluno Sidnei Moura pela ajuda, paciência, força e dedicação na realização das análises de RMN.

A toda equipe da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), pelo auxílio e paciência na busca de material bibliográfico e informações utilizadas neste trabalho.

A seção de Pós-Graduação, especialmente à Laura, Cláudia e Sônia, pela amizade, ajuda, paciência e valiosas orientações.

À minha grande amiga Vanessa Fabrina Zambrano, pela paciência e companhia indispensáveis durante toda essa caminhada. Aos nossos grandes e saudosos momentos, obrigada por tudo!

Ao meu amigo Arnóbio por toda sua força e amizade, pelas palavras amigas e sinceras. Agradeço seu total apoio em todos os momentos e dificuldades enfrentadas.

Aos colegas de laboratório, Vanessa, Jean, Edinir, Patrícia, Mara, Ricardo, Rodolfo, Renato, Lorena, Antônio, Lúcia, Lia, Paulo (Escobar), Ana Paula (Caçula) e todos os outros alunos e estagiários pela convivência, amizade e toda força que uma equipe pode ter.

Aos técnicos Osmar, Eduardo, Luciene e Karina, agradeço a atenção, disponibilidade e toda a ajuda prestada.

Aos grandes amigos Iguatemi e Andréa pela ajuda, paciência, convivência intensa e por toda amizade conquistada. Agradeço todo apoio e dicas para as sínteses e na busca de novas metodologias.

Ao amigo Gustavo Trossini, por tudo, apoio inicial e fundamental, pelas dicas e por toda sua amizade. *“Parceria contínua não se comprando no mercado!!!”*

Aos novos e grandes amigos Felipe Augusto Dörr, Rodrigo Cella (Cabritinho), Cláudio Martin Pereira de Pereira (Claudião), pela ajuda na realização e elucidação dos espectros de massas e RMN.

Ao meu tio Prof. Dr. José Castilho Marques por ter sempre acreditado em mim, por ter me indicado o caminho da *Iniciação Científica* e o quanto a ciência seria importante na minha vida.

A toda minha família: os **COSTA**, os **CONTENTE** e os **DE OLIVEIRA SILVA**: obrigada por toda essa força maravilhosa que vocês sempre me deram, pelo amor, apoio, incentivo e dedicação. É uma alegria festejar essa vitória com todos vocês!

A CAPES e FAPESP pela bolsa concedida e apoio financeiro.

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	4
2.1. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Doença de Chagas	5
3.2. Agente etiológico e Ciclo Evolutivo	8
3.3. Vetores e Reservatórios	14
3.4. Vias de Transmissão	17
3.5. Tratamento	18
3.6. Alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos	23
3.6.1. Tripanotiona redutase	23
3.7. Bifosfonatos	28
3.7.1. Bifosfonatos para tratamento dos ossos	28
3.7.2. Bifosfonatos na doença de Chagas	29
3.7.3. REA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	39
3.8. Planejamento de fármacos	43
3.8.1. Modificação Molecular	44
3.8.2. Latenciação	44
3.8.3. Planejamento e aplicação de pró-fármacos	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1. Material	61
4.1.1. Reagentes e solventes	61
4.2. Análises	63
4.2.1. Determinação da faixa de fusão	63

4.2.2. Análise no Infravermelho (IV)	63
4.2.3. Análise cromatográfica em camada delgada	63
4.2.4. Análise de Espectroscopia de Massas	64
4.2.5. Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H) e de Carbono ¹³ (RMN ¹³ C)	64
4.3. Métodos	65
4.3.1. Métodos de Síntese	67
4.3.1.1. Síntese do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH) – composto (2)	67
4.3.1.2. Síntese da base de Mannich nitrofural hidroximetilado e alendronato de sódio – composto (4)	68
4.3.1.3. Síntese do pró-fármaco nitrofural hidroximetilado – anidrido succínico – alendronato de sódio – composto (6)	70
4.3.1.4. Síntese do intermediário esterificado de alendronato de sódio - (composto 8)	71
4.3.1.5. Síntese do intermediário tosilado de nitrofural hidroximetilado – composto (10)	72
4.3.1.6. Síntese do intermediário hemissuccinato de nitrofural hidroximetilado – composto (11)	74
4.3.1.7. Síntese do intermediário hemissuccinoil alendronato – composto (12)	75
4.3.1.8. Síntese do intermediário derivado de alendronato de sódio e cloreto de succinoíla – compostos (14 e 12)	76
4.3.1.9. Síntese do intermediário acetilado de nitrofural hidroximetilado – composto (17).	77
4.3.1.10. Síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural hidroximetilado e hemissuccinoil alendronato – composto (6)	78
4.3.1.11. Síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural e hemissuccinoil alendronato – composto (6)	79
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1. Sínteses	80

5.1.1. Síntese do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH)	80
5.1.2. Tentativa de síntese da base de Mannich a partir do nitrofural hidroximetilado e alendronato de sódio	91
5.1.3. Tentativa de síntese do pró-fármaco nitrofural hidroximetilado – anidrido succínico - alendronato de sódio	97
5.1.4. Síntese do intermediário esterificado de alendronato de sódio	99
5.1.5. Tentativa de síntese do derivado tosilado de nitrofural hidroximetilado	107
5.1.6. Tentativa de síntese do intermediário hemissuccinato de nitrofural hidroximetilado	114
5.1.7. Síntese do intermediário hemissuccinoil alendronato (HSAL)	116
5.1.8. Síntese do intermediário derivado de alendronato de sódio e cloreto de succinoíla	119
5.1.9. Tentativa de síntese do intermediário acetilado de nitrofural hidroximetilado	122
5.1.10. Tentativa de síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural hidroximetilado e hemissuccinoil alendronato.	124
5.1.11. Tentativa de síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural e hemissuccinoil alendronato.	126
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	127
6.1. Considerações finais	127
6.2. Perspectivas	129
7. EXPERIMENTOS	130
7.1. Métodos de Síntese	130
7.1.1. Síntese do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH)	130
7.1.1.1. Meio básico	130
7.1.1.2. Meio ácido	130
7.1.2. Síntese da base de Mannich nitrofural hidroximetilado e alendronato de sódio	131

7.1.3. Síntese do pró-fármaco nitrofural hidroximetilado – anidrido succínico – alendronato de sódio	133
7.1.4. Síntese do intermediário esterificado de alendronato de sódio	134
7.1.5. Síntese do intermediário tosilado de nitrofural hidroximetilado	136
7.1.6. Tentativa de síntese do derivado hemissuccinato de nitrofural hidroximetilado	139
7.1.7. Síntese do derivado hemissuccinoil alendronato	140
7.1.8. Síntese do intermediário derivado de alendronato de sódio e cloreto de succinoíla	141
7.1.9. Síntese do intermediário acetilado de nitrofural hidroximetilado	142
7.1.10. Síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural hidroximetilado e hemissuccinoil alendronato	143
7.1.11. Síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural e hemissuccinoil alendronato	144
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Biossíntese do colesterol	34
Esquema 2: Esquema representativo de um acidocalcissoma.	37
Esquema 3: Representação esquemática do conceito de pró-fármacos	45
Esquema 4: Alguns problemas que limitam a utilização do fármaco.	49
Esquema 5: Reação geral da formação da base de Mannich.	58
Esquema 6: Mecanismo de reação proposto para decomposição das bases de Mannich.	59
Esquema 7: Reação proposta para síntese do derivado hidroximetilnitrofurural (NFOH), composto (2), a partir do NF (1) em meio básico ou ácido.	67
Esquema 8: Reação proposta para síntese da base de Mannich, composto (4).	68
Esquema 9: Reação proposta para síntese do pró-fármaco recíproco NFOH – anidrido succínico – alendronato de sódio, composto (6).	70
Esquema 10: Reação proposta para síntese do derivado esterificado, composto (8), utilizando alendronato de sódio (3) e sulfato de dimetila (7) em meio básico.	71
Esquema 11: Reação proposta para síntese do derivado tosilado, composto (10) utilizando NFOH (2) e cloreto de tosila (9) em meio básico.	72
Esquema 12: Reação proposta para síntese do derivado hemissuccinato de NFOH, composto (11), a partir do NFOH (2) e anidrido succínico (5), em meio ácido ou meio básico.	74
Esquema 13: Reação proposta para síntese do derivado hemissuccinoil-AL, composto (12), a partir do AL (3) e anidrido succínico (5).	75
Esquema 14: Reação proposta para síntese dos derivados contendo alendronato de sódio e cloreto de succinoíla, composto (14 e 12).	76
Esquema 15: Reação proposta para síntese do derivado acetilado de NFOH – composto (17).	77

Esquema 16: Reação proposta para síntese do pró-fármaco proposto – composto (6).	78
Esquema 17: Reação proposta para síntese do pró-fármaco proposto – composto (6).	79
Esquema 18: Síntese do derivado NFOH em meio básico (CHUNG, 1996) – experimento 1.	80
Esquema 19: Mecanismo da reação de formação do derivado hidroximetilado, composto (2) em meio básico.	81
Esquema 20: Interpretação, figura 33 (m/z) do derivado NFOH.	85
Esquema 21: Síntese do derivado NFOH em meio ácido – experimento 3.	90
Esquema 22: Mecanismo da reação do derivado hidroximetilado em meio ácido.	90
Esquema 23: Tentativa de síntese da base de Mannich NFOH-AL – experimento 4.	91
Esquema 24: Tentativa de síntese da base de Mannich NFOH-AL – experimento 5.	91
Esquema 25: Mecanismo proposto para a reação de síntese de base de Mannich NFOH – alendronato de sódio em meio básico.	92
Esquema 26: Tentativa de síntese da base de Mannich NF-AL – experimento 6.	93
Esquema 27: Mecanismo proposto para reação de síntese da base de Mannich de NFOH - alendronato de sódio em meio ácido.	93
Esquema 28: Tentativa de síntese da base de Mannich NFOH-AL – experimento 7.	94
Esquema 29: Tentativa de síntese da base de Mannich NFOH-AL – experimentos 8 e 9.	95
Esquema 30: Tentativa de síntese da base de Mannich NFOH-AL – experimento 10.	95
Esquema 31: Mecanismo proposto para reação de síntese da base de Mannich - composto 4, em meio básico.	96
Esquema 32: Tentativa de síntese do pró-fármaco NFOH-ácido succínico-AL – experimento 11.	97

Esquema 33: Tentativa de síntese do pró-fármaco NFOH-ácido succínico-AL – experimento 12.	98
Esquema 34: Síntese do derivado esterificado de AL.	99
Esquema 35: Mecanismo proposto para a reação de esterificação do alendronato em meio básico.	100
Esquema 36: Interpretação da figura 39 (m/z) do alendronato de sódio metilado (8).	102
Esquema 37: Síntese do derivado metilado de AL – experimento 15.	102
Esquema 38: Rota de síntese de aminobifosfonato.	107
Esquema 39: Mecanismo proposto para a reação de formação do derivado tosilado de NFOH em meio básico.	108
Esquema 40: Tentativa de síntese do derivado tosilado de NFOH – experimento 19.	108
Esquema 41: Mecanismo da formação do derivado NFCH ₂ DMAP - experimento 19.	109
Esquema 42: Mecanismo do equilíbrio ácido-base do NFOH e 4-DMAP - experimento 19.	109
Esquema 43: Interpretação da figura 44 (m/z) da tentativa de ligação NFOH-cloreto tosila.	110
Esquema 44: Tentativa de síntese do derivado NFOH-tosila – experimento 20.	111
Esquema 45: Mecanismo da formação do derivado NFCH ₂ ButNH ₂ – experimento 26.	112
Esquema 46: Interpretação da figura 44 (m/z) da tentativa de ligação NFOH-cloreto tosila na presença de butilamina.	113
Esquema 47: Tentativa de síntese do derivado HSNFOH, em meio ácido – experimento 28.	114
Esquema 48: Mecanismo proposto para reação de síntese do hemissuccinato de NFOH em meio ácido.	114
Esquema 49: Tentativa de síntese do derivado HSNFOH, em meio básico – experimento 29.	114
Esquema 50: Mecanismo proposto para reação de síntese do hemissuccinato de NFOH em meio básico.	115

Esquema 51: Tentativa de síntese do derivado HSNFOH, em meio básico – experimentos 31, 32 e 33.	115
Esquema 52: Mecanismo para reação de síntese do derivado HSAL em meio básico.	116
Esquema 53: Síntese do derivado HSAL – experimento 36.	117
Esquema 54: Fragmentações (m/z) do derivado HSAL, referente à figura 46.	118
Esquema 55: Tentativa de síntese do derivado AL- cloreto de succinoíla – experimento 37.	119
Esquema 56: Mecanismo para a síntese do derivado AL - cloreto de succinoíla.	119
Esquema 57: Síntese do derivado AL–hemissuccinoil – experimento 38.	120
Esquema 58: Mecanismo para síntese do derivado AL-hemissuccinoil em água e meio básico.	120
Esquema 59: Fragmentações (m/z) do derivado AL-succinoil, referente à figura 46.	121
Esquema 60: Mecanismo proposto para síntese do derivado acetilado de nitrofural hidroximetilado em meio básico.	122
Esquema 61: Pró-fármaco proposto a partir do derivado acetilado de NFOH e AL – composto 20.	123
Esquema 62: Pró-fármaco proposto a partir do derivado acetilado de NFOH e HSAL – composto 24.	123
Esquema 63: Pró-fármaco proposto a partir do derivado NFOH e HSAL – composto 6.	124
Esquema 64: Mecanismo proposto para síntese do pró-fármaco derivado de NFOH e HSAL, em meio básico.	125
Esquema 65: Pró-fármaco proposto a partir do NF e HSAL – composto 6.	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da doença de Chagas.	5
Figura 2: Eliminação da transmissão: Incidência de Infecção 1980-2000.	7
Figura 3: <i>Trypanosoma cruzi</i> - forma tripomastigota.	10
Figura 4: <i>Trypanosoma cruzi</i> – forma epimastigota.	10
Figura 5: <i>Trypanosoma cruzi</i> – forma amastigota.	11
Figura 6: Ciclo evolutivo do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> .	12
Figura 7: Inchaço caracterizado por sinal de Romaña.	13
Figura 8: Distribuição geográfica dos triatomíneos – América Latina e Caribe, 2004.	15
Figura 9: <i>Rhodnius prolixus</i> adulto alimentando-se de sangue pela pele humana.	16
Figura 10: Alguns dos fármacos já utilizados na terapia antichagásica.	19
Figura 11: Estruturas moleculares do nifurtimox e benznidazol.	21
Figura 12: Estruturas moleculares da glutatona e tripanotona.	25
Figura 13: Estruturas moleculares da glutatona e tripanotona dissulfeto.	25
Figura 14: Estrutura molecular do nitrofural (NF).	26
Figura 15: Estrutura molecular do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH).	27
Figura 16: Estrutura química dos ácidos pirofosfórico e bifosfônico.	28
Figura 17: Alendronato de sódio - Sal monossódico triidratado ($C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$).	29
Figura 18: Fármacos BFs inibidores de TcFPPS.	30
Figura 19: Estruturas moleculares referente a FPP e GPP.	31
Figura 20: Efeito dos BFs na via do mevalonato, inibindo a farnesilpirofosfato sintase. HMG-CoA – hidroximetilglutaril-coenzima A.	32
Figura 21: Ultraestrutura de epimastigotas puros.	36
Figura 22: Estruturas gerais do ácido pirofosfórico e ácido bifosfônico.	39

Figura 23: Estruturas referentes aos BFs de 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a gerações – etidronato, alendronato e zoledronato – respectivamente.	40
Figura 24: Alguns pró-fármacos blockbuster.	46
Figura 25: Lovastatina e o derivado não-lactônico ativo.	52
Figura 26: Pró-fármaco lipofílico esterificado (aciloxialquil) de ampicilina.	54
Figura 27: Derivado hidroximetilado do nitrofural (NFOH).	54
Figura 28: Pró-fármaco recíproco de sulfapiridina e ácido aminossalicílico (5-ASA).	56
Figura 29: Pró-fármaco recíproco olsalazina.	57
Figura 30: Pró-fármaco recíproco dipeptídico derivado de nitrofural e primaquina, potencialmente antichagásico.	57
Figura 31: Espectro no infravermelho (KBr, $n\text{ cm}^{-1}$) do NFOH, composto (2) (experimento 1).	82
Figura 32: Espectro no infravermelho (KBr, $n\text{ cm}^{-1}$) NFOH em 5 horas (experimento 2).	83
Figura 33: Espectro no infravermelho (KBr, $n\text{ cm}^{-1}$) do NF – composto (1).	84
Figura 34: Espectros de massas (m/z) do derivado hidroximetilado do nitrofural (NFOH) e do nitrofural (NF).	85
Figura 35: Espectro de RMN ^1H do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz).	86
Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH) ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz).	87
Figura 37: Espectro de RMN ^1H do nitrofural (NF) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz).	88
Figura 38: Espectro de RMN ^{13}C do nitrofural (NF), ($\text{DMSO}-d_6$ - 75 MHz).	89
Figura 39: Espectro de massas (m/z) do alendronato metilado (8).	101
Figura 40: Espectro de massas (m/z) do alendronato de sódio (3).	101
Figura 41: Espectro de RMN ^1H do alendronato de sódio (3) (D_2O – 300 MHz).	103

Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C do alendronato de sódio (3) (D_2O - 75 MHz).	104
Figura 43: Espectro de RMN ^1H do alendronato de sódio metilado (8) (experimento 15) (D_2O - 300 MHz).	105
Figura 44: Espectro de massas (m/z) da tentativa de ligação NFOH-cloreto de tosilato usando 4-DMAP como base (experimento 19).	110
Figura 45: Espectro de massas (m/z) da tentativa de ligação do NFOH-cloreto tosilato usando TEA e butilamina (experimento 26).	112
Figura 46: Espectro de massas (m/z) do derivado HSAL (experimento 36).	117
Figura 47: Espectro de massas (m/z) do derivado AL-succinil (experimento 38).	121

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Infecção humana por <i>Trypanosoma cruzi</i> e redução da incidência no Cone Sul, 1983-1999.	7
Tabela 2: Identificação de alvos quimioterápicos potenciais em <i>T. cruzi</i> .	23
Tabela 3: Métodos utilizados para síntese do derivado nitrofural hidroximetilado – composto (2)	67
Tabela 4: Métodos utilizados para síntese da base de Mannich, composto (4)	69
Tabela 5: Métodos utilizados para síntese pró-fármaco recíproco NFOH -anidrido succínico – alendronato de sódio, composto (6)	70
Tabela 6: Métodos utilizados para síntese do derivado esterificado de alendronato de sódio – composto (8)	71
Tabela 7: Métodos para síntese do derivado tosilado de nitrofural hidroximetilado – composto (10)	73
Tabela 8: Métodos para síntese do derivado hemissuccinato de NFOH – composto (11)	74
Tabela 9: Métodos para síntese do derivado hemissuccinoil-AL – composto (12).	75
Tabela 10: Métodos para síntese dos derivados contendo alendronato de sódio e cloreto de succinoíla - composto (14 e 12).	76
Tabela 11: Métodos para síntese do derivado acetilado de NFOH – composto (17)	77
Tabela 12: Método para síntese do pró-fármaco recíproco proposto - composto (6)	78
Tabela 13: Método para síntese do pró-fármaco proposto – composto (6).	79
Tabela 14: Análise no infravermelho e faixa de fusão do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH)	82
Tabela 15: Análise no infravermelho e faixa de fusão do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH) – 5 horas.	83
Tabela 16: Análise no infravermelho e faixa de fusão do NF (1)	84
Tabela 17: Atribuições de RMN ¹ H e de RMN ¹³ C do NFOH.	87

Tabela 18: Atribuições de RMN ^1H e de RMN ^{13}C do NF (1).	89
Tabela 19: Atribuições de RMN ^1H e de RMN ^{13}C do alendronato de sódio (3).	104
Tabela 20: Atribuições de RMN ^1H do produto obtido no experimento 15, composto AL-metilado (8).	105

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACN
- AL – alendronato de sódio
- AND. SUCC. - anidrido succínico
- ButNH₂ – butilamina
- CCD – cromatografia de camada delgada
- CH₂O - formaldeído
- Cl SUCC. – cloreto de succinoíla
- Cl. Cloroacet. – cloreto de cloroacetila
- DCC - dicitcloexilcarbodiimida
- DCM - diclorometano
- 4-DMAP – 4-dimetilaminopiridina
- DMF - dimetilformamida
- DMSO - dimetilsulfóxido
- Tos-Cl – cloreto de tosila
- DMS – sulfato de dimetila
- H₂SO₄ - ácido sulfúrico
- HOBt - hidroxibenzotriazol
- HSAL – hemissuccinoil de alendronato
- KBr – brometo de potássio
- Na₂CO₃ – carbonato de sódio
- K₂CO₃ – carbonato de potássio
- NaOH – hidróxido de sódio
- NF – nitrofural
- NFOH – nitrofural hidroximetilado

- NH_4OH – hidróxido de amônio
- polyPs - polifosfatos
- Py – piridina
- TEA - trietilamina

RESUMO

A doença de Chagas é uma infecção generalizada, de natureza endêmica e evolução essencialmente crônica causada por um protozoário, o *Trypanosoma cruzi*. Esta continua a representar sérios problemas médico-sanitários na América Latina, sendo considerada como uma das maiores doenças parasitárias pela Organização Mundial de Saúde. Estima-se que entre 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas, e aproximadamente 120 milhões expostas ao risco de infecção. Do ponto de vista terapêutico, apenas dois fármacos estão disponíveis, o benznidazol e o nifurtimox, sendo apenas o primeiro utilizado no Brasil. A quimioterapia para doença de Chagas é muito deficiente, estes agentes produzem sérios efeitos adversos e apresentam-se ativos apenas na fase aguda da doença. Dentre as alternativas de obtenção de novos fármacos, os processos de modificação molecular são promissores, destacando-se a latenciação, transformação do fármaco em transporte inativo, que *in vivo*, mediante reação química e/ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Uma das formas latentes obtidas mediante este processo denomina-se pró-fármaco. Para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e com menor toxicidade, a descoberta de alvos específicos é fator preponderante. Assim ao se promover a ligação do hidroximetilnitrofural a um transportador bifosfonato (ácido alendrônico) empregando-se o método da latenciação pode-se obter pró-fármaco recíproco com ação sinérgica e seletiva às células do *T.cruzi*, promovendo ataque a dois sistemas enzimáticos distintos do parasito, inibindo a tripanotiona redutase e comprometendo o sistema de defesa redox do parasito e favorecendo o acúmulo do bifosfonato nos acidocalcissomas e inibindo seu metabolismo do pirofosfato.

Palavras chave: doença de Chagas, latenciação, nitrofural hidroximetilado, transportador bifosfonato (ácido alendrônico).

ABSTRACT

Chaga's disease is a widespread infection, of endemic nature and chronicle evolution caused essentially by a protozoan, *Trypanosoma cruzi*. This continues to represent serious sanitarium problems in Latin America, being considered as one of the largest parasitic disease by the World Health Organization. About 16 to 18 million people are infected, and approximately 120 million exposed to the risk of infection. From therapeutic point of view, only two drugs are available, benznidazole and nifurtimox, but only the first is being used in Brazil. The chemotherapy available for Chaga's disease is very deficient, as these agents produce serious adverse effects and that drugs are not efficient in the chronic phase of the disease. Among the alternatives for developing new drugs, the molecular modification processes are promising, standing out the latentiation process, which comprehends the transformation of a drug in an inactive form that *in vivo*, through chemical or enzymatic reactions, release the drug either at or near the site of action. Prodrugs can be obtained by this process of latentiation. For the development of more selective drugs and with lower toxicity, the discovery of specific targets is a preponderant factor. This work proposes a mutual prodrug design, with synergic and selective action against *T. cruzi* using a nitrofurazone hydroxymethyl derivative and a bisphosphonate carrier (alendronic acid). This prodrug would be able to attack two distinct enzymatic systems of the parasite, inhibiting tripanotione reductase and committing its redox system of defense and promoting a specific accumulation of the bisphosphonate in acidocalcisomes, inhibiting the parasite pyrophosphate metabolism.

Key words: Chaga's disease, drug design, nitrofurazone hydroxymethyl derivative, bisphosphonate carrier (alendronic acid).

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 3 bilhões de indivíduos no mundo sofrem de infecções parasitárias causadas por protozoários ou helmintos patogênicos (TRACY e WEBSTER Jr., 2001).

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma infecção generalizada, de natureza endêmica e evolução essencialmente crônica, causada por um protozoário - o *Trypanosoma cruzi* – e transmitida ao homem e a outros animais através de triatomíneos (RASSI et al., 1991). Sendo caracterizada tecnicamente como uma zoonose, é muito difundida do México ao sul da Argentina (SZAJNMAM, 2003). Estima-se que entre 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença, e aproximadamente 120 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção estimando-se em 25% da população latino-americana (WHO, 2005).

No Brasil, a doença se espalha por 2.450 municípios deixando sob risco de infecção 28 milhões de pessoas (DIAS, 2000). A população infectada chega a 4,3% da população total, ou seja, 5 milhões sendo que 60% presentes na área urbana (DIAS, 2000).

A doença de Chagas, por sua grande difusão, pela gravidade das manifestações que pode acarretar, por não ter tratamento específico definido e pela complexidade da sua profilaxia, representa grave e alarmante problema sanitário. Ocupa lugar primordial entre as endemias rurais, ponderadas sua prevalência e patogenicidade, inutilizando muitas vidas em idade produtiva (RASSI et al., 1991) e impondo alta sobrecarga sócio-econômica em países com economias fracas ou deterioradas (TDR, 2005).

Pessoas infectadas pelo *T. cruzi* podem sofrer de danos cardíacos, gastrintestinais ou neurológicos. Estima-se que de 25-30% dos indivíduos infectados terão seus quadros patológicos evoluídos para danos irreversíveis.

Do ponto de vista terapêutico, apenas dois fármacos são utilizados o benznidazol, um derivado nitroimidazol; e o nifurtimox, um composto nitroheterocíclico (ANANDAN, 1997; KOROLKOVAS, 1988, 2000; URBINA, 2003), sendo que no Brasil, apenas o benznidazol é utilizado, já que as cepas brasileiras de *T. cruzi* apresentam-se resistentes ao nifurtimox.

A quimioterapia para doença de Chagas é ainda muito deficiente. Esses agentes produzem graves efeitos adversos e apresentam-se ativos apenas na fase aguda da doença.

No que se refere à introdução de novos fármacos, os processos de modificação molecular (KOROLKOVAS, 1998; BUNDGAARD, 1985, 1991; WERMUTH, 1996; FRIIS e BUNDGAARD, 1996, CHUNG, 2005) são promissores. Entre eles destaca-se a latenciação, transformação do fármaco em transporte inativo, que *in vivo*, mediante reação química e/ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Uma das formas latentes obtidas mediante este processo denomina-se pró-fármaco (BUNDGAARD, 1991, WERMUTH, 1996). A latenciação permite a melhora das propriedades físico-químicas do fármaco por meio da escolha de transportadores adequados, via de regra desprovidos de atividade biológica (BUNDGAARD, 1991), permitindo sua reintrodução no mercado. Para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e com menor toxicidade, a descoberta de alvos específicos é fator preponderante. Estudos comparativos entre a bioquímica do parasito e a do hospedeiro constituem ferramenta importante para a introdução de novos quimioterápicos de forma racional (WOLF, 1995; WERMUTH, 1996). Rotas bioquímicas como a biossíntese de esteróis, proteólise mediada por cruzipaina, inibição de tripanotona redutase e o metabolismo do pirofosfato têm sido quimicamente validados e as atividades seletivas tanto *in vitro* e quanto *in vivo* dos inibidores destas rotas têm sido demonstrados (URBINA, 2003).

Estudos sobre os mecanismos de ação de série de bifosfonatos derivados de ácidos graxos mostram que estes são potentes inibidores da proliferação e crescimento do *T. cruzi* (amastigotas) na sua forma intracelular *in vitro* e *in vivo*. Os bifosfonatos, análogos do pirofosfato, são utilizados para tratamentos de distúrbios na reabsorção óssea, como osteoporose e hipercalcemia causada por tumores e metástases em ossos, porém sua atividade inibidora no *T. cruzi* decorre de seu acúmulo de forma seletiva no parasito, não afetando as células do hospedeiro, e ainda, inibe enzimas envolvidas em reações orgânicas e inorgânicas do pirofosfato com a farnesilpirofosfato sintase e com a bomba de H⁺-pirofosfatase (URBINA, 2003). Os bifosfonatos mais potentes são aqueles que apresentam nitrogênio em sua estrutura química, como o alendronato, o risedronato e pamidronato. A atividade

seletiva destes compostos ao *T. cruzi* é resultante do acúmulo desses compostos em suas organelas acidocalcissomas, envolvidas no armazenamento de cátions e polifosfatos (URBINA, 2003).

Outro alvo terapêutico é a tripanotiona redutase, enzima chave do metabolismo antioxidativo do *Trypanosoma cruzi* (HENDERSON *et al*, 1994; JOCKERS-SCHRÜBL *et al*, 1989). Esta enzima catalisa a redução de derivados nitrofurânicos de naftoquinonas substituídas, sendo mais ativa nos compostos que apresentam grupos funcionais básicos na cadeia lateral. Além disso, esses derivados comportam-se como inibidores enzimáticos, impedindo a redução do substrato fisiológico, o dissulfeto de tripanotiona redutase. Os nitrofuranos provocam ainda a inativação irreversível da enzima em condições anaeróbicas.

Trabalhos de UJIKAWA e colaboradores e CHUNG, 1996 sugeriram que o derivado hidroximetilado de nitrofural apresenta atividade antibacteriana e antichagásica superior à molécula matriz.

Assim, ao promover a ligação de um inibidor de tripanotiona redutase (nitrofural/hidroximetilnitrofural) a um transportador bifosfonato empregando-se o método da latenciação pode-se obter pró-fármaco recíproco, agindo de forma sinérgica as células do *T.cruzi*, promovendo o acúmulo do bifosfonato nos acidocalcissomas, e inibindo o metabolismo do pirofosfato.

2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Visto que ao se promover a ligação de um inibidor de tripanotona redutase (nitrofural/hidroximetilnitrofural) a um transportador bifosfonato mediante o emprego do método da latenciação pode-se obter um pró-fármaco recíproco que atue no *Trypanosoma cruzi* promovendo o acúmulo do bifosfonato e iniba o metabolismo do pirofosfato, o presente trabalho tem como objetivos planejar, sintetizar e caracterizar pró-fármacos recíprocos derivados de nitrofural e ácido alendrônico (bifosfonato) potencialmente antichagásicos, com ação sinérgica e seletiva em *Trypanosoma cruzi*.

2.1. Objetivos específicos

- Planejamento e estudo da viabilidade de obtenção do pró-fármaco recíproco nitrofural-alendronato;
- Otimização da síntese do derivado de hidroximetilado de nitrofural (NFOH);
- Síntese de derivados de hidroximetilado de nitrofural e alendronato de sódio;
- Síntese do pró-fármaco recíproco hidroximetilnitrofural e alendronato de sódio;
- Caracterização e purificação dos compostos obtidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas continua a representar graves problemas médico-sanitários na América Latina, sendo considerada como uma das maiores doenças parasitárias pela Organização Mundial de Saúde - OMS (MONCAYO, 1992; ORIEHEL et al., 1995; WHO, 2005).

A doença de Chagas foi descoberta por Carlos Chagas em 1909, que aos 29 anos de idade foi digno de menção, por ser singular na história da Medicina, um mesmo investigador ter descoberto o agente etiológico, seu transmissor e as manifestações clínicas da infecção (RASSI et al., 1991).

A doença é uma zoonose endêmica em 21 países, com estimativa de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas e com mais de 120 milhões em risco de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Existente somente no continente Americano, está amplamente distribuída na América Central e Sul, estendendo-se do sul dos Estados Unidos até a Argentina (SZAJNMAN et al., 2005). É na América do Sul, principalmente Argentina, Brasil, Chile, Uruguai e Venezuela, que a doença de Chagas constitui grave e alarmante problema de saúde pública, conforme mostra o mapa na figura 1(OMS, 2005).

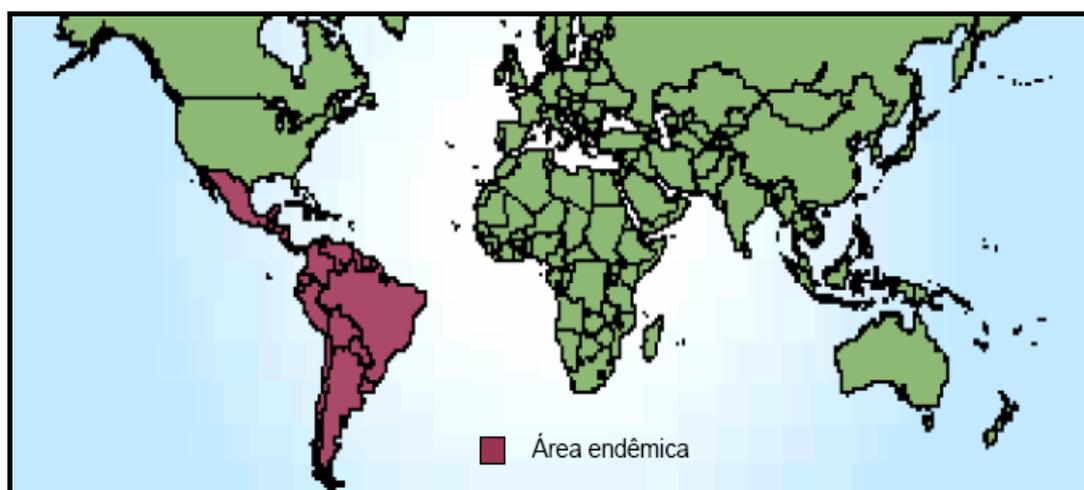


Figura 1: Distribuição geográfica da doença de Chagas.

Fonte: <http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>, 2005.

No Brasil, os estados que apresentam a mais alta endemicidade são Minas Gerais, Goiás, Bahia, Paraná e Rio Grande do Sul (RASSI et al., 1991). A doença se espalha por 2,450 municípios deixando sob risco de infecção 28 milhões de pessoas. A população infectada chega a 4,3% da população total, ou seja, existem entre 6 a 8 milhões de indivíduos infectados, sendo que 60% presentes na área urbana (DIAS, 2000). Esses compreendem, em sua maioria, indivíduos de origem rural e pertencentes a níveis sócio-econômicos mais baixos, contaminados através de fezes infectadas de triatomíneos. É estimado que, 25-30% dos indivíduos infectados terão seus quadros patológicos evoluídos para danos irreversíveis (TDR, 2005). A morbimortalidade da doença de Chagas é significativa, vitimando 20% ou mais dos indivíduos infectados, que adquirem cardiopatia chagásica crônica evolutiva podendo ser letal para no mínimo 15.000 pessoas/ano (DIAS, 2000).

O risco de infecção da doença está diretamente relacionado à pobreza e o inseto vetor que transmite o parasito encontra um habitat favorável nas fendas de paredes e telhados de casas pobres em áreas rurais e periferias urbanas. Os movimentos de migração campo/cidade que ocorreram na América Latina entre as décadas de 1970 e 1980 mudaram os padrões epidemiológicos da doença de Chagas e a transformaram em uma infecção urbana, que pode ser transmitida por transfusões de sangue (SILVEIRA et al., 2003).

Em algumas cidades do continente, a quantidade de sangue contaminado em bancos de sangue varia de 3,0 a 53,0%, mostrando que a prevalência da contaminação por *T. cruzi* é maior do que a contaminação pelos vírus da AIDS e da hepatite B e C (WHO, 2002).

De acordo com o Relatório de Desenvolvimento Humano da **UNDP** - *World Bank-WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases* de 1995, estima-se que a renda anual média bruta *per capita* referente aos produtos domésticos seja de 2,966,00 dólares. No entanto, a perda econômica do Continente Americano devido à precoce mortalidade de adultos jovens em idade produtiva chega a 8.156 milhões de dólares, o equivalente a 2.5% da dívida externa de todo o Continente, o que acarreta grave problema econômico-social (WHO, 2002).

Dados epidemiológicos recentes mostram um decréscimo na prevalência de casas infestadas por *Triatoma infestans* e na incidência de infecções humanas em crianças e jovens em países pertencentes ao Programa de Iniciativa de Países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), como mostram a Tabela 1 e a Figura 2.

Tabela 1: Infecção humana por *Trypanosoma cruzi* e redução da incidência no Cone Sul, 1983-1999.

Países	Idade (anos)	Infecções em 1983 (taxas x 100)	Infecções em 1999 (taxas x 100)	Redução da incidência (%)
Argentina	18	4.5	1.2	85.0
Brasil	7-14	18.5	0.17	96.0
Bolívia	1-4	33.9	ND	ND
Chile	0-10	5.4	0.14	99.0
Paraguai	18	9.3	3.9	60.0
Uruguai	6-12	2.5	0.06	99.0

Fonte: WHO, 2005 (adaptação)

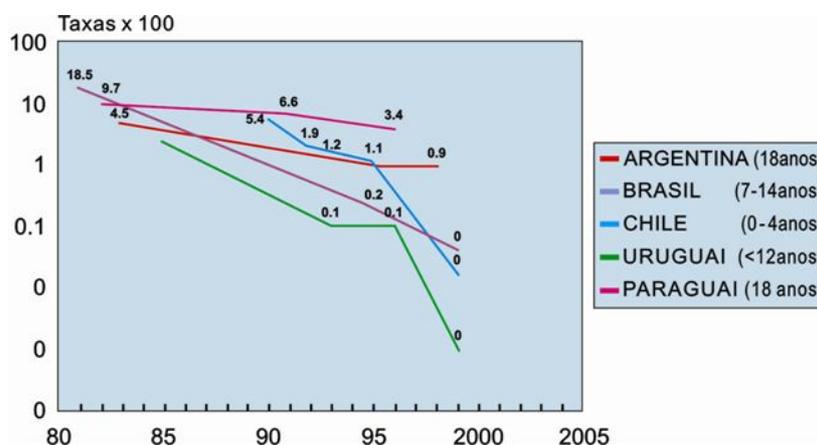


Figura 2: Eliminação da transmissão: Incidência de Infecção 1980-2000.

Fonte: WHO, 2005 (adaptação)

Entre as propostas de prevenção e controle da doença, destacam-se (SDR, 2005):

- Uso de inseticidas nas casas;
- Melhoria das condições das casas, executando reformas em paredes e telhados e substituindo o uso do sapé,
- Análise do sangue recebido nos bancos de sangue, evitando transfusões com sangue contaminado;
- Uso de vacina, apesar de não haver alguma realmente efetiva;
- Iniciativas de educação sanitária;
- Quimioterapia.

3.2. Agente etiológico e Ciclo Evolutivo

A doença de Chagas é uma infecção hematológica e tecidual causada pelo *Trypanosoma cruzi*, parasito intracelular obrigatório, (ORIEHEL et al., 1994) e transmitido principalmente por um inseto hematófago pertencente à subfamília *Triatominae* (SILVEIRA et al., 2003).

O agente etiológico da doença de Chagas é um protozoário hemoflagelado, pertencente ao sub-reino *Protozoa*, filo *Sarmastigophora*, classe *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosoma* e espécie *Trypanosoma cruzi* (LANA et al., 1991; SILVEIRA et al., 2003).

A sua taxonomia não é composta apenas por espécies homogêneas. Nos anos 60, quando as ferramentas moleculares atuais não estavam disponíveis, Coura e cols. (1966) defendiam o uso do termo “cruzi” para designar este protozoário, baseado em variações morfológicas, características imunológicas, virulência distinta e diferenças de padrão individual e regional da doença de Chagas (DEVERA et al., 2003). Hoje, sabe-se que o *T. cruzi* é uma espécie heterogênea, consistindo em série de sub-populações do parasito circulante entre várias espécies de vertebrados domésticos e silvestres e hospedeiros invertebrados.

O *Trypanosoma cruzi* caracteriza-se por possuir flagelo, núcleo e uma mitocôndria diferenciada que abriga em seu interior os cinetoplastídeos, correspondentes ao DNA condensado, de 20 a 30% do total (DEVERA et al., 2003). Possui dois hospedeiros em seu ciclo biológico: os hospedeiros vertebrados mamíferos e os insetos triatomíneos (DEVERA et al., 2003).

Após a invasão da célula hospedeira, o parasito passa por etapas de divisão e diferenciação. Apresenta um ciclo complexo e adota diferentes formas evolutivas, que refletem sua adaptação aos diferentes *habitat* e situações biológicas por que passa ao longo de sua vida, no interior do hospedeiro vertebrado e do inseto vetor. Além da forma do corpo celular, são particularmente importantes as relações de posição entre núcleo e cinetoplasto, assim como a situação de emergência do flagelo. São três os tipos principais de formas evolutivas: tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas, conforme ilustrado nas figuras 3, 4 e 5 respectivamente (DIAS, 2001).

Apresenta-se sob as formas flageladas (epimastigota e tripomastigota) e aflagelada (amastigota) conforme sua localização. No homem e nos demais vertebrados, o tripomastigota tem por *habitat* o meio circulante, e o amastigota, a intimidade dos tecidos. No triatomíneo, além das formas amastigotas e dos tripomastigotas metacíclicos, observa-se uma forma de transição epimastigota. Também no homem e demais vertebrados, pode-se observar a forma epimastigota na evolução da forma amastigota para tripomastigota (RASSI et al., 1991; ORIEHEL et al., 1994; DIAS, 2001).

Os tripomastigotas (figura 3) são estágios infectantes do parasito, fusiformes e alongados e medem cerca de 20–25 x 2 nm, com cinetoplasto situado posteriormente ao núcleo e numa posição terminal ou subterminal no corpo celular, emergindo o flagelo próximo ao cinetoplasto; as formas mais delgadas apresentam movimentos rápidos, geralmente em linha reta, ao passo que as mais largas são dotadas de movimentos mais lentos, deslocando-se muito pouco. Ocorrem na corrente sangüínea do vertebrado e nas porções mais distais do tubo digestivo do vetor, não dispendo de capacidade replicativa. O tripomastigota, quando corado, apresenta-se na forma de um “C” ou de um “S” (RASSI et al., 1991 ORIEHEL et al., 1994; DIAS, 2001). Os tripomastigotas metacíclicos representam as formas infectantes e são assim chamados por não

serem reversíveis para formas de multiplicação no inseto transmissor (RASSI et al., 1991).

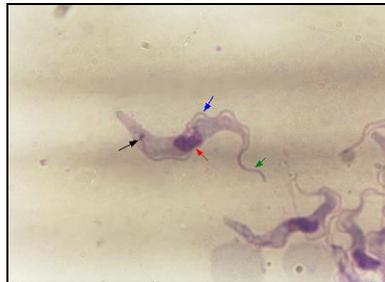


Figura 3: *Trypanosoma cruzi* - forma tripomastigota. Seta preta - cinetoplasto; vermelha - núcleo; azul - membrana ondulante; verde - flagelo.

Fonte: www.ucm.es/info/parasito/aTLAS.htm, 2005.

Os epimastigotas (figura 4) são formas de reprodução do parasito no vetor ou em meio de cultura. São também alongados (20-40 x 2 nm), muito móveis, o flagelo se origina à frente e próximo ao núcleo e emerge na extremidade anterior ao parasito; apresentam o cinetoplasto anterior ao núcleo (DIAS, 2001; RASSI et al., 1991).



Figura 4: *Trypanosoma cruzi* – forma epimastigota – observa-se a presença do cinetoplasto próximo e anterior ao núcleo.

Fonte: www.ucm.es/info/parasito/aTLAS.htm, 2005.

As formas amastigotas (figura 5) são esféricas, arredondadas ou ovaladas, medem cerca de 2-4 nm e são destituídas mobilidade, já que carecem de flagelo livre. Aparecem em grupos, em número variável, os

chamados ninhos parasitários; constituem os estágios de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (DIAS, 2001; RASSI et al., 1991).

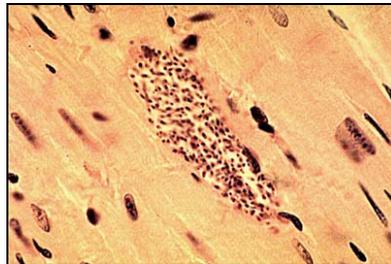


Figura 5: *Trypanosoma cruzi* – forma amastigota. Fibras musculares cardíacas (hematoxilina/eosina) infestadas pelo *T. cruzi*. Os amastigotas multiplicam-se, destroem o tecido e formam pseudocistos.

Fonte: http://www9.who.int/tropical_diseases/databases/imagelib.pl?imageid=0005365, 2005.

O parasito *Trypanosoma cruzi* tem um ciclo biológico complexo, com três formas morfológicas e dois hospedeiros principais, um triatomíneo (transmissor), e um hospedeiro vertebrado, representado esquematicamente na figura 6.

No transmissor: Ao sugar o homem ou outro animal parasitado, o triatomíneo se infecta com as formas tripomastigotas, que sofrem modificações ao longo do tubo digestivo, reconhecendo-se três fases – a de regressão (estomacal), a de multiplicação (intestinal e duodenal) e a de evolução (retal) (DIAS, 2001; RASSI et al., 1991; SZAJNMAN et al., 2005). No estômago, poucas horas após o repasto, iniciam-se as alterações morfológicas dos tripomastigotas ingeridos, que se transformam em epimastigotas ou amastigotas (alguns se mostram inalterados e outros mostram sinais de degeneração). No intestino médio ou duodeno ocorre a multiplicação dos epimastigotas, por divisões binárias sucessivas e através da qual a infecção do inseto se mantém durante toda sua vida. No intestino posterior ou reto, os epimastigotas evoluem para tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes expulsas com as dejeções do inseto no momento em que este faz novo repasto sangüíneo. A duração do ciclo no transmissor é influenciada por diversos fatores, oscilando entre 6 e 15 dias (DIAS, 2001; RASSI et al., 1991).

No hospedeiro vertebrado: Através da pele com solução de continuidade ou das mucosas íntegras, os tripomastigotas penetram no interior das células do local, principalmente nas do tecido conjuntivo e do sistema retículo-endoplasmático; sofrem um processo de regressão, apresentando-se como amastigotas, que se multiplicam por divisões binárias sucessivas, formando pseudocistos; ao fim de 5 dias aproximadamente, as formas amastigotas evoluem para tripomastigotas – passando pela fase epimastigota – e, com a prévia ruptura da célula parasitada, atingem as correntes sanguínea e linfática, podendo ir para outros órgãos e tecidos, novamente sob a forma amastigota. Assim, o ciclo repete-se continuamente (RASSI et al., 1991; DIAS, 2001; SZAJNMAN et al., 2005).

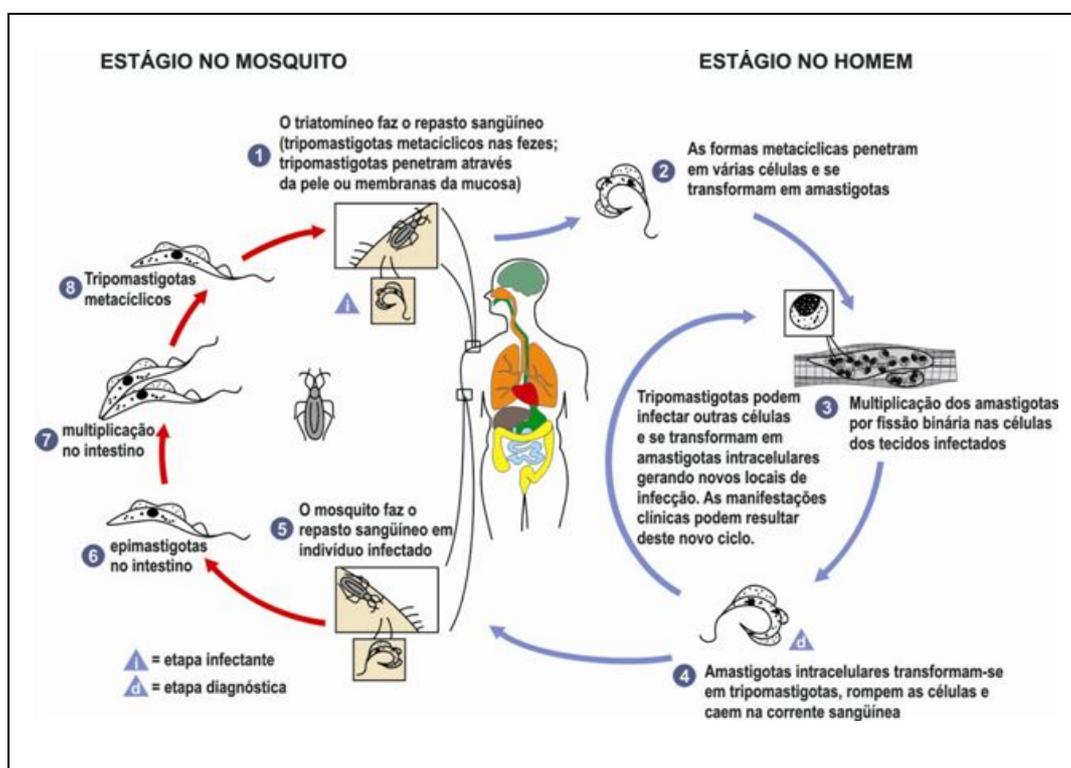


Figura 6: Ciclo evolutivo do parasito *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>, 2005 (adaptação).

Nos humanos, existem dois estágios principais da doença: a **fase aguda**, que aparece de forma lenta após a infecção, pode não ser necessariamente notada, porém e com pouca frequência, ser conduzida a meningoencefalite fatal ou à miocardite aguda, geralmente em adultos, e a **fase**

crônica, que pode ser subdividida em crônica assintomática indeterminada e cardíaca, digestiva, nervosa (ANDRADE, 2000; DIAS, 2001).

Na fase aguda, após contaminação, os tripomastigotas invadem células preferencialmente do sistema macrofágico-mononuclear (ANDRADE, 2000; DIAS, 2001), realizam os primeiros ciclos intracelulares, num período de incubação de 5 a 7 dias, a partir do qual grande quantidade de novos tripomastigotas cai na corrente sangüínea e linfática, disseminando-se pelo organismo (ANDRADE, 2000; DIAS, 2001). No período inicial da infecção, o parasito encontra-se em quase todos os órgãos e tecidos, entretanto, a musculatura (cardíaca, lisa e estriada) constitui o tecido preferencial para sua nidificação (ANDRADE, 2000; DIAS, 2001; RASSI et al., 1991). Os achados mais comuns são os sinais de porta de entrada, edema subcutâneo, aumento de volume dos gânglios linfáticos, hepatomegalia, esplenomegalia, cardiomegalia e derrames cavitários (RASSI et al., 1991).

Após a picada do inseto vetor, normalmente forma-se pequena ferida no local. Se a picada for próxima ao olho, aparece um inchaço caracterizado por sinal de Romaña, como mostra a figura 7 (ANDRADE, 2000; DIAS, 2001; RASSI et al., 1991; SZAJNMAN et al., 2005). O sinal de Romaña e o chagoma (cutâneo) têm o mesmo significado de uma lesão de porta de entrada. O seu aparecimento em 10 a 15 dias após a inoculação e a duração de 30 a 60 dias sugerem uma reação de hipersensibilidade mediada por células (ANDRADE, 2000).



Figura 7: Inchaço caracterizado por sinal de Romaña.

Fonte: http://www9.who.int/tropical_disea.pl?imageid=9305157, 2005.

As lesões da fase crônica afetam irreversivelmente órgãos internos como coração, esôfago, cólon e o sistema nervoso periférico (SILVEIRA, 2003; SZAJNMAN, 2005), e também têm sido relatados em pacientes imunodeprimidos, como pacientes HIV positivo (ORIEHL et al., 1994). Durante a fase crônica, 32% dos infectados apresentam danos fatais nas regiões cardíaca e digestória (SDR, 2005).

A fase crônica assintomática indeterminada aparece depois do período latente, que pode persistir por mais de uma década ou mesmo pela vida toda do indivíduo infectado (ANDRADE, 2000; DIAS, 2001; RASSI et al. 1991; SZAJNMAN et al., 2005). Neste período, os parasitos invadem grande parte dos órgãos do corpo, causando danos cardíacos e gastrintestinais e fraqueza progressiva. Depois de muitos anos em período assintomático, 27% destes infectados desenvolvem sintomas cardíacos que podem levar a morte, 6% desenvolvem danos no sistema digestório e 3% no sistema nervoso periférico. Em poucos dias os sintomas mais comuns aparecem como febre e inchaço dos linfonodos (WHO, 2002).

3.3. Vetores e Reservatórios

São elementos epidemiológicos da máxima importância, principalmente referente à circulação do *Trypanosoma cruzi* em seus ecótopos naturais, mas também diretamente implicados na origem, manutenção e expansão da endemia humana (DIAS, 2000; WHO, 2005).

Os vetores da doença de Chagas são insetos hematófagos, com a probóscida especializada para a sucção sangüínea da ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* (RASSI et al., 1991; SHERLOCK, 2000).

Durante a alimentação sangüínea em mamífero infectado, o triatomíneo ingere os tripanossomas circulantes, que após a multiplicação e metaciclogênese no tubo digestivo do inseto, são eliminados nas suas fezes e podem infectar novos hospedeiros vertebrados (RASSI et al., 1991; SHERLOCK, 2000; DIAS, 2001).

Embora possuam hábitos diversos, todas espécies de triatomíneos são potencialmente vetoras do *T. cruzi*, sendo poucas importantes do ponto de vista epidemiológico (RASSI et al., 1991; SHERLOCK, 2000).

No Brasil, os nomes vulgares dos triatomíneos são: barbeiro, bicho-de-parede, bicudo, borrachudo, cafote, chupança, chupão, fincão, furão, percevejo, percevejo de cama entre outros (SHERLOCK, 2000).

A maioria das espécies de triatomíneos foi descrita com base exclusiva nas características morfológicas, às vezes de um único exemplar, levando-se em consideração cor, forma, dimensões do exoesqueleto e a genitália do macho, importante para distinção de algumas espécies (SHERLOCK, 2000).

O primeiro parâmetro a ser considerado nos levantamentos epidemiológicos para se dar a devida importância a uma espécie de triatomíneo para a doença de Chagas, é a sua distribuição geográfica, pois de antemão, indica com segurança, a existência da endemia chagásica na área, dependendo da espécie que aí se encontra (SHERLOCK, 2000). A figura 8 mostra a distribuição geográfica dos triatomíneos na América Latina e Caribe.

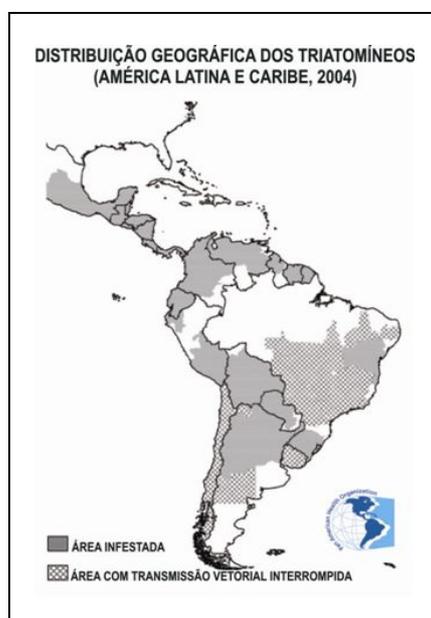


Figura 8: Distribuição geográfica dos triatomíneos – América Latina e Caribe, 2004.

Fonte: Pan American Health Organization - PANAM, 2004 (adaptação).

Entre as espécies de vetores invertebrados mais importantes para a transmissão da doença de Chagas estão: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* (figura 9), *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma rubrofasciata* e *Triatoma sordida*.

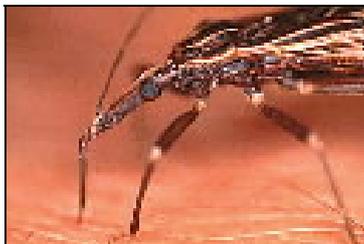


Figura 9: *Rhodnius prolixus* adulto alimentando-se de sangue pela pele humana.

Fonte: http://www9.who.int/tropical_diseases/databases/imagelib.pl?imageid=9905317, 2005.

São considerados reservatórios naturais (silvestres ou domésticos) do *T. cruzi* uma série de mamíferos de pequeno ou médio porte e o próprio homem, cumprindo fundamental papel na manutenção dos ciclos silvestre e doméstico da doença de Chagas. A suscetibilidade exclusiva de mamíferos à infecção pelo *T. cruzi* deve-se a uma longa história de adaptação do parasito e de seus vetores invertebrados, sendo refratários outros vertebrados, como aves, anfíbios, répteis e peixes (DIAS, 2000).

Entre os reservatórios silvestres do *T. cruzi* destacam-se os marsupiais (gambás de diversas espécies, marmotas, cuícas e monodelfídeos), os desdentados (sobretudo os tatus), os roedores – Ordem *Rodentia* (ratos e cobaias silvestres), os animais da Ordem *Chiroptera* (várias espécies de morcegos) e os de outras Ordens (carnívoros – gatos e cachorros-do-mato; primatas – vários tipos de macacos; lagomorfos – coelhos e lebres) entre outros. E dentre os domésticos estão principalmente os cães e gatos, por sua maior proximidade ao homem, seguindo-se de ratos domésticos (ou comensais), coelhos, lebres e roedores em geral (DIAS, 2000).

3.4. Vias de Transmissão

Sabe-se hoje que a doença de Chagas pode ser transmitida aos humanos por diversas maneiras: pela picada do inseto triatomíneo – transmissão vetorial; por transfusão de sangue contaminado – transmissão transfusional; de forma congênita – transmissão congênita e por formas excepcionais - transmissão oral, acidental, por transplantes de órgãos, sexual e através de outros vetores não - triatomíneos (DIAS, 2000).

Do ponto de vista epidemiológico e de importância significativa em Saúde Pública, interessam para a transmissão da doença de Chagas a via vetorial (80 a 90% da transmissão), transfusional (5 a 20%) e a congênita (0,5 a 8%), e as demais são consideradas excepcionais (DIAS, 2000).

Porém no verão de 2005, discutiu-se muito sobre a via de transmissão oral do *Trypanosoma cruzi*, visto os casos de doenças e mortes devido à ingestão de caldo-de-cana contaminado no Estado de Santa Catarina (REVISTA ÉPOCA, 2005)

A transmissão oral ocorre pela ingestão de alimentos contaminados pelo parasito, sendo usual entre mamíferos do ciclo silvestre da tripanossomíase, que ingerem triatomíneos ou outros mamíferos infectados (DIAS, 2000). Essa transmissão é considerada fator de suspeita quando episódios de infecção aguda são observados em áreas próximas a incidência de insetos vetores ou animais silvestres que se aproximem dos abrigos dos humanos. A contaminação de alimento e água por vetores silvestres e os reservatórios vertebrados de *T. cruzi* são provavelmente um fator importante para a transmissão oral da doença de Chagas. Episódios epidêmicos de doença humana que tenha sido atribuída à infecção oral foram registrados em Teutônia, RS; Catolé do Rocha, PB, regiões da Amazônia e, mais recentemente, no Estado de Santa Catarina (CAMANDARROBA et al., 2002; REVISTA ÉPOCA, 2005).

Considerando que a distribuição dos biotopos do *T. cruzi* difere entre si entre ciclos domésticos e silvestres, estudos desses podem ser de grande interesse para a elucidação completa dos fatores de risco na transmissão oral (CAMANDARROBA et al., 2002).

Ainda que a transmissão vetorial da doença de Chagas seja a de maior importância, os outros meios de contaminação são responsáveis por novos casos de infecção, como a por via oral, que ao contrário do que se pensava, é possível, mesmo na presença dos ácidos estomacais (CAMANDAROBA et al., 2002).

Os fatores responsáveis pela alta infectividade dos parasitos ingeridos ainda não estão completamente elucidados. A ocorrência de casos de infecção grave e severa, podendo levar a morte uma porcentagem dos indivíduos infectados, indica a alta patogenicidade dos parasitos e sua capacidade de penetração pela mucosa gástrica, mesmo depois de terem vencido os ácidos gástricos. A influência do tipo de cepa durante a transmissão oral ainda não foi completamente elucidada, mas é provavelmente um fator importante. (CAMANDAROBA et al., 2002).

A atitude preventiva consiste em bom cozimento de alimentos nas áreas endêmicas, particularmente as carnes de mamíferos (DIAS, 2000).

Também é possível a contaminação de lactentes através da sucção de leite materno infectado, em nutrízes chagásicas, fato absolutamente esporádico e raro, com apenas um ou dois casos prováveis registrados. Não apresenta importância epidemiológica e de maneira alguma deve servir de motivo para impedir o aleitamento materno por uma mulher infectada (DIAS, 2000).

3.5. Tratamento

Os primeiros compostos testados para o tratamento da doença de Chagas foram atoxil (arsênico), fucsina, tartarato de antimônio potássico e cloreto de mercúrio, empregados experimentalmente por Mayer e Rocha Lima (1912, 1914), sendo que nenhum deles apresentou resultado positivo (COURA et al., 2002).

Entre os quimioterápicos testados até 1962, salientam-se os derivados de quinolina, muitos antimaláricos, arsenobenzóis, compostos arsenicais, fenantridinas, sais de ouro, bismuto, cobre, iodeto de sódio, violeta genciana (cloreto de hexametil-*p*-rosanilina), aminopterina, ácido *p*-amino salicílico, hidrazidas de ácido nicotínico, anti-histamínicos, sulfonamidas,

cortisona, anfotericina B, muitos antibióticos e alguns nitrofuranos (COURA et al., 2002). Alguns dos fármacos testados para doença de Chagas estão ilustrados na figura 10.

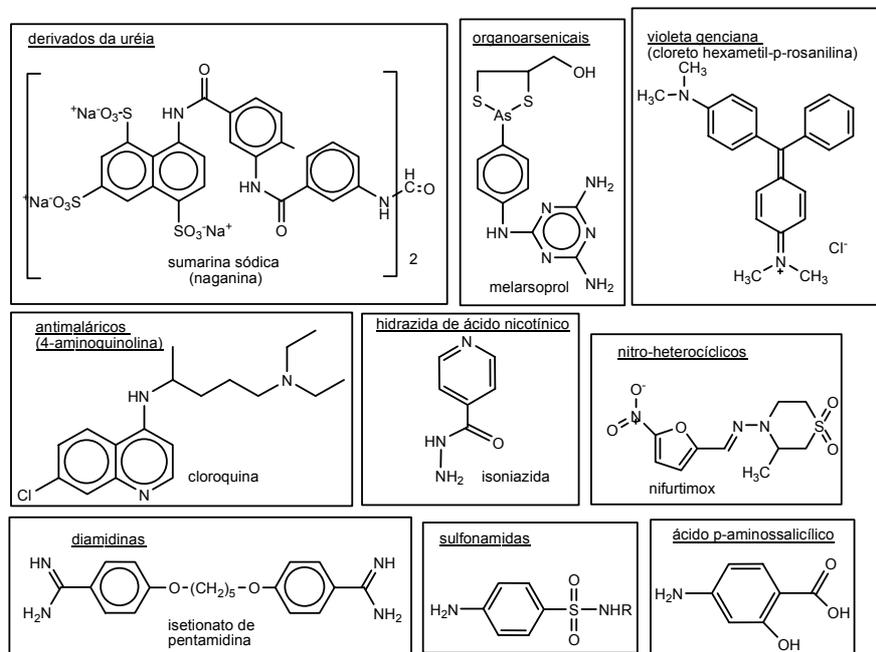


Figura 10: Alguns dos fármacos já utilizados na terapia antichagásica.

Brener (1968) fez uma avaliação meticulosa para os fármacos testados *in vitro* e *in vivo* contra o *Trypanosoma cruzi*, verificando que 27 compostos e mais de 30 antibióticos, testados entre 1912 e 1962, eram ineficazes. Ele ainda considerou que estes compostos tinham efeito na parasitemia, mas não curavam, dentre eles, a bisquinaldina Bayer 7602, aminoquinolinas, arsenicais trivalentes, nitrofuranos e antibióticos (COURA et al., 2002).

Packchanian (1952, 1957) mostrou uma nova e promissora linha de fármacos potentes com os nitrofuranos, liderado pelo nitrofurano (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona). Este derivado administrado a ratos experimentalmente infectados com *T. cruzi*, por via oral, por 53 dias consecutivos, com dose de 100 mg/kg/dia, mostrou-se eficaz, curando 95,4% dos animais (COURA et al., 2002).

Ferreira (1961, 1962) e Ferreira e cols. (1963) trataram os primeiros casos da doença aguda em humanos com nitrofurais e obtiveram bons resultados clínicos com poucos efeitos colaterais, mas os xenodiagnósticos tornaram-se positivos em 5 casos. Coura e cols. (1961, 1962) trataram 14 pacientes na fase crônica da doença com este composto e observaram nos primeiros 4 pacientes que receberam doses progressivas de 10 a 30 mg/kg/dia, importantes efeitos adversos, que levaram à suspensão do tratamento devido a uma grave polineuropatia, que começou na terceira semana da administração do nitrofurais. Com a redução da dose para 10 mg/kg/dia e associação de complexo B, administrado via parenteral, 5 pacientes toleraram o tratamento por 60 dias, apesar de apresentarem anorexia, perda de peso, parestesia e polineuropatia. Outros pacientes foram tratados com 20 mg/kg/dia e apresentaram parestesia somente após 53 dias de tratamento, evoluindo para uma grave polineuropatia, com a suspensão do tratamento. De 6 pacientes submetidos ao tratamento inteiro, dois deles foram considerados curados, com base em xenodiagnose e sorologia persistentemente negativos.

Brener, em seu trabalho pioneiro (1961), demonstrou cura parasitológica em 94,5% dos ratos tratados com nitrofurais. Depois, o próprio Brener e cols. em 1969 demonstraram por microscopia eletrônica que 13,5% dos amastigotas de cepas Y estavam intactos em células coronárias de animais tratados. Uma questão permaneceu: seria uma resistência primária ou o nitrofurais não conseguiu alcançar todas as células infectadas? (COURA et al. 2002).

Desde o final de 1960 e início dos anos 70, dois fármacos têm sido utilizados no tratamento da doença de Chagas: nifurtimox e benznidazol. O nifurtimox um composto nitroheterocíclico, conhecido comercialmente como Lampit[®] (Bayer), e o benznidazol, um derivado nitroimidazol conhecido como Rochagam[®], Radanil[®], (Roche) (ANANDAN, 1997; KOROLKOVAS, 1988, 2000; URBINA, 2003; SZAJNMAN et al., 2005). Seguem as estruturas dos compostos mencionados (figura 11).

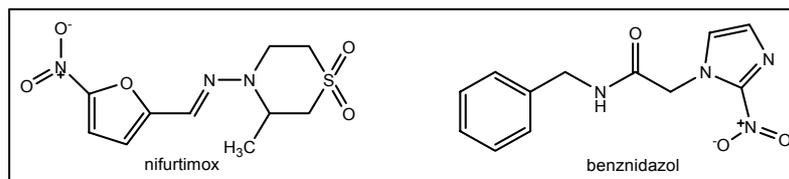


Figura 11: Estruturas moleculares do nifurtimox e benznidazol.

Desde a década de 80 o nifurtimox teve sua comercialização descontinuada, primeiro no Brasil e depois na Argentina, Chile e Uruguai. O modo de ação do nifurtimox envolve a formação de radicais nitro ânion instáveis por nitroredutases, que na presença de oxigênio causam aumento intracelular dos níveis de H_2O_2 , O_2 e radicais livres tóxicos ao parasito. O *T. cruzi* mostrou-se deficiente em mecanismos de destoxificação para metabólitos de oxigênio, principalmente o H_2O_2 e assim, mais sensível ao estresse oxidativo que as células dos vertebrados (URBINA, 2003).

O benznidazol parece agir por um mecanismo diferente (estresse redutivo), que envolve modificações covalentes ou outras interações de intermediários nitroreduzidos com componentes do parasito, ou ligação com o DNA, ou lipídios (COURA et al., 2002; URBINA, 2003).

Ambos, nifurtimox e benznidazol têm atividade significativa na fase aguda, com até 80% de cura parasitológica em pacientes tratados, 50% de cura em infecções recentes, indicadas pelo desaparecimento de sintomas, negativização da parasitemia e sorologia. No entanto, estes fármacos são ativos apenas na fase aguda da doença e no início da fase crônica, tornando o tratamento de pacientes em estágio de doença crônica deficitário (SZAJNMAN, 2003; URBINA, 2003; SDR, 2005).

Estes compostos sofrem ainda com outros inconvenientes, como: (a) sensibilidade seletiva para diferentes cepas de *T. cruzi*, (b) sérios e freqüentes efeitos adversos como vômito, anorexia, neuropatia periférica, dermatopatia alérgica, entre outras; (c) tratamentos muito longos.

A Argentina e o Brasil estabeleceram protocolos para indivíduos doentes em fase aguda ou doentes crônicos recentes, especialmente em áreas onde a transmissão pelo vetor foi controlada. Semelhantemente, alguns países possuem diretrizes e programas para detecção e tratamento da doença de

Chagas. No entanto, a implementação de estratégias de tratamento está seriamente limitada devido ao fato dos fármacos existentes não estarem disponíveis para a maioria dos pacientes em muitos países endêmicos (SDR, 2005).

A Assembléia Mundial de Saúde (*WHA – World Health Assembly*) recomenda esforços na pesquisa de futuras estratégias para controle sustentado no suporte epidemiológico, de relevância direta no controle de espécies de triatomíneos (domiciliados e não domiciliados) (SDR, 2005).

Os principais tópicos de pesquisa ainda incluem (SDR, 2005):

- detecção da incidência de infecção em grupos jovens;
- descoberta e desenvolvimento de novas ferramentas quimioterápicas e de diagnóstico (através de pesquisas nas redes básicas e de parcerias com setor privado);
- novos produtos inseticida, e outras ferramentas relevantes no controle do vetor, devido à suscetibilidade e resistência aumentada;
- amparo de atividades relevantes no controle da transmissão causada por transfusão de sangue, e
- suporte técnico e político na implementação efetiva dos programas de pesquisa, tratamento nos países mais afetados, e no combate e controle da doença congênita.

Associada à grande incidência de parasitoses em nosso país, e ainda ao fato das cepas brasileiras de *Trypanosoma cruzi* serem resistentes ao benznidazol, mesmo sendo este o único fármaco ativo comercializado no Brasil, demonstra-se a grande importância no desenvolvimento de agentes antichagásicos realmente eficazes, principalmente para a fase crônica da doença (WHO, 2002; CHUNG et al., 2003; SDR, 2005; TDR, 2005).

3.6. Alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos

Para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e com menor toxicidade, a descoberta de alvos específicos é fator preponderante. Neste sentido, os estudos comparativos entre a bioquímica de parasitos e microrganismos e a dos hospedeiros constituem ferramenta importante para a introdução de novos quimioterápicos de forma racional. Considerando que a quimioterapia disponível seja insatisfatória pelo seu limite de eficácia ou que os fármacos apresentem efeitos colaterais tóxicos, novos acessos para quimioterapia específica estão sendo alcançados, traçando-se rotas bioquímicas seletivas às atividades dos organismos parasitos (URBINA, 2003).

A tabela 2 apresenta os principais alvos terapêuticos promissores para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos (RODRIGUEZ, 2001, COURA e CASTRO, 2002, URBINA, 2003)

Tabela 2: Identificação de alvos quimioterápicos potenciais em *T. cruzi* (adaptação POLLI, 2002).

ALVOS PROMISSORES
Metabolismo do esterol
Tripanotiona redutase
Cisteína proteinases
Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
DNA topoisomerases
Diidrofolato redutase
Metabolismo pirofosfato (Farnesilpirofosfato redutase)

3.6.1. Tripanotiona redutase

O uso correto do oxigênio é aspecto essencial para sobrevivência de certos organismos. O equilíbrio celular redox é muito delicado e os processos oxidativos vitais devem ser modulados por atividades antioxidantes para evitar que espécies residuais de oxigênio prejudiquem o organismo (AUGUSTYNS et al. 2001).

Estratégia bem conhecida dos organismos aeróbios é apresentarem mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio geradas durante o metabolismo oxidativo, que são o ânion superóxido (O_2^-), o peróxinitrito ($ONOO^-$) e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH) e seus subprodutos. Estes compostos danificam biomoléculas, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A sobrevivência destes organismos muitas vezes depende da eficácia de seus mecanismos oxidativos para defender-se de danos celulares e parasitos invasores. Este sistema de defesa compreende várias enzimas e moléculas antioxidantes com papel vital na destoxificação, como o sistema glutaciona e enzimas relacionadas, a catalase e a superóxido dismutase (AUGUSTYNS et al. 2001).

Os mamíferos utilizam a glutaciona redutase como seu principal sistema de destoxificação (AUGUSTYNS et al., 2001). A glutaciona participa de redução de H_2O_2 através da glutaciona peroxidase, que é oxidada a glutaciona dissulfeto e regenerada por redução NADPH-dependente, catalisada pela flavoenzima glutaciona redutase. A glutaciona é um composto tiólico de baixo peso molecular importante para o organismo por diversas razões, e que envolvem trocas tiol-dissulfeto (nas biossínteses de desoxirribonucleotídeos), na destoxificação de eletrófilos tóxicos (catalisadas pela glutaciona-S-transferase) e em complexação de metais. Por outro lado, a glutaciona e suas enzimas relacionadas não formam o único sistema responsável pela neutralização de espécies de oxigênio. Este sistema é comandado pela superóxido dismutase, que catalisa a dismutação do superóxido a O_2 e H_2O_2 e pela catalase, produzindo água e oxigênio a partir do H_2O_2 (AUGUSTYNS et al. 2001).

Os organismos da ordem *Kinetoplastida* não possuem o sistema da glutaciona redutase e glutaciona peroxidase e, conseqüentemente, em contraste com outros organismos, não dependem deste sistema para seu equilíbrio oxidante/antioxidante. O composto chave para esta diferença é a tripanotiona. Seguem abaixo (figura 12) as estruturas da glutaciona e tripanotiona.

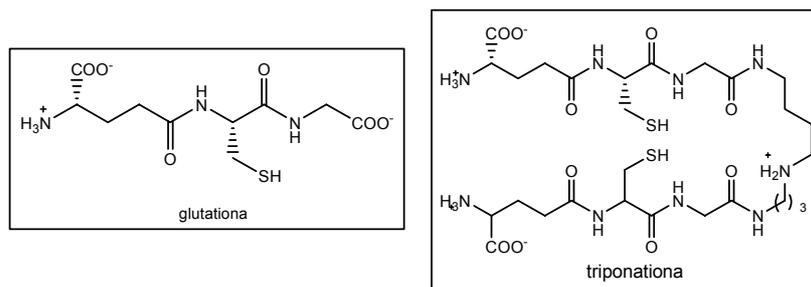


Figura 12: Estruturas moleculares da glutationa e tripanotiona.

O descobrimento da tripanotiona foi divulgado por Fairlamb e Cerami, em 1985. A tripanotiona é derivado *bis*-glutathionil da espermidina ((N^1, N^8 -bisglutathionil) espermidina). Assim como a glutathione, a tripanotiona participa das reações de redução e é oxidada a tripanotiona dissulfeto e se comporta como substituinte para a glutathione nos tripanossomatídeos. Um dos aspectos mais notáveis da tripanotiona é que os tripanossomatídeos dependem inteiramente do grupo tiol para sua defesa oxidante. Como em outros microrganismos, o acúmulo de dissulfetos afeta o equilíbrio tiólico-redox e, conseqüentemente, a atividade metabólica do *Trypanosoma*. Sendo uma flavoproteína dissulfeto redutase NADPH-dependente, a tripanotiona redutase (TR) foi isolada como responsável pela manutenção intracelular da tripanotiona na forma ditiol [T(SH)₂] (figura 13) (AUGUSTYNS et al., 2001).

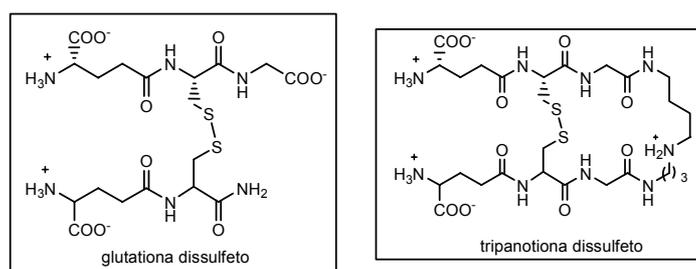


Figura 13: Estruturas moleculares da glutationa e tripanotiona dissulfeto.

Os *Kinetoplastida* também não possuem a enzima catalase. A enzima superóxido dismutase foi encontrada em *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Crithidia fasciculata* não patogênica, não podendo ser considerada como único antioxidante sendo que o organismo não será capaz de neutralizá-lo a H₂O₂ (AUGUSTYNS et al., 2001).

A tripanotiona redutase (TR) é enzima chave do metabolismo antioxidativo do *Trypanosoma cruzi* (HENDERSON, et al, 1988; JOCKERS-SCHÜBL, et al, 1989), e consiste em flavoproteína dependente de NADPH que catalisa a redução de derivados nitrofurânicos de naftoquinonas substituídas, sendo mais ativa nos compostos que apresentam grupos funcionais básicos na cadeia lateral. Os derivados reduzidos resultantes são prontamente reoxidados pelo oxigênio molecular, sofrendo, portanto reação de redox enzimática clássica (JOCKERS-SCHÜBL, et al, 1989). Além disso, esses derivados comportam-se como inibidores enzimáticos, impedindo a redução do substrato fisiológico dissulfeto de tripanotiona redutase. Os nitrofuranos provocam ainda a inativação irreversível da enzima em condições anaeróbicas.

O nitrofuril (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) (figura 14) sintetizado por Dodd e Stilman, em 1944, surgiu com base no conhecimento de que o ácido furóico, bem como seus derivados alquilados e mercuriais apresentavam atividade bacteriostática. Tal derivado mostrou-se ativo contra bactérias Gram-positivas e negativas.

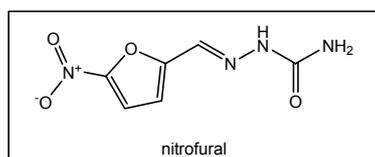


Figura 14: Estrutura molecular do nitrofuril (NF).

Este fármaco foi empregado inicialmente durante a Segunda Guerra Mundial, no tratamento de queimaduras, apresentando um amplo espectro de atividade antibacteriana (KOROLKOVAS, 1988). A essa época, foi observada atividade antimicrobiana de amplo espectro e baixa incidência a sensibilização (CRENSHAW, et al, 1976). Entretanto, o espectro antibacteriano foi modificando-se ao longo dos 20 anos de sua utilização. Sua toxicidade é alta por via oral, em razão da hemólise e neuropatia grave que causa. Em alguns países foi retirado do mercado, em outros pode 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 Henderson e cols, 1988, estudando a tripanotona redutase observaram que os derivados de naftoquinonas e de nitrofuranos, incluindo o nitrofural, apresentavam a capacidade de inibir essa enzima. Gonçalves e cols., em 1993, observaram que o nitrofural potencializa os efeitos tripanomicidas provocadas pela PQ, em cultura de células LLC-MK₂ infectadas com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Trabalhos de Ujikawa e cols.,1995 e CHUNG,1996, 2005 sugeriram que o derivado hidroximetilado de nitrofural (figura 15) apresenta atividade antibacteriana e antichagásica superior à molécula matriz. Sabendo-se que os compostos nitrofurânicos são potenciais agentes mutagênicos devido ao grupo nitro presente na molécula (ALEJANDRE-DURAN, et al, 1988), demonstrou-se que este derivado hidroximetilado apresenta atividade mutagênica 4 vezes menor que o fármaco matriz (GUIDO et al, 2001).

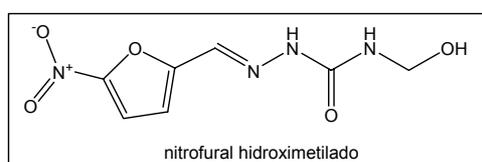


Figura 15: Estrutura molecular do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH).

3.7. Bifosfonatos

3.7.1 Bifosfonatos para tratamento dos ossos

O primeiro composto bifosfonato (BF) - chamado no passado erroneamente de difosfonato, foi sintetizado na Alemanha, em 1865 (FLEISCH, 2002). Estes compostos foram inicialmente utilizados como agentes anticorrosivos e agentes complexantes nas indústrias têxtil, de fertilizantes e de óleos, graças à sua propriedade de inibir a precipitação de carbonato de cálcio (FLEISCH, 2002). Ao final da década de 1960, seu potencial para o tratamento de doenças relacionadas ao metabolismo mineral ósseo começou a ser evidenciado (WIDLER et al., 2002).

Os derivados bifosfonatos (BFs) são análogos inorgânicos sintéticos do pirofosfato, em que o oxigênio da cadeia P-O-P foi substituído por um carbono, resultando em uma estrutura P-C-P (fósforo-carbono-fósforo), característica que confere estabilidade metabólica a estes compostos (figura 16) (WIDLER et al., 2002). Segue na figura 16 as estruturas moleculares do ácido pirofosfórico e do ácido bifosfônico

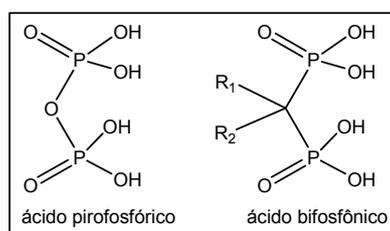


Figura 16: Estrutura química dos ácidos pirofosfórico e bifosfônico.

O pirofosfato é inibidor natural da reabsorção óssea sendo produzido por vários processos anabólicos (MARTIN, T.J. et al., 2001; FERNANDES et al., 2005). É rapidamente hidrolisado para seus dois grupos fosfato constituintes devido ao átomo de oxigênio central da estrutura P-O-P (FERNANDES et al., 2005). Os análogos do pirofosfato são resistentes à hidrólise e à degradação enzimática e são quimicamente estáveis. Os BFs possuem melhor estabilidade metabólica já que não são reconhecidos pelas enzimas pirofosfatases e são também estáveis a hidrólises em meio ácido (SZAJNMAN, 2005). Como o pirofosfato, os bifosfonatos ligam-se aos cristais

de hidroxiapatita do osso e previnem seu crescimento e dissolução (MARTIN, T. J et al., 2001).

Os BFs são efetivos inibidores da reabsorção óssea, apresentam atividade para o tratamento de várias doenças como osteoporose, hipercalcemia causada por tumores, metástases nos ossos e desordem do metabolismo de cálcio (VEPSÄLÄINEN, 2002; WIDLER et al., 2002; URBINA, 2003; CASTRO, 2003).

O alendronato, por exemplo, é um potente derivado aminobifosfonato (figura 17), eficaz no tratamento de doenças que envolvem um metabolismo anormal de cálcio como osteoporose pós-menopausa, doença de Paget, metástases ósseas e hipercalcemia maligna. Este fármaco contém um grupamento amínico em sua cadeia lateral, que garante potência e especificidade. Como um inibidor da reabsorção óssea, o alendronato é de 200 a 1000 vezes mais potente que o etidronato e 100 vezes mais potente que o clodronato ou o tiludronato (SHINKAI, 1996; KIECZYKOWSKI et al. 1995).

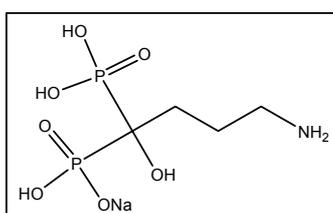


Figura 17: Alendronato de sódio - Sal monossódico triidratado ($C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$).

A observação de que o pirofosfato é um dos compostos fosforilados mais abundantes no *T. cruzi*, junto com o recente descobrimento de várias enzimas pirofosfatases nestes parasitos, sugere-se que estes compostos possam ter papel essencial no metabolismo destes parasitos e suas enzimas possam servir como novo e eficiente alvo terapêutico.

3.7.2. Bifosfonatos na doença de Chagas

Apesar dos bifosfonatos serem largamente conhecidos como inibidores da reabsorção óssea, principalmente pelo seu emprego no tratamento da osteoporose, estes compostos também apresentam atividade

inibidora da proliferação intracelular de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, produzindo uma profunda supressão em grande número de tripomastigotas circulantes e oferecendo uma nova rota em potencial para a quimioterapia da doença de Chagas (DOCAMPO, 2001; URBINA, 1999, 2003).

A atividade seletiva destes compostos ao *T. cruzi* é resultante de seu acúmulo nas organelas acidocalcissômicas do parasito envolvidas no armazenamento de cátions e polifosfatos, inibindo enzimas envolvidas em reações orgânicas e inorgânicas de sistema enzimático específico e não afetando as células do hospedeiro (URBINA, 2003).

Montalvetti e cols, em 2001 relataram que os BFs inibem o crescimento do protozoário *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, por meio da competição com o pirofosfato em sua via metabólica, sem causar toxicidade às células hospedeiras, por ter acúmulo seletivo no parasito. O gene que codifica a farnesilpirofosfato sintase do *T. cruzi* (TcFPPS) foi clonado e seqüenciado, sendo esta enzima inibida por BFs que contêm nitrogênio em sua cadeia, como por exemplo, o alendronato, o pamidronato, o risedronato, o homorisedronato e o zoledronato (figura 18), e menos sensível aos que não contêm nitrogênio na cadeia, como o etidronato, que não chega a afetar o crescimento do parasito (MONTALVETTI et al.,2001, COURA et al.,2002).

Segue na figura 18 estruturas de bifosfonatos que contém nitrogênio em sua cadeia, inibidores de TcFPPS, e do etidronato, sem nitrogênio na sua cadeia, e que não chega a afetar ao menos o crescimento dos parasitos.

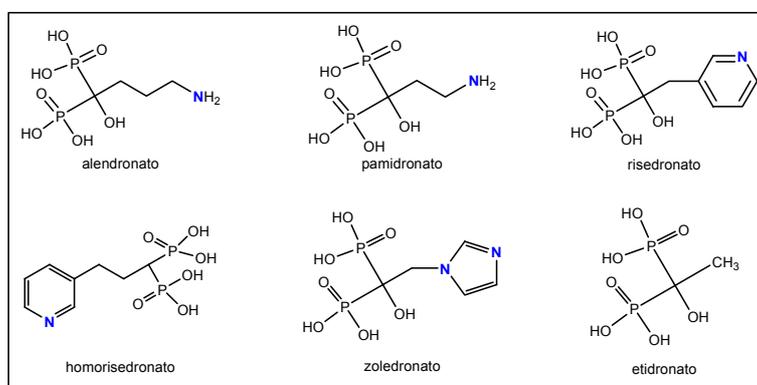


Figura 18: Fármacos BFs inibidores de TcFPPS.

O mecanismo de ação dos compostos BF's contendo nitrogênio foi proposto recentemente. Atuam inibindo a farnesildifosfato sintase (FDPS). Essa inibição da FDPS leva ao decréscimo na formação de lipídios isoprenóides como o farnesilpirofosfato (FPP) e o geranylpirofosfato (GPP) (figura 19). Estes compostos são requisitados para a posterior reação de prenilação translacional (transferência de uma cadeia longa de lipídios isoprenóides) de proteínas, incluindo as proteínas de ligação GTP, a Ras, Rho, Rac e Rad.

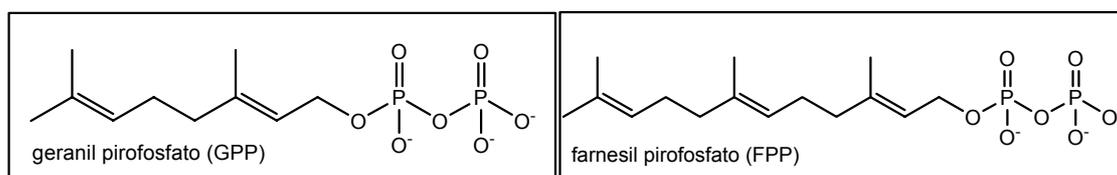


Figura 19: Estruturas moleculares referente a FPP e GPP (FLEISCH, 2002).

Estas proteínas são importantes para muitas funções celulares. A interrupção de sua atividade irá induzir a série de mudanças, que levarão a decréscimo de atividade, provavelmente sendo este seu efeito principal, além da indução à morte da célula por apoptose, em vários tipos celulares, incluindo os osteoclastos. A falta de geranylpirofosfato nos osteoclastos é provavelmente o grande responsável por estes efeitos. De fato, quando vários BF's de várias potências foram investigados, observou-se que seus efeitos na via de mevalonato relacionava-se com a inibição da reabsorção óssea (MONTALVETTI et al. 2001; URBINA, 2003).

Por outro lado os tripanossomatídeos requerem prenilação protéica para sobreviver, processo que é responsável pela incorporação de grupos farnesil e geranylgeranyl ao carbono terminal de resíduos de cisteína de proteínas GTPase, dando origem a proteínas farnesiladas e geranyladas (SZAJANMAN, 2005). Estas reações de transferência são catalisadas por, pelo menos, três diferentes transferases citoplasmáticas. O anexo dos grupos farnesil e geranylgeranyl parecem ser cruciais para a ligação das proteínas às membranas e conseqüentemente para sua ação biológica. (DOCAMPO, 2001; SZAJANMAN et al., 2005). Assim, a atuação dos BF's na formação destas proteínas faz com que ocorra, basicamente, uma inibição na formação de

proteínas de importância vital para o desenvolvimento do parasito (FERNANDES et al., 2005), como mostra em resumo a figura 20

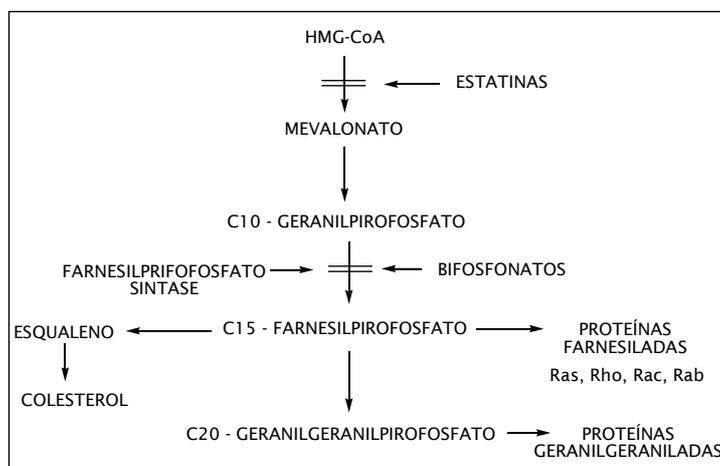


Figura 20: Efeito dos BFs na via do mevalonato, inibindo a farnesilpirofosfato sintase. HMG-CoA – hidroximetilglutaril-coenzima A.

Fonte: adaptação de Fleisch, 2002.

Em resumo, os compostos bifosfonatos que contêm nitrogênio em sua cadeia atuam no *T. cruzi* praticamente da mesma maneira que atuam na reabsorção óssea, inibindo a farnesil pirofosfato sintase (FPPS), resultando em inibição da prenilação das proteínas. No *T. cruzi*, pode haver ainda efeitos adicionais devido à perturbação da biossíntese de esteróis (SZAJNMAN et al., 2005).

Martin e cols. verificaram a ação dos BFs que possuem nitrogênio na cadeia lateral, sobre o crescimento dos parasitos *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*. Observou-se que o pamidronato causa uma queda na parasitemia de ratos infectados com *T. cruzi* e inibe a replicação intracelular *in vitro* de amastigotas (URBINA et al., 1999); o risedronato inibe a proliferação de epimastigotas e a biossíntese de esteróis no nível do pré-esqualeno (MARTIN et al., 2001).

Há um interesse considerável no desenvolvimento de novos quimioterápicos baseado em aspectos únicos da estrutura e metabolismo do parasito. O *T. cruzi* desenvolve-se intracelularmente em seus hospedeiros

vertebrados e sofre durante todo seu ciclo de vida ao estresse oxidativo e a muitas mudanças drásticas nesse microambiente. Sua sobrevivência neste meio complexo exige apropriadas características de defesa como uma fonte de energia, fontes de carbono, e fontes de íons, como o Ca^{2+} (URBINA, 2003).

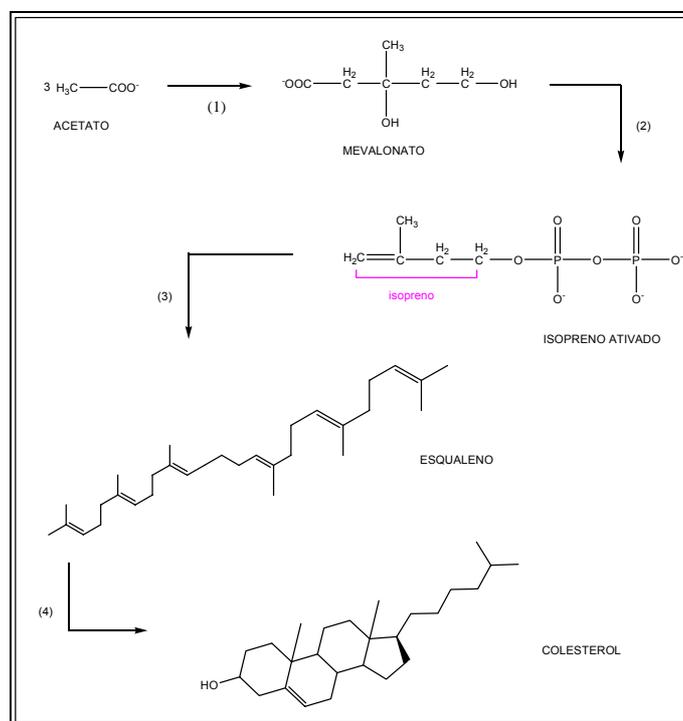
Nos protozoários patogênicos a via responsável pela síntese de diversos esteróis e poliisoprenóis envolve a enzima farnesilpirofosfato sintase, levando à formação do farnesilpirofosfato.

A proteína *T. cruzi* farnesilpirofosfato sintase (TcFPPS) é o alvo molecular atrativo para o desenvolvimento de novos fármacos, já que o crescimento do *T. cruzi* é inibido pelos intermediários reativos análogos destes substratos (MONTALVETTI et al., 2001; SZAJNMAN et al., 2005). Esta proteína possui 362 aminoácidos e uma massa molecular de 41.2 kDa. Estudos revelam que uma expressão heteróloga de TcFPPS em *Escherichia coli* produziu uma enzima funcional que foi inibida por BFs contendo nitrogênio como, alendronato, pamidronato, homoresidronato e risedronato, e menos sensível aos compostos que não contêm nitrogênio, como o etidronato (figura 18) (MONTALVETTI et al., 2001).

A base bioquímica para os efeitos destes compostos contendo nitrogênio é a inibição da enzima da farnesilpirofosfato sintase, que vai agir inibindo a via do mevalonato. A via do mevalonato, por sua vez, catalisa a formação do substrato para a prenilação das proteínas. Estando a via inibida, conseqüentemente, tem-se um decréscimo na formação dos lipídios – como mostra a figura 20 (MONTALVETTI et al. 2001; FLEISCH, 2002; VEPSÄLÄINEN, 2002; URBINA, 2003; SZAJNMAN et al., 2005).

O mevalonato é parte integrante na formação do esqualeno na biossíntese do colesterol. O processo de formação do colesterol ocorre em quatro estágios, como mostra o esquema 1. No estágio (1), três unidades de acetato se condensam para formar um intermediário com 6 carbonos, o mevalonato. O estágio (2) envolve a conversão do mevalonato em unidades de isopreno ativado e o estágio (3) consiste na polimerização das seis unidades com 5 átomos de carbono do isopreno para formar a estrutura linear do esqualeno, com 30 átomos de carbono. Finalmente, no estágio (4), a ciclização do esqualeno forma os 4 anéis do núcleo esteróide e uma posterior série de

mudanças (oxidações, remoção ou migração de grupos metila) que levam ao produto final, o colesterol (NELSON et al., 2002).



Esquema 1: Biossíntese do colesterol (NELSON et al., 2002).

Os efeitos de uma série de BF's derivados de ácidos graxos foram analisados contra o *T. cruzi*, sendo que alguns destes fármacos foram inibidores potentes da proliferação intracelular de amastigotas (SZAJNMAN et al., 2003). A ação seletiva de BF's contendo nitrogênio contra *T. cruzi* em comparação às células de mamíferos pode ser resultado de um acúmulo preferencial destes fármacos nos acidocalcissomas dos parasitos – que são organelas ricas em cálcio, pirofosfato, magnésio, sódio, zinco e polifosfatos (URBINA et al., 1999; DOCAMPO e MORENO, 2001, COURA et al., 2002; GARZONI, et al, 2004; FERNANDES et al., 2005).

Recentes trabalhos mostram e identificam a presença de bolsas de cálcio, os acidocalcissomas, que são organelas únicas nestes parasitos (figura 21, esquema 2), onde são armazenados grande parte de sua fonte de Ca^{2+} , junto com grande quantidade de magnésio, sódio, zinco, fósforo e polifosfatos (polyPs) - apesar de que a natureza química dos compostos de

fósforo nestes vacúolos ainda não esteja completamente elucidada (URBINA et al., 1999; DOCAMPO e MORENO, 2001).

Os acidocalcissomas são caracterizados por sua natureza acídica, alta densidade de elétrons e alta concentração de polifosfatos e outros elementos, visualizados através de microanálises de raios-X. A presença destas organelas em muitos microrganismos, como bactérias, fungos, algas e protozoários e sua aparente ausência em células de mamíferos possibilita alvos promissores para o desenvolvimento de quimioterapia específica e seletiva (DOCAMPO e MORENO, 2001). Os acidocalcissomas podem ser visualizados como vacúolos circulares em tripanosomatídeos vivos ou permeabilizados. Estas organelas possuem diâmetro avaliado em 200 ± 90 nm e seu número varia de célula para célula. Nos epimastigotas de *T. cruzi* são normalmente observados mais de 40 vacúolos com alta densidade eletrônica de diferentes tamanhos. Nos amastigotas, estes vacúolos são ocasionalmente organizados em filas e localizados preferencialmente na periferia da célula, e nos tripomastigotas localizam-se na região anterior, muito próximo ao flagelo (DOCAMPO e MORENO, 2001).

A existência de organização alinhada dos acidocalcissomas em algumas células sugere interação destes com componentes do citoesqueleto celular. Observaram-se estruturas semelhantes em estudos de tripomastigotas procíclicos e de circulação sangüínea de *Trypanosoma brucei*, de promastigostas e amastigotas de *Leishmania* spp., taquizoítas de *Toxoplasma gondii* e merozoítas de *Plasmodium falciparum*. Em estudos de fracionamento celular, usando-se marcadores adequados, confirmou-se que estas organelas são diferentes de lisossomas e vacúolos endocíticos, não pertencendo, portanto ao sistema endocítico celular (DOCAMPO e MORENO, 2001).

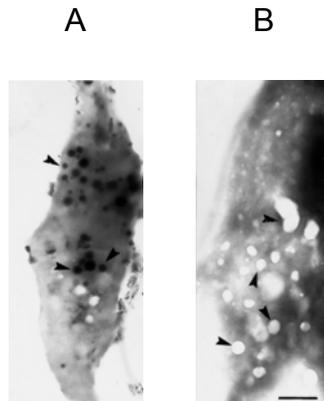
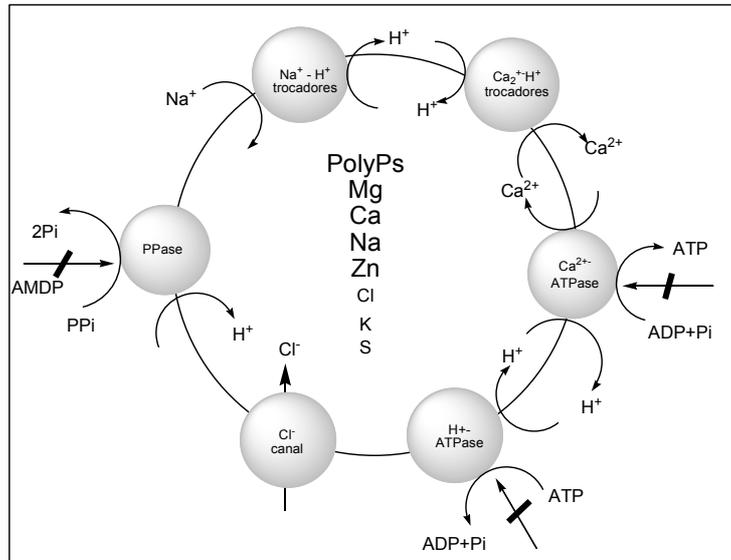


Figura 21: Ultraestrutura de epimastigotas puros.

As setas mostram os acidocalcissomas (A) ou os vacúolos vazios que são deixados após o tratamento com pirofosfatase, em (B), *bar*, 1 μm .

Fonte: URBINA et al., 1999.

Os acidocalcissomas de *T. cruzi*, representado no esquema 2, mostram conter grandes quantidades (provavelmente em valores de mM) de fósforo, magnésio, cálcio, sódio e zinco (a alta concentração destes compostos parece ter o mecanismo de balancear as cargas negativas dos polyPs - polifosfatos), e pouco de cloreto, potássio e enxofre. A baixa concentração de enxofre sugere o baixo conteúdo de proteínas (pelo menos aquelas contendo metionina e cisteína) (DOCAMPO e MORENO, 2001). Outros estudos revelaram que a FPPS requer certa concentração de magnésio (Mg^{2+}) para sua atividade ótima. De fato, a estrutura cristalografada desta proteína indica que dois ou três íons Mg^{2+} podem estar presentes no sítio de ação (SZAJNMAN et al., 2005).



Esquema 2: Esquema representativo de um acidocalcissoma.

A captação de Ca^{2+} ocorre em troca com o H^+ por uma reação catalisada por ATPase-Ca^{2+} vacuolar que pode ser inibido. O gradiente H^+ é estabelecido por ATPase-H^+ vacuolar e um aminometilendifosfonato (AMDP)-sensível e PPase-H^+ vacuolar. O transporte de Cl^- , pelo canal de cloreto, está associado com a função vacuolar ATPase-H^+ . A liberação de Ca^{2+} ocorre em troca com o H^+ e é favorecida pela troca com o próton- Na^+ . O acidocalcissoma é rico em pirofosfato e outras cadeias curtas de polifosfatos (polyPs), magnésio (Mg), cálcio (Ca), sódio (Na) e zinco (Zn). [A composição interna dos acidocalcissomas pode variar]

Fonte: DOCAMPO e MORENO, 2001.

O fósforo presente nestas organelas do *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*, está na forma de cadeias curtas e condensadas de polyPs: di-, tri-, tetra- e pentapolifosfatos como agregados microcristalinos (DOCAMPO e MORENO, 2001). O estoque de fosfato como polyPs reduz os efeitos osmóticos nas células. Baseado na concentração total de polyPs em diferentes estágios do *T. cruzi*, o volume relativo dos acidocalcissomas neste parasito é de 0,86, 2,3 e 0,26% do volume celular total nos epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas respectivamente. Assumindo que os polyPs presentes nestes organismos estão essencialmente concentrados nos acidocalcissomas, a concentração destes compostos calculada nestas organelas está entre 3-8 M. Esta hipótese é consistente com sua alta densidade eletrônica *in situ*. Outros componentes da organela, como carboidratos e lipídios podem estar envolvidos em manter a configuração física (DOCAMPO e MORENO, 2001).

Os polyPs presentes, como os PPI, podem ser usados no lugar do ATP, como doadores de energia em várias reações dos tripanosomatídeos, como nas de piruvato glicossômico, fosfato diquinase e na translocação vacuolar de pirofosfatase, que parece direcionar a captação de prótons no compartimento acidocalcissômico pela quebra de pirofosfato citosólico.

Baseado nas rápidas respostas do metabolismo do ATP sugeriu-se que mesmo altos níveis de polyPs poderiam suprir a energia por apenas um ou dois segundos posto que um papel regulatório para os polyPs deve ser considerado (DOCAMPO e MORENO, 2001). Os resultados destes estudos revelam que nos parasitos em estado de replicação o pirofosfato é mais abundante que o ATP e grande parte deste está localizado nos acidocalcissomas, num total de 23% (URBINA et al., 1999; 2004; SEUFFERHELD et al., 2003; DOCAMPO, 2001). Os resultados foram confirmados com análises que mostraram que nas formas epimastigotas as concentrações de pirofosfato inorgânico e ATP foram de $194,7 \pm 25,9$ e $37,6 \pm 5,5$ nmol/mg de proteína, respectivamente, e nas formas amastigotas as concentrações foram de $358,0 \pm 17,0$ e $36,0 \pm 1,9$ nmol/mg de proteína. PolyPs são essenciais, mesmo em baixos níveis, para a adaptação a vários tipos de estresse e para a sobrevivência do microrganismo. Isto é extremamente importante para os parasitos que vivem em ambientes com diferentes condições osmóticas, como em diferentes localizações, como nos insetos vetores, na circulação sangüínea ou no citosol de células de hospedeiros (DOCAMPO e MORENO, 2001).

O alendronato (figura 17) é tão efetivo quanto o pamidronato na inibição da proliferação intracelular do *T. cruzi*, com $IC_{50} = 65 \mu\text{m}$, já o residronato, menos efetivo, com $IC_{50} = \sim 300 \mu\text{m}$. Quando testados no vacúolo acidocalcissômico, a atividade da pirofosfatase na concentração inibitória foi maior, $IC_{50} = 256$ e $90 \mu\text{m}$ para o alendronato e pamidronato, respectivamente, enquanto que $500 \mu\text{m}$ de residronato inibiram apenas 25% da atividade da pirofosfatase (URBINA et al., 1999).

3.7.3. REA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A atividade biológica dos BFs pode ser modificada alterando-se a estrutura das duas cadeias laterais ao átomo de carbono. A ligação e a afinidade pelos cristais ósseos, por exemplo, é dependente da estrutura P-C-P e determinada pela presença de um grupo hidroxil (-OH) em R₁ (figura 22). A estrutura e a configuração tridimensional de R₂ determina os efeitos celulares dos BFs, potência e afinidade farmacológica e sua relativa eficácia como inibidores de reabsorção óssea (MARTIN,T.J, 2001; FERNANDES et al., 2005).

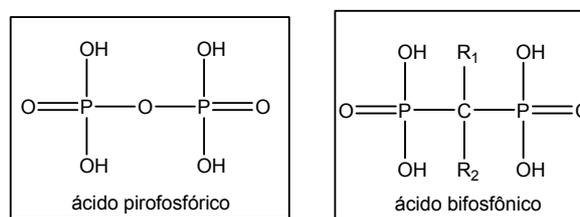


Figura 22: Estruturas gerais do ácido pirofosfórico e ácido bifosfônico.

A substituição do átomo de oxigênio entre as duas porções de ácido fosfônico do pirofosfato por um átomo de carbono possibilitou grande número de variações, principalmente a inclusão de cadeias laterais a estas estruturas. Pequenas mudanças na estrutura dos BFs podem trazer extensas alterações em suas características físico-químicas, biológicas, terapêuticas e toxicológicas (FLEISCH, 2002). Assim, diferentes substituintes ligados ao átomo de carbono central dão características únicas para cada fármaco. Derivados com um grupo amino (-NH₂) ao final da cadeia lateral são extremamente ativos. Além disso, o comprimento da cadeia lateral é também muito importante, sendo a maior atividade encontrada em compostos com quatro carbonos, como o alendronato (figura 17). Recentemente, foi demonstrado que o grupo amino não tem que estar localizado necessariamente ao final da cadeia. No entanto, ainda não está bem clara a relação existente entre estrutura química e atividade biológica, mas sabe-se que a estrutura P-C-P é fundamental para a atividade e que a intensidade do efeito é dependente da cadeia lateral (FERNANDES et al., 2005).

Os BFs de maior importância farmacológica são aqueles que contêm nitrogênio em sua cadeia e o padrão de inibição observado com os diferentes bifosfonatos está de acordo com a proposta feita de que os compostos mais potentes são aqueles que contêm átomo de N no C-3 da cadeia e podem atuar como íon aziridínio [ou aza-carbocátion], um intermediário reativo do substrato alílico dimetilalil pirofosfato/geranil pirofosfato [DMAPP/GPP], análogo de difosfatos isoprenóides para a biossíntese de isoprenóides (SZAJNMAN et al.,2005).

Os compostos de primeira geração, como o etidronato, possuem cadeia alquílica lateral, os de segunda geração, como o alendronato, possuem grupamento amínico terminal, e os de terceira geração, como o zoledronato, uma cadeia cíclica lateral (VEPSÄLÄINEN, 2002; WIDLER, 2002), como mostra a figura 23.

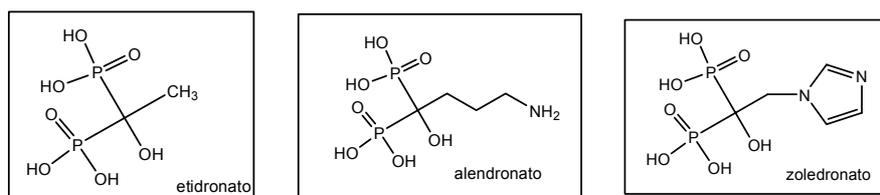


Figura 23: Estruturas referentes aos BFs de 1^a, 2^a e 3^a gerações – etidronato, alendronato e zoledronato – respectivamente.

Os BFs são sintetizados por várias rotas sintéticas (KIECZKOWSKI et al.,1995; ALENDRONATE, 1996, WIDLER, 2002; GUITTENS et al.,2005) que levam à produção de compostos com diferentes estruturas químicas e rendimentos (FERNANDES et al.,2005) e que podem ser analisados qualitativa e quantitativamente por um conjunto de técnicas analíticas eficientes. As mais comuns são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC), utilizando diferentes detectores, tais como espectrômetro de massas (MS), índice de refração, espectrofotômetro de ultravioleta (UV) e eletroquímicos (FERNANDES et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005).

A grande maioria das propostas para determinação quantitativa dos BFs envolve a CLAE, utilizando principalmente a cromatografia líquida de

troca iônica (CLAE-TI) e a cromatografia líquida em fase reversa (CLAE-FR) (RIBEIRO et al. 2005). Os métodos propostos para determinação de BFs em CLAE-FR, empregam na sua maioria, a detecção por ultravioleta ou fluorescência. Porém a maioria dos BFs não apresenta propriedades cromóforas. Sendo assim, os compostos precisam ser submetidos previamente a uma reação de derivatização que tem como objetivo conferir a capacidade de absorver radiação ultravioleta ou de emitir fluorescência (RIBEIRO et al., 2005).

Os BFs têm propriedades de absorção, distribuição e eliminação semelhantes, mas propriedades de reabsorção diferentes. A biodisponibilidade (fração de uma dose que alcança a circulação sistêmica) oral de todos os BFs é baixa, devido à alta ionização destes compostos em pH fisiológico, que os faz muito polares, pouco lipofílicos, dificultando o transporte através da barreira epitelial, sendo fracamente absorvidos pelo trato gastrointestinal (TGI) (FERNANDES et al., 2005). Apresentam baixa absorção intestinal em humanos, com biodisponibilidade de 0,7% para o alendronato, 0,3% para a pamidronato, 3-7% para etidronato e 1-2% para clodronato (FERNANDES et al., 2005). Além do mais, são moléculas relativamente grandes, negativamente carregadas no pH intestinal e complexam facilmente com cátions divalentes como o Ca^{2+} , prejudicando ainda mais sua absorção. A presença de alimentos causa acentuada diminuição na absorção dos BFs, devendo estes ser administrados pelo menos 30 minutos antes da primeira alimentação diária (DIEZ-PEREZ, 2002, FERNANDES et al., 2005).

Os BFs possuem de 4 e 6 valores de pKa, dependentes da estrutura da cadeia lateral; o clodronato e o alendronato possuem valores de pKa entre 1,7, 2,1, 5,7, 8,3 e 0,8, 2,2, 6,3, 10,9, 12,2, respectivamente. Ainda, os BFs têm demonstrado que são ativos quando pelo menos três grupos ionizáveis estão presentes na molécula (VEPSÄLÄINEN, 2002).

De acordo com revisões, muitas tentativas têm sido feitas para o aumento da biodisponibilidade dos BFs, mas algumas com resultados limitados. Tipicamente, o problema básico está relacionado a altas doses necessárias e os efeitos colaterais subsequentes. Sabe-se, que a biodisponibilidade oral dos compostos é dependente do seu coeficiente de partição ($\log P$), e há eficiente transporte transcelular passivo quando o $\log P$ está entre 2 e 3. O preciso valor de $\log P$ para qualquer BF é difícil de ser

medido, devido a sua baixíssima lipofilicidade e, ainda, valores elevados de log P podem caracterizar o mascaramento de um ou mais grupamentos ionizáveis com grupos funcionais biorreversíveis (VEPSÄLÄINEN, 2002).

Assim, uma compreensível solução para melhorar os problemas relacionados aos baixos valores de log P é a sua conversão nos respectivos pró-fármacos. Mesmo que teoricamente existam várias possibilidades de pontos de ligação que possam ser usados para o aumento da lipofilicidade dos BFs, e assim, aumentar sua biodisponibilidade, algumas dificuldades são encontradas, como:

- apenas alguns BFs possuem grupos disponíveis na cadeia lateral (como grupos NH₂ e/ou OH);
- a modificação seletiva dos grupos ligados aos átomos de fósforo é sinteticamente difícil;
- a identificação dos produtos sintéticos sem métodos espectroscópicos eficazes é prejudicada;
- para as análises em HPLC, um detector especial é necessário para detectar os BFs que são desprovidos de grupos cromóforos.

Pela literatura consultada detectam-se três tipos principais de pró-fármacos derivados de BFs, quais sejam (VEPSÄLÄINEN, 2002):

- porções que são ligadas ao carbono central da cadeia; ou
- aos átomos de fósforo via ligações éster ou amida e;
- próprios BFs como ligantes para outros fármacos.

Considerando que estes derivados bifosfonatos são fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* – FDA para tratamentos prolongados em distúrbios dos ossos, pode-se antecipar que esses apresentem baixa toxicidade quando introduzidos como novos compostos (COURA e CASTRO, 2002; MONTALVETTI, 2001; SZAJNMAN, 2003).

Estes derivados podem ter uso potencial no tratamento de infecções parasitárias, visto que milhões de pessoas já foram tratadas com bifosfonatos; por outro lado e desde que seja provada sua atividade antichagásica, os BFs inibidores de FPPS constituem classe de compostos para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos mais seletivos (MONTALVETTI et al., 2001; DOCAMPO, 2001).

3.8. Planejamento de fármacos

O processo de descoberta de novos fármacos, atribuição da Química Medicinal, caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentarem os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade ao seu emprego terapêutico, seguro e confortável (BARREIRO, 2002).

Química Medicinal é a ciência que vincula o descobrimento ou planejamento de novos compostos químicos terapêuticos e o desenvolvimento a medicamento úteis. Isso pode envolver a síntese de novos compostos, investigações das relações que podem existir entre a estrutura de compostos naturais e/ou sintéticos e sua atividade biológica, elucidações e suas interações com os vários tipos de receptores, incluindo enzimas e DNA, determinação de sua absorção, transporte, e propriedade de distribuição, e estudos das transformações metabólicas destes compostos químicos em outros (SILVERMAN, 1992).

A Química Medicinal tem sido praticada a milhares de anos. O homem tem procurado pela cura de doenças mascando ervas, frutos, raízes e cascas de árvores. Algumas destas tentativas clínicas foram bem sucedidas, no entanto, não anteriormente a 100-150 anos, quando o conhecimento sobre constituintes ativos destas fontes naturais foi conhecido. Os primeiros registros escritos das culturas Chinesa, Indiana, Sul Americana e Mediterrânea descrevem os efeitos terapêuticos de várias misturas de plantas (SILVERMAN, 1992).

Dois dos mais antigos medicamentos foram descritos há 5100 anos atrás pelo Imperador Chinês Shen Nung em seu livro de ervas chamado

Pentsao. Um deles é o Ch'ang Shan, a raiz *Dichoroa febrifuga*, que foi prescrita para febre. Esta planta contém alcalóides que são utilizados para o tratamento da malária nos dias de hoje (SILVERMAN, 1992).

Se a abordagem ao descobrimento de fármacos tivesse continuado como nos tempos antigos, poucas doenças poderiam ser tratadas nos dias de hoje. Produtos naturais constituem uma pequena porcentagem dos fármacos no mercado atual. Tipicamente, quando um produto natural é encontrado por ser ativo, este é quimicamente modificado para melhorar suas propriedades. Como resultado dos avanços feitos nos métodos de síntese e separação de compostos e nas técnicas bioquímicas desde década de 40, o planejamento racional fármacos tem sido possíveis (SILVERMAN, 1992).

3.8.1. Modificação Molecular

No que se refere à introdução de novos fármacos na terapêutica os processos de modificação molecular (BUNDGAARD, 1985, 1991 KOROLKOVAS, 1988; WOLF, 1995; FRIIS e BUNDGAARD, 1996; WERMUTH, 1996) são considerados promissores e merecem destaque.

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

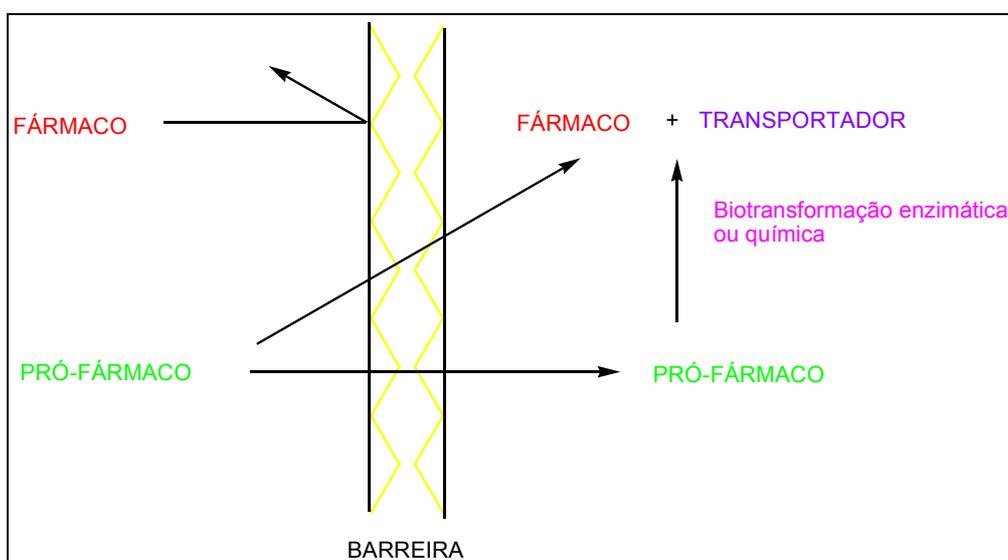
3.8.2. Latenciação

Entre os processos de modificação molecular destaca-se a latenciação (BUNDGAARD, 1985; CHUNG e FERREIRA, 1999).

A latenciação tem sido bastante utilizada nos últimos anos, tornado-se uma das principais ferramentas na área de planejamento de

quimioterápicos específicos (CHUNG e FERREIRA, 1999, CHUNG et al., 2005).

O termo latenciação de fármacos foi proposto em 1959, por Harper, e consiste, basicamente, na 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, conforme esquema 3 abaixo (WERMUTH, 1996). Uma das formas latentes obtidas nesse processo é denominado pró-fármaco.



Esquema 3: Representação esquemática do conceito de pró-fármacos (adaptação - BUNDGAARD, 1991).

Entretanto, somente em meados da década de 70, quando pesquisadores começaram a traçar os destinos dos fármacos no organismo, compreendendo melhor a absorção, metabolismo, distribuição e excreção, o planejamento de fármacos utilizando o processo de latenciação tomou rumo mais definido (CHUNG e FERREIRA, 1999; CHUNG et al., 2005).

Muitas razões relacionadas ao fármaco matriz justificam a necessidade de modificação molecular por meio da latenciação. Mesmo havendo mais de 7000 fármacos disponíveis para o tratamento da maioria das doenças, muitas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas destes fármacos podem se tornar barreiras

para seu uso na clínica, considerando também características organolépticas indesejáveis (SILVA et al., 2005).

Com o objetivo de aperfeiçoar muitas propriedades físico-químicas de um fármaco, que é refletida em suas características farmacocinéticas, o processo de latenciação, atualmente conhecido como planejamento de pró-fármaco, é uma boa alternativa. O interesse nesse planejamento de pró-fármacos como alternativa para a melhora na efetividade do fármaco tem aumentado. Por exemplo, entre os fármacos considerados *blockbusters* no mercado farmacêutico, cinco deles – lovastatina, sinvastatina, omeprazol, aciclovir e enalapril – são pró-fármacos, conforme figura 24 (ETTMAYER, 2004; CHUNG et al., 2005; SILVA et al. 2005).

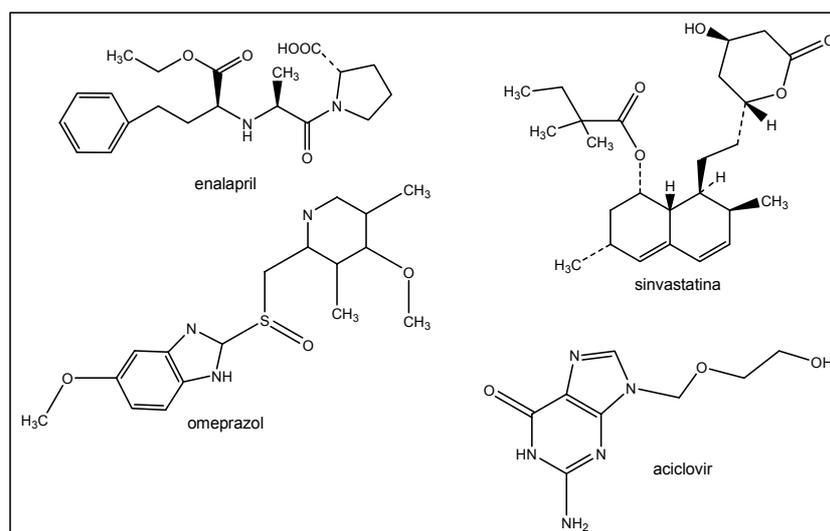


Figura 24: Alguns pró-fármacos *blockbuster* (ETTMAYER et al., 2004).

3.8.3. Planejamento e aplicação de pró-fármacos

Durante os últimos 25 anos tem se tornado óbvio que processos comuns para o transporte de agentes terapêuticos para seus sítios de ação dentro do corpo são geralmente ineficientes e incertos. A otimização do transporte de fármacos e, conseqüentemente a melhora na sua eficácia insinua um transporte eficiente e seletivo da substância para o sítio de ação. O reconhecimento da importância do transporte de fármacos para melhores índices terapêuticos tem sido seguido pelo aumento das atividades de pesquisa nesta área, e mais atenção tem sido focada nas abordagens que visam o

aumento da eficácia e a redução da toxicidade e dos efeitos adversos não desejáveis controlando sua absorção, níveis sanguíneos, metabolismo, distribuição e captura celular (FRIIS e BUNDGAARD, 1996). O planejamento de pró-fármacos inclui uma área de pesquisa de fármacos, interessada na otimização do transporte de fármacos.

Adrien Albert em 1958, definiu pró-fármaco como qualquer composto que necessite biotransformação prévia para exibir seus efeitos farmacológicos (FRIIS e BUNDGAARD, 1996; WERMUTH, 1996; CHUNG e FERREIRA, 1999; ETTMAYEER et al., 2004; SILVA et al., 2005). Este processo compreende a transformação do fármaco em forma de transporte inativo que *in vivo*, mediante reações químicas ou enzimáticas, libere a porção ativa no local de ação ou o mais próximo dele, conforme mostrado no esquema 3.

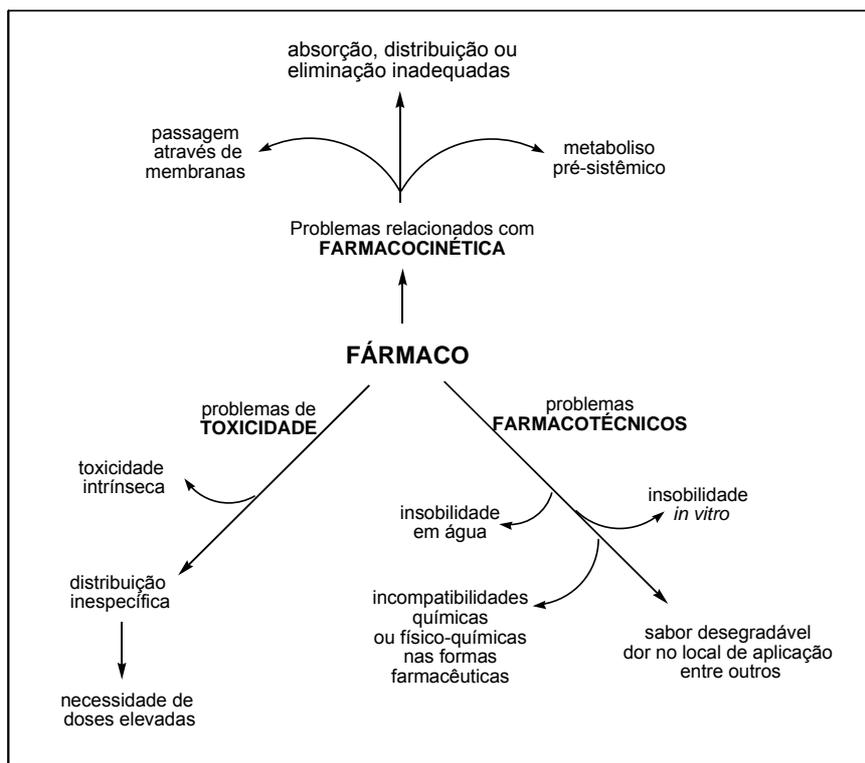
Uma definição expandida considera pró-fármaco como fármaco ativo, quimicamente transformado em derivado inativo, que é convertido por ataque químico ou enzimático, ou de ambos, ao fármaco matriz no organismo, antes ou após alcançar seu local de ação (CHUNG et al., 2005). A formação do pró-fármaco precisa ser considerada como transição química para alterar ou eliminar propriedades indesejáveis da molécula matriz do fármaco (FRIIS e BUNDGAARD, 1996).

Pró-fármacos são planejados para superarem problemas farmacêuticos e farmacocinéticos associados com a molécula matriz, que caso contrário, poderia ter seu uso clínico limitado. Um grande número de barreiras pode limitar o uso clínico de um fármaco. Na fase farmacêutica, por exemplo, tem-se a incorporação de um grupo químico em potencial à um sistema de transporte de fármacos ou forma farmacêutica; barreiras podem ser representadas por problemas de formulação devido a propriedades físico-químicas do fármaco, como baixa solubilidade em água, baixa estabilidade química, sabor e odor desagradáveis, entre outras (FRIIS e BUNDGAARD, 1996). É na fase farmacêutica que se observam os principais problemas farmacotécnicos, tais como falta de solubilidade adequada, comprometendo a dissolução, passo determinante na ação do fármaco e estreitamente ligado à biodisponibilidade.

Na fase farmacocinética, a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco, maiores barreiras que podem limitar o uso do fármaco são (FRIIS e BUNDGAARD, 1996):

- Absorção incompleta do fármaco através das membranas biológicas, como mucosa gastrintestinal ou barreira hemato-encefálica;
- Biodisponibilidade sistêmica incompleta de um fármaco devido ao metabolismo pré-sistêmico (metabolismo de primeira passagem);
- Absorção ou excreção muito rápida do fármaco quando uma ação prolongada é desejada;
- Problemas de toxicidade relacionados a irritação local ou distribuição a tecidos que não aqueles órgãos alvo desejados;
- Baixa especificidade do fármaco.

Outros problemas identificados consistem em elevada toxicidade, baixa estabilidade química, odor e paladar inconvenientes, dor no local de administração, formulação farmacêutica de difícil preparo (CHUNG e FERREIRA, 1999; CHUNG et al., 2005). Alguns destes problemas que limitam a utilização do fármaco estão representados no esquema 4 abaixo.



Esquema 4: Alguns problemas que limitam a utilização do fármaco.

Fonte: CRUZ, 1995.

Para permitir aprimoramento das propriedades do fármaco matriz, os pró-fármacos devem possuir características importantes, tais como (FRIIS e BUNDGAARD, 1996; CHUNG e FERREIRA, 1999; ETTMAYEER et al., 2004):

- inatividade ou menor atividade do que o fármaco matriz;
- obtenção por síntese menos complexa que a do fármaco matriz, sempre que possível;
- ligação entre o fármaco matriz e o transportador cindida, *in vivo*, por via química ou enzimática;
- falta de toxicidade do transportador;
- cinética adequada de biotransformação direta tanto quanto de inativação, assegurando níveis eficazes do fármaco no local de ação.

Durante o planejamento de um pró-fármaco alguns critérios devem ser considerados (BUNDGAARD, 1991; CHUNG e FERREIRA, 1999):

- existência de grupos funcionais na molécula-matriz capazes de sofrer derivatização;
- existência de mecanismos e/ou sistemas no organismo capazes de bioativar o pró-fármaco;
- facilidade e simplicidade da síntese e purificação do pró-fármaco;
- estabilidade química do pró-fármaco;
- regeneração, *in vivo* da molécula matriz, em quantidades ideais;
- toxicidade do transportador e do pró-fármaco *per se*.

Um requisito básico para que a abordagem dos pró-fármacos seja útil na solução de problemas de transporte de fármacos, é a pronta disponibilidade de derivados químicos que satisfaçam as exigências dos pró-fármacos, sendo a mais proeminente, a conversão do pró-fármaco à molécula matriz *in vivo*. A conversão do pró-fármaco pode acontecer antes da absorção (por exemplo, no trato gastrintestinal), durante ou depois da absorção ou em sítios de ação específicos dos fármacos no organismo, todos dependentes do objetivo para que cada pró-fármaco é planejado. O ideal é que o pró-fármaco seja convertido ao fármaco assim que sua meta seja alcançada. Por exemplo, pró-fármacos desenvolvidos para superar problemas de solubilidade em formulações para injeções intravenosas devem preferencialmente ser convertidos imediatamente ao fármaco matriz logo após a injeção, para que a concentração de pró-fármaco circulante possa rapidamente se tornar insignificante a do fármaco ativo. De forma recíproca, se o objetivo do pró-fármaco é produzir uma duração de ação sustentada, a taxa de conversão não deve ser tão alta (FRIIS e BUNDGAARD, 1996).

A conversão necessária ou ativação de pró-fármaco à molécula matriz no organismo pode acontecer por várias reações. Os pró-fármacos mais comuns são aqueles que requerem uma hidrólise mediada por catálise enzimática. Espécies de fármacos ativos que contêm grupos hidroxila (-OH) ou

carboxila (-COOH) podem freqüentemente ser convertidos a ésteres de pró-fármacos, dos quais a forma ativa é regenerada por esterases, como no sangue e fígado. Em outros casos, substâncias ativas são regeneradas de seus pró-fármacos por redução bioquímica ou processos oxidativos. Além do uso de vários sistemas enzimáticos do organismo para realizar a ativação necessária dos pró-fármacos, sistemas tampões e o valor da constante relativa do pH sanguíneo (pH 7,4) podem ser úteis no desencadear da liberação do fármaco a partir do pró-fármaco. Nestes casos, os pró-fármacos são caracterizados pela alta labilidade química em pH 7,4, enquanto preferencialmente, exibiria uma estabilidade maior em, por exemplo, pH 3,4. Assim como será discutido adiante exemplos deste pró-fármaco é a *N*-base de Mannich. Uma séria desvantagem dos pró-fármacos que requer liberação química (não enzimática) de seus compostos ativos é a labilidade inerente dos compostos, elevando alguns problemas de estabilidade das formulações principalmente das preparações de soluções (FRIIS e BUNDGAARD, 1996).

Dessa forma, a latenciação permite, mediante a escolha de transportadores adequados, via de regra, desprovidos de atividade biológica, a melhoria das propriedades do fármaco (BUNDGAARD, 1991; CHUNG e FERREIRA, 1999). Assim, o desenvolvimento de pró-fármacos tem como objetivo resolver diversos problemas relacionados aos fármacos, como baixa disponibilidade, diminuição de toxicidade e efeitos colaterias, melhorar características farmacocinéticas dos fármacos, prolongamento de ação, falta de seletividade e instabilidade, resolução de problemas relacionados a formulação, com estabilidade e, solubilidade e propriedades organolépticas, entre outros (FRIIS e BUNDGAARD, 1996; CHUNG e FERREIRA, 1999; ETTMAYEER et al., 2004).

➤ Classificação de pró-fármacos

Wermuth, em 1984 (WERMUTH, 1984,1996), classificou as formas latentes em *pró-fármacos*, subdivididos em pró-fármacos clássicos, bioprecusores, mistos e *fármacos dirigidos*, sendo que a principal característica que diferencia essas duas categorias é a forma de transporte

(CHUNG e FERREIRA, 1999; ETTMAYER et al., 2004; CHUNG et al., 2005, SILVA et al., 2005).

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

- identificação do problema associado ao fármaco;
- identificação das propriedades físico-químicas a serem alteradas;
- escolha do transportador adequado, no caso de pró-fármacos clássicos, e da ligação a ser cindida no compartimento biológico desejado.
- *Bioprecursores*

Bioprecursores são fármacos latentes, que não apresentam um transportador propriamente dito, pois são moléculas inativas, que sofrem biotransformação (geralmente pelo sistema redox), *in vivo*, para se transformar em metabólito ativo.

A lovastatina é inibidor da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A-redutase), utilizado no tratamento da hipercolesterolemias (WILLIAMS, LEMKE, 2002) e ativo graças a biotransformação ao composto não lactônico (figura 25).

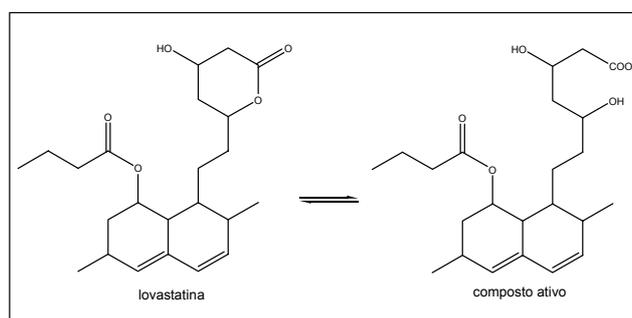


Figura 25: Lovastatina e o derivado não-lactônico ativo.

Outros fármacos comercializados são classificados em bioprecursores, como por exemplo, zidovudina (AZT), metronidazol, enalapril, aceclofenaco (WILLIAMS, LEMKE, 2002).

➤ *Pró-Fármacos Clássicos*

Os pró-fármacos clássicos seguem a definição clássica da latenciação, sendo, por si só, inativos ou menos ativos que o fármaco matriz, devendo sofrer hidrólise (química ou enzimática) para liberar a porção ativa. Estes são obtidos mediante ligação do fármaco matriz a um transportador adequado, com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, a atividade terapêutica, graças ao aumento da biodisponibilidade, da seletividade, à redução da toxicidade e ao prolongamento da ação (WERMUTH, 1984, 1996; STEFFANSEN et al., 2004, CHUNG et al., 2005).

Um pró-fármaco bem desenvolvido deve satisfazer os seguintes critérios (WERMUTH, 1984, 1996):

- a ligação entre a substância ativa e o transportador é usualmente uma ligação covalente;
- o pró-fármaco deve ser inativo ou menos ativo que o composto de partida;
- a ligação entre a substância ativa e o transportador deve ser quebrada *in vivo*;
- o pró-fármaco, e o transportador, assim que liberados *in vivo*, devem ser não tóxicos;
- a geração da forma ativa tem que acontecer com rápida cinética, para assegurar níveis efetivos do fármaco no local de ação e minimizar a metabolização ou a inativação gradual do fármaco.

Como exemplo de pró-fármaco considerando as características citadas acima tem-se os derivados de ampicilina, ativos por via oral. A ampicilina é um dos mais representativos antibióticos β -lactâmicos, e apesar de ser largamente utilizado como antibiótico de largo espectro, sofre baixa absorção quando administrado por via oral, apenas 40% do fármaco é absorvido depois da administração. Através dos processos de latenciação, ésteres lipofílicos aciloxialquil foram desenvolvidos (figura 26), aumentou-se a

absorção para aproximadamente 90%, aumentando a biodisponibilidade do fármaco. Uma vez absorvida, a ampicilina, responsável pela atividade antibacteriana, é liberada em aproximadamente 15 minutos (WERMUTH, 1984, 1996; SILVA et al., 2005).

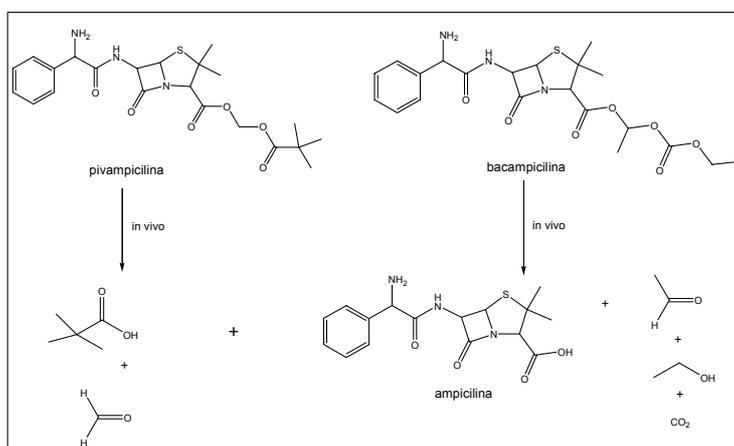


Figura 26: Pró-fármaco lipofílico esterificado (aciloxialquil) de ampicilina.

A hidrossolubilidade pode ser aumentada mediante diminuição das ligações de hidrogênio intra e/ou intermoleculares (BUNDGAARD, 1985), uma vez que estas etapas conduzem a estruturas mais arranjadas, mais dificilmente solubilizadas em meio aquoso. Derivados hidroximetilados de fármacos ácidos, como amida, permitem o aumento de hidrossolubilidade e se constituem intermediários para ésteres.

Chung, em 1996, sintetizou o derivado hidroximetilado do nitrofural (NFOH) (figura 27) como intermediário da síntese de pró-fármacos recíprocos de primaquina e nitrofural, potencialmente ativos em doença de Chagas. Tal composto mostrou-se altamente ativo, quando ensaiado em cultura de células infectadas com *T. cruzi*, e menos mutagênico, quando submetido ao teste de Ames, em comparação ao composto matriz (GÜIDO et al., 2001; CHUNG et al., 2003; CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005).

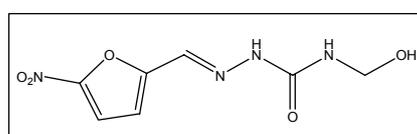


Figura 27: Derivado hidroximetilado do nitrofural (NFOH).

➤ *Pró-Fármacos Mistos*

Os pró-fármacos mistos constituem-se em formas latentes com características de bioprecursores e de pró-fármacos clássicos, isto é, apresentam-se como molécula biologicamente inativa, que necessitam sofrer diversas reações químicas para se converterem forma ativa, aumentando a concentração do fármaco ativo em um sítio de ação específico (BODOR, ABDADELALIM, 1985, CHUNG et al., 2005).

➤ *Pró-Fármacos dirigidos*

A liberação de fármacos direcionados a células via latenciação tem gerado interesse considerável com o objetivo de aumentar a potência e atingir seletividade de ação, diminuindo os efeitos adversos de um fármaco (HAN et al., 2000; HIRABAYASHI et al., 2001). Esta classe consiste em fármacos ligados a um transportador específico para determinados receptores ou enzimas existentes no sítio de ação específicos de um fármaco, reduzindo sua ação inespecífica sobre outros órgãos e tecidos.

Os transportadores dos fármacos dirigidos podem ser constituídos de polímeros, que funcionam como suporte para os grupos diretores, ou como eles próprios, os grupos que direcionam a ação, quando se tratam de macromoléculas específicas, como, por exemplo, anticorpos (CHUNG e FERREIRA, 1999; ETTMAYER et al., 2004; CHUNG et al., 2005, SILVA et al., 2005).

Entretanto, não somente os polímeros são transportadores seletivos. Em 2004, Devy e cols. sintetizaram pró-fármacos peptídicos de doxorubicina, planejados racionalmente com base na seletividade da plasmina. Estes pró-fármacos podem ser ativados localmente em razão dos níveis de plasmina produzidos em alguns tipos de tumores sólidos, através da ação de ativadores de plasminogênio associados ao tumor. Os resultados mostram seletividade *in vitro* e *in vivo* maior que a dos derivados peptídicos em relação ao fármaco de origem (CHUNG et al., 2005).

➤ *Pró-fármacos recíprocos*

Os pró-fármacos recíprocos caracterizam-se por seu transportador, diferentemente do pró-fármaco clássico, possuir atividade terapêutica. Dessa forma, pode-se obter pró-fármaco com atividades terapêuticas diferentes ou semelhantes, atuando por mecanismos de ação diferentes ou iguais. Tal processo é especialmente racional nos casos em que há sinergismo de ação.

Os pró-fármacos recíprocos não são tão recentes, já que vários compostos foram introduzidos na terapêutica antes do reconhecimento do conceito de pró-fármaco. A sulfassalazina é um bom exemplo, pois foi utilizada em 1942, para o tratamento de artrite reumatóide e, atualmente, é utilizada no tratamento de colite ulcerativa. Este pró-fármaco, após sofrer ação das azo-redutases, libera sulfapiridina e ácido aminossalicílico (5-ASA), ambos farmacologicamente ativos (figura 28).

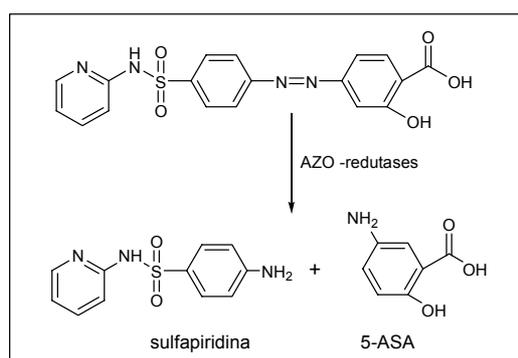


Figura 28: Pró-fármaco recíproco de sulfapiridina e ácido aminossalicílico (5-ASA).

Após a descoberta de que o 5-ASA era o responsável pela atividade terapêutica da sulfassalazina, foram desenvolvidos vários outros pró-fármacos derivados do ácido aminossalicílico, incluindo o pró-fármaco recíproco de duas moléculas de 5-ASA, a olsalazina (figura 29) (ETTMAYER et al.,2004; CHUNG et al.,2005, SILVA et al.,2005).

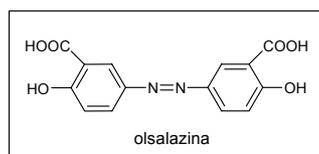


Figura 29: Pró-fármaco recíproco olsalazina.

Chung, em 1996, sintetizou pró-fármacos recíprocos de primaquina e nitrofurais, utilizando espaçantes dipeptídicos, de ação seletiva pela cruzipaina, com o objetivo de obter derivados potencialmente antichagásicos. O princípio empregado foi de que a primaquina, uma vez liberada especificamente pela cruzipaina, aumentaria o estresse oxidativo no parasito, que não poderia ser revertido em razão de que a tripanotona redutase se encontraria inibida pelo nitrofurais. O composto mais ativo, quando ensaiado em cultura de células infectadas com o *T. cruzi*, foi o derivado com espaçante dipeptídico Lys-Arg (figura 30). Os intermediários dipeptídicos da primaquina também se mostraram ativos tanto em amastigotas quanto em tripomastigotas, no mesmo tipo de ensaio biológico *in vitro* (CHUNG et al.; 1997, 2005; SILVA et al., 2005).

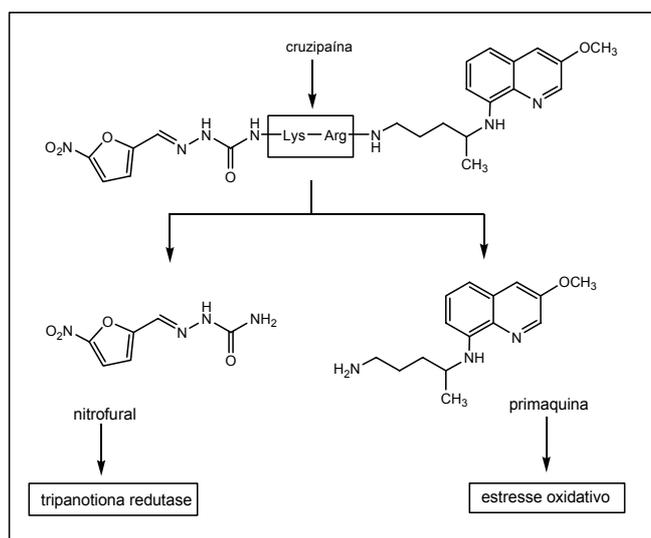
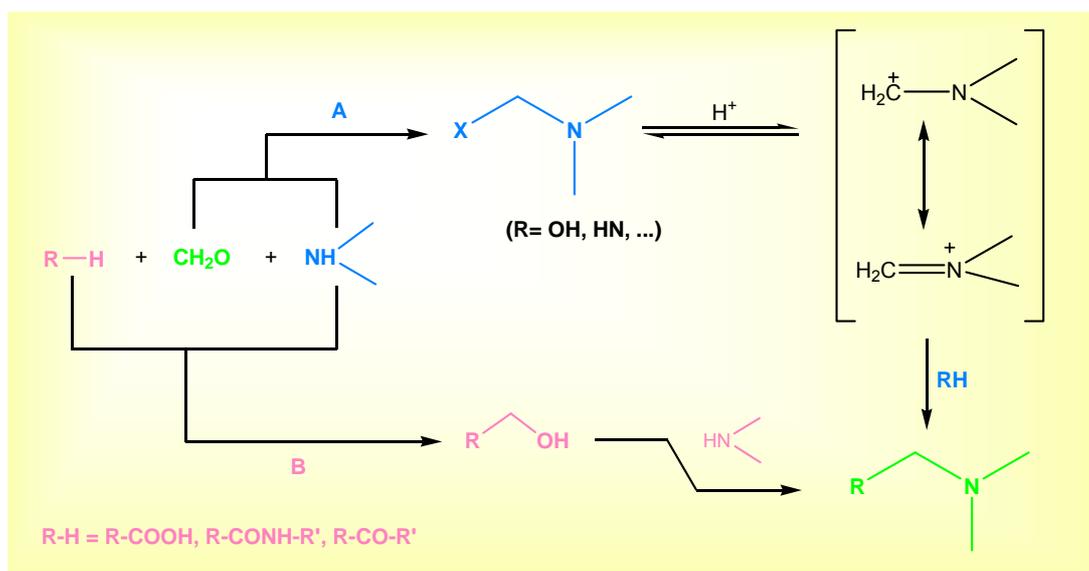


Figura 30: Pró-fármaco recíproco dipeptídico derivado de nitrofurais e primaquina, potencialmente antichagásico (CHUNG, 1996; CHUNG et al., 2005).

Entre os diversos métodos de preparação de pró-fármacos, a esterificação é uma das mais empregadas. Seguida da formação de amidas, imidas e carbamatos (KOROLKOVAS, 1988; BUNDGAARD, 1991). Outras ligações vêm obtendo atenção na obtenção de pró-fármacos nos quais a biotransformação não seja enzimática, como as iminas, a base de Mannich e enaminas, além das possíveis formações de sais, complexos e acetais (CRUZ, 1995).

A reação de Mannich consiste, basicamente, na condensação de um substrato (R-H) contendo ao menos um hidrogênio ativo – alquilcetonas, fenóis, NH-heterociclo, entre outros – com formaldeído (ou ocasionalmente, outros aldeídos), e uma amina primária ou secundária, podendo até ser eventualmente uma amônia (esquema 5) (TRAMONTINI, 1973, TRAMONTINI e ANGIOLINI, 1990).



Esquema 5: Reação geral da formação da base de Mannich.

Fonte: (TRAMONTINI e ANGIOLINI, 1990).

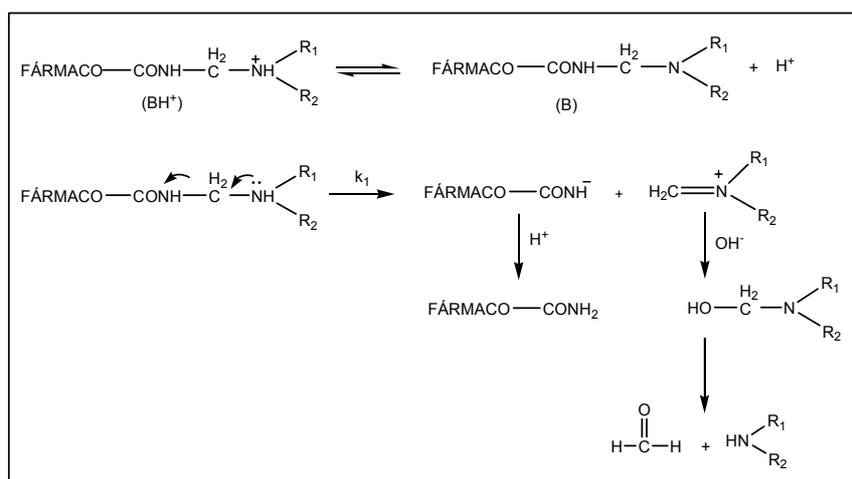
Dois fatores despertam bastante interesse pela química das bases de Mannich – são compostos muito reativos, podendo ser transformados em outros compostos, constituindo-se em intermediários úteis na síntese de heterocíclicos, aminoácidos e outros derivados, e, por introduzir uma função

básica, permitem tornar os derivados solúveis em solventes aquosos, quando transformados em sais de aminas (TRAMONTINI, 1973, TRAMONTINI e ANGIOLINI, 1990).

As bases de Mannich funcionam como candidatos a pró-fármacos para compostos NH-ácidos como várias amidas, imidas, carbamatos, hidantoínas e derivados da uréia assim como para aminas alifáticas e aromáticas.

Bases de Mannich são rapidamente hidrolisadas em soluções aquosas. A taxa de hidrólise usualmente aumenta com aumento de pH, resultando em perfil sigmoidal (forma-S) de taxa de pH, obtido quando $\log k_{\text{obs}}$ (taxa de degradação) é traçado contra o valor de pH. O perfil de taxa de pH pode ser considerado assumindo a decomposição espontânea de bases de Mannich livres (B) e a forma protonada (BH^+) (FRIIS e BUNDGAARD, 1996).

O mecanismo de reação proposto para a decomposição (esquema 6.) envolve quebra da ligação N-C com a formação do ânion amida (ou imida) e o cátion imínio. Nos passos subseqüentes, a molécula restante transfere um próton ao ânion e um íon hidróxido ao íon imônio, gerando uma hidroximetilamina, que rapidamente dissocia a formaldeído e amina (FRIIS e BUNDGAARD, 1996).



Esquema 6: Mecanismo de reação proposto para decomposição das bases de Mannich.

Fonte: FRIIS e BUNDGAARD, 1996.

Os efeitos estruturais na taxa de decomposição das bases de Mannich derivados de carboxiamidas, tioamidas, sulfonamidas ou imidas e aminas alifáticas ou aromáticas envolvem efeitos estéricos e basicidade da amina e a acidez da amida.

As taxas de hidrólise das bases de Mannich desprotonadas são aceleradas fortemente por (a) aumento de efeitos estéricos no substituinte amina, (b) aumento da basicidade da amina e (c) aumento da acidez da amida do composto matriz (FRIIS e BUNDGAARD, 1996).

A transformação de uma amida em base de Mannich introduz uma porção amino ionizável que pode permitir a preparação de derivados com maior solubilidade em água em valores de pH menores, onde a estabilidade ao mesmo tempo pode ficar ligeiramente alta (FRIIS e BUNDGAARD, 1996).

Além disso, o conceito pode ser útil para aumento do comportamento de dissolução de fármacos pouco solúveis e no esforço para aumento de biodisponibilidade oral. Ainda, isso tem sido mostrado que a formação de várias *N*-bases de Mannich de fármacos NH-acídicos (por exemplo, fenitoína, acetazolamida e alopurinol) aumenta as taxas de dissolução intrínseca em soluções 0,1 mol/L HCl, em comparação com os compostos de partida (FRIIS e BUNDGAARD, 1996).

A introdução dos pró-fármacos na terapêutica realmente gerou resultados satisfatórios, superando propriedades indesejáveis como baixa absorção, rápida biodegradação, sabor e/ou odor desagradáveis ou problemas relacionados à formulação. O conceito pró-fármaco tem achado muitas aplicações úteis na pesquisa e desenvolvimento de fármacos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes e solventes

- acetona p.a. (Synth)
- acetonitrila p.a. (Synth)
- acetato de etila p.a. (Synth)
- ácido acético glacial p.a. (Synth)
- ácido clorídrico p.a. (Merck)
- ácido fórmico p.a. (Merck)
- ácido sulfúrico p.a. (Merck)
- alendronato de sódio p.a. (Deg)
- anidrido succínico p.a. (Merck)
- brometo de potássio p.a. (Sigma Chemical Co.)
- butanol p.a. (Vetec)
- butilamina p.a. (Vetec)
- carbonato de potássio anidro p.a. (Mallinckrodt)
- carbonato de sódio anidro p.a. (Synth)
- cloreto de sódio p.a. (Synth)
- cloreto de succinoíla ca. 95% (Acrós Organics)
- cloreto de tosila p.a. (Fluka)
- clorofórmio p.a. (Synth)

- dicitloexilcarbodiimida puriss.; $\geq 99,0\%$ (Fluka)
- 4-dimetilaminopiridina puriss.; $\geq 99,0\%$ (Fluka)
- diclorometano p.a. (Synth)
- dimetilformamida p.a. (Synth)
- dimetilsulfóxido deuterado (Merck)
- dimetilsulfóxido p.a. (Vetec)
- formaldeído p.a. (Merck)
- hidróxido de amônio p.a. (Synth)
- hidroxibenzotriazol 98% (Acrós Organics)
- hidróxido de sódio p.a. (Synth)
- iodo sublimado
- metanol deuterado (Merck)
- metanol p.a. (Synth)
- ninhidrina (Serva)
- nitrofural p.a. (Sigma Chemical Co.)
- piridina p.a. (Merck)
- tetraidrofurano p.a. (Vetec)
- trietilamina p.a. (Merck)
- sulfato de dimetila p.a. (Fluka)
- sulfato de sódio anidro p.a. (Synth)

4.2. Análises

4.2.1. Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão (ou decomposição) foram determinadas em aparelho capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific[®], disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

4.2.2. Análise no Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho (IV) dos compostos, matérias-primas e compostos sintetizados, foram obtidos em aparelho FTIR-8300, SHIMADZU[®], disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-UNESP, empregando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as medidas feitas em cm^{-1} .

4.2.3. Análise cromatográfica em camada delgada

As análises foram realizadas em cromatofolhas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F254 Merck[®], e em cromatofolhas de alumínio de celulose (sem indicador de fluorescência), Merck[®] para o acompanhamento das reações e avaliação dos produtos sintetizados. As fases móveis empregadas foram: clorofórmio:metanol:ácido acético (85:10:5, v/v/v, sistema solvente 1; metanol:ácido acético (90:10, v/v), sistema solvente 2; metanol:hidróxido de amônio (95:5,v/v), sistema solvente 3; butanol:água:ácido acético (4:1:1,v/v/v), sistema solvente 4; metanol:água:ácido acético (20:70:10, v/v/v), sistema solvente 5; clorofórmio:metanol:ácido acético (95:5:3, v/v/v), sistema solvente 6; água:piridina:butanol:acetona:ácido fórmico (30:30:30:5,v/v/v), sistema solvente 7; água:piridina:metanol:ácido fórmico (30:30:30:5,v/v/v), sistema solvente 8; variando de acordo com o experimento. A revelação das placas foi realizada por lâmpada ultravioleta (UV), iodo ou ninhidrina.

4.2.4. Análise de Espectroscopia de Massas

As análises foram realizadas por espectroscopia de massas por electrospray (MS-SCAN e Daughters SCAN), nos equipamentos Micromass – Quattro Ultima[®] e Quattro LC[®], disponíveis no Laboratório Cartesius Analytical Unit, Instituto de Ciências Biomédicas, ICB-USP, SP.

Condições de análise:

Electrospray positivo (ESP+) e negativo (ESP-); solução 100 µg/mL em ACN/água (50/50; v/v) – infusão 10 µl/min; (ESP+) = ácido fórmico (HCOOH); (ESP-) = hidróxido de amônio (NH₄OH).

4.2.5. Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono 13 (RMN ¹³C)

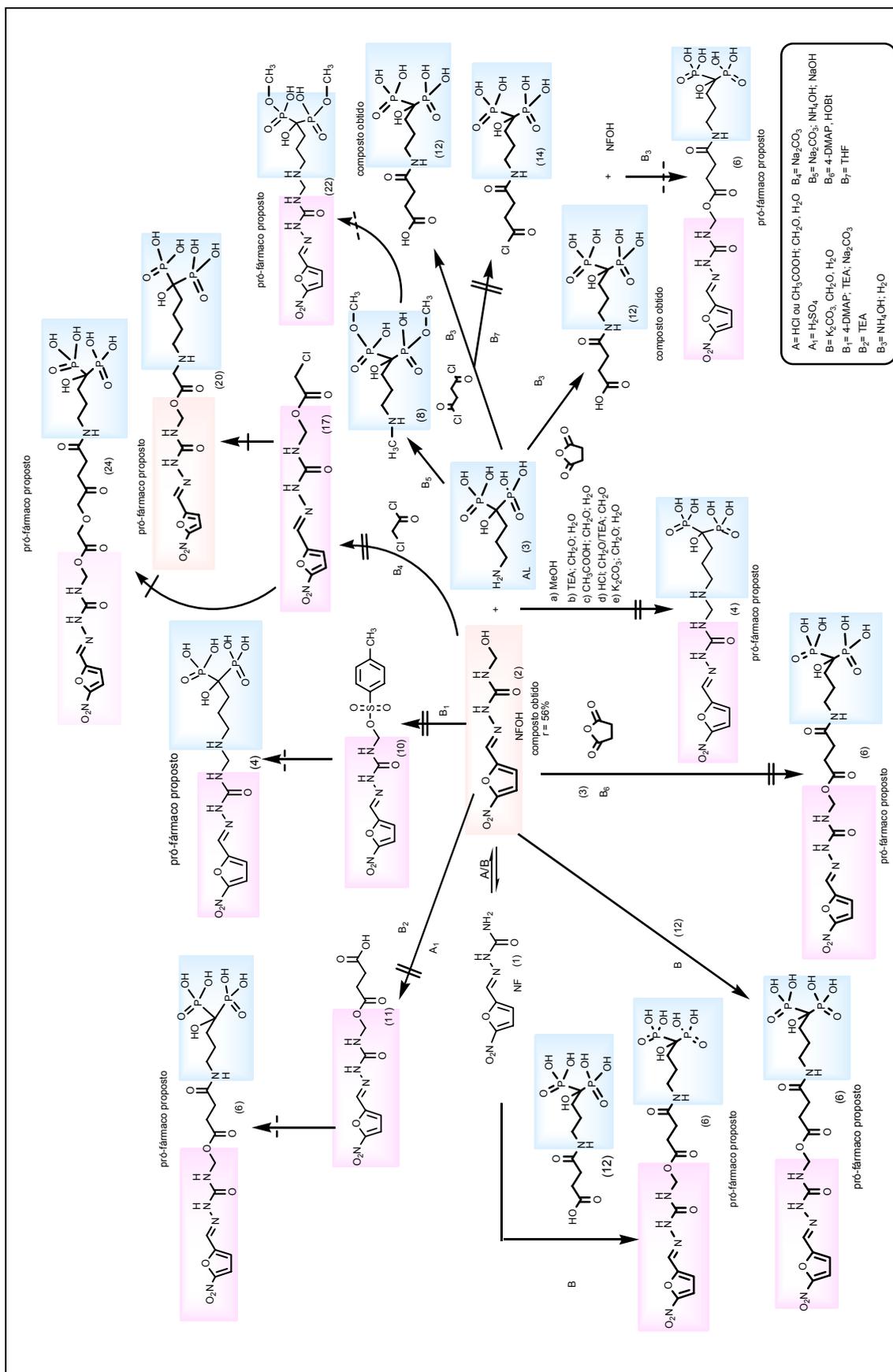
As análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP-SP.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (H¹, 300 MHz) e carbono (C¹³, 75 MHz) foram obtidos através do espectrômetro Bruker DPX-300. Os deslocamentos químicos estão descritos em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) para H¹ e C¹³ aplicados como padrão interno. A multiplicidade está descrita como singleto (s), dubleto (d) e tripleto (t). A quantidade de hidrogênios foi obtida por integral e as constantes de acoplamento estão relatadas em Hertz (Hz).

4.3. Métodos

A seguir está apresentado o esquema geral das sínteses realizadas, os pró-fármacos propostos e seus respectivos intermediários.

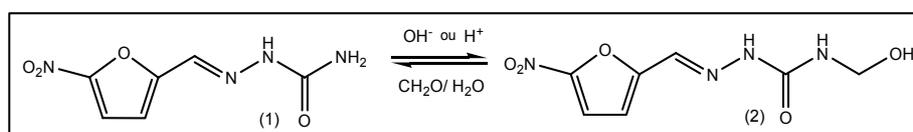
A estrutura (4) refere-se ao pró-fármaco recíproco nitrofural hidroximetilado e alendronato de sódio (base de Mannich). As estruturas (6), correspondem ao pró-fármaco que apresenta espaçante succinil, e a estrutura (20), ao pró-fármaco que apresenta espaçante acetil.



4.3.1. Métodos de Síntese

4.3.1.1. Síntese do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH) – composto (2)

O derivado hidroximetilado de nitrofural foi obtido de acordo com a metodologia descrita por CHUNG (1996), utilizando-se nitrofural (NF) em meio básico ou ácido na proporção de 1:1 (mol:mol) com excesso de formaldeído (CH_2O) em meio aquoso a temperatura ambiente.



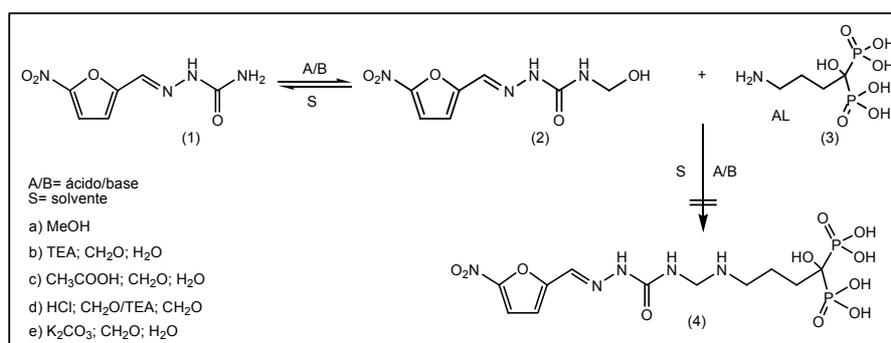
Esquema 7: Reação proposta para síntese do derivado hidroximetilnitrofural (NFOH), composto (2), a partir do NF (1) em meio básico ou ácido.

Tabela 3: Métodos utilizados para síntese do derivado nitrofural hidroximetilado – composto (2)

Método	Reagentes	Solvente	Temperatura	Tempo total de reação
a) CHUNG, 1996 (experimento 1)	K_2CO_3 , CH_2O	H_2O	ambiente	24 horas
b) TROSSINI, 2004 (experimento 2)	K_2CO_3 , CH_2O (em duas etapas)	H_2O	ambiente	5 horas
c) CHUNG, 1996 (experimento 3)	HCl , CH_2O	H_2O	ambiente	24 horas

4.3.1.2. Síntese da base de Mannich nitrofural hidroximetilado e alendronato de sódio – composto (4)

A síntese do pró-fármaco proposto foi realizada de acordo com métodos adaptados, descritos por TROSSINI (2004), a partir do derivado hidroximetilado (NFOH) obtido do nitrofural (NF) e alendronato de sódio (AL) na proporção de 1:1 (mol:mol) em metanol; ou a partir do nitrofural (NF) e alendronato de sódio (AL), também na proporção de 1:1 (mol:mol), na presença de excesso de formaldeído, variando-se o pH do meio reacional.



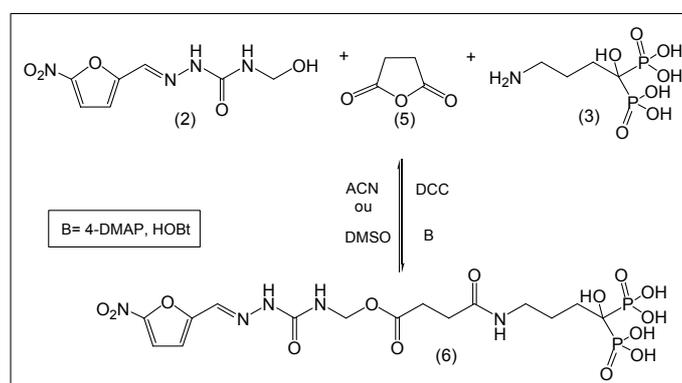
Esquema 8: Reação proposta para síntese da base de Mannich, composto (4).

Tabela 4: Métodos utilizados para síntese da base de Mannich, composto (4)

Método	Reagentes		Solvente		Temperatura	Tempo total de reação
	1 ^a Etapa	2 ^a Etapa	1 ^a etapa	2 ^a etapa		
a) experimento 4	NFOH, AL	---	CH ₃ OH	---	ambiente	24 horas
b) experimento 5	NF, CH ₂ O _{exc} , HCl	TEA, AL, CH ₂ O _{exc}	H ₂ O	H ₂ O	ambiente	48 horas
c) experimento 6	NF, AL, CH ₂ O _{exc} , CH ₃ COOH	---	CH ₃ OH, H ₂ O	---	ambiente	24 horas
d) experimento 7	NF, CH ₂ O _{exc} , HCl	AL, TEA, CH ₂ O _{exc}	CH ₃ OH	H ₂ O	ambiente	25 horas
e) experimento 8	NF, CH ₂ O _{exc} , HCl	AL, CH ₂ O _{exc} , TEA	H ₂ O	H ₂ O	ambiente	26 horas
f) experimento 9	NF, CH ₂ O _{exc} , HCl	AL, CH ₂ O _{exc} , TEA	H ₂ O	H ₂ O	1 ^a etapa: ambiente, 2 ^a etapa: em banho de gelo	26 horas
g) experimento 10	NF, K ₂ CO ₃ , CH ₂ O _{exc}	AL, K ₂ CO _{exc} , CH ₂ O _{exc}	H ₂ O	H ₂ O	ambiente	48 horas

4.3.1.3. Síntese do pró-fármaco nitrofural hidroximetilado – anidrido succínico – alendronato de sódio – composto (6)

A síntese do pró-fármaco proposto foi realizada a partir de métodos adaptados de CHUNG (1996), utilizando-se quantidades equimolares do derivado hidroximetilado (NFOH) e alendronato de sódio (AL) na proporção de 1:1 (mol:mol), na presença de um espaçante succínico em excesso e de agente acoplante, variando-se o catalisador, uma base forte.



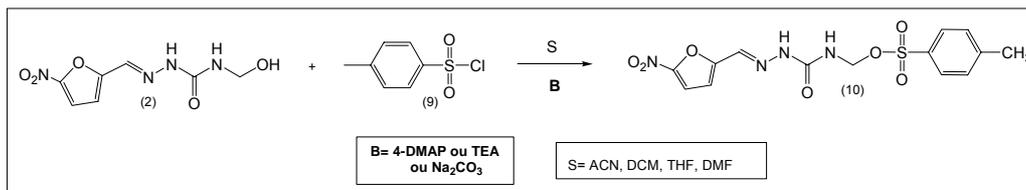
Esquema 9: Reação proposta para síntese do pró-fármaco recíproco NFOH – anidrido succínico – alendronato de sódio, composto (6).

Tabela 5: Métodos utilizados para síntese pró-fármaco recíproco NFOH - anidrido succínico – alendronato de sódio, composto (6)

Método	Reagentes		Solvente		Temperatura	Tempo total de reação
	Balão 1	Balão 2	Balão 1	Balão 2		
a) experimento 11	NFOH, AND. SUCC, 4-DMAP/ DCC	AL, 4-DMAP	ACN	ACN	ambiente	36 horas
b) experimento 12	NFOH, AND. SUCC, HOBT / DCC	AL, HOBT	DMSO	DMSO	ambiente	36 horas

4.3.1.5. Síntese do intermediário tosilado de nitrofural hidroximetilado – composto (10)

A síntese do intermediário tosilado de nitrofural hidroximetilado foi realizada utilizando-se o derivado NFOH e excesso de cloreto de tosila, em meio básico.



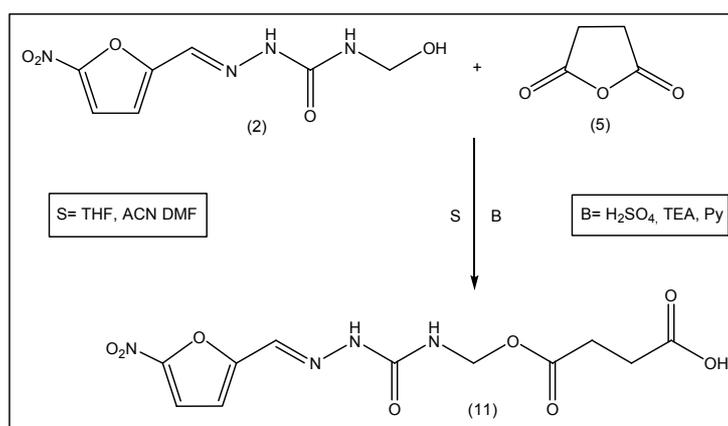
Esquema 11: Reação proposta para síntese do derivado tosilado, composto (10) utilizando NFOH (2) e cloreto de tosila (9) em meio básico.

Tabela 7: Métodos para síntese do derivado tosilado de nitrofural hidroximetilado – composto (10)

Método	Reagentes		Solvente	Temperatura	Tempo total de reação
	1 ^a etapa	2 ^a etapa			
a) experimento 19	NFOH, 4-DMAP (1:1, mol:mol)	Tos-Cl _{exc}	DCM	0°C/ambiente	24 horas
b) experimento 20	NFOH, TEA	Tos-Cl _{exc}	DCM	ambiente	144 horas
c) experimento 21	NFOH, TEA	Tos-Cl _{exc}	ACN	ambiente	24 horas
d) experimento 22	NFOH, Na ₂ CO ₃	Tos-Cl _{exc}	ACN	ambiente	47 horas
e) experimento 23	NFOH, TEA	Tos-Cl _{exc}	THF	ambiente	36 horas
f) experimento 24	NFOH, Tos-Cl _{exc}	---	TEA	ambiente	72 horas
g) experimento 25	NFOH, TEA	Tos-Cl (gota a gota, 0°C)	ACN	0°C/ambiente	94 horas
h) experimento 26	NFOH, TEA	Tos-Cl (gota a gota, 0°C)	ACN	0°C/ambiente	12 horas
	3^a etapa: ButNH ₂ (após 4 horas)				
i) experimento 27	NFOH, 4-DMAP (1:0,1, mol:mol)	Tos-Cl _{exc} Na ₂ CO ₃	DMF	0°C/ambiente	24 horas

4.3.1.6. Síntese do intermediário hemissuccinato de nitrofural hidroximetilado – composto (11)

A síntese do intermediário hemissuccinato de nitrofural hidroximetilado foi realizada a partir de métodos adaptados descritos por SANTOS, 2005, utilizando-se quantidades equimolares do derivado hidroximetilado (NFOH) e anidrido succínico na proporção de 1:1 (mol:mol), ou tendo este último em excesso, variando-se o pH do meio reacional.



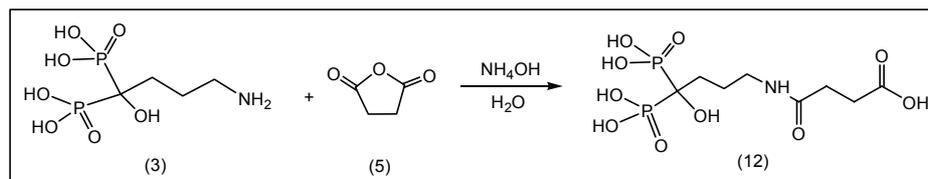
Esquema 12: Reação proposta para síntese do derivado hemissuccinato de NFOH, composto (11), a partir do NFOH (2) e anidrido succínico (5), em meio ácido ou meio básico.

Tabela 8: Métodos para síntese do derivado hemissuccinato de NFOH – composto (11)

Método	Reagentes	Solvente	Temperatura	Tempo total de reação
a) experimento 28	NFOH, AND. SUCC., H ₂ SO ₄ 20%	THF	ambiente	3 horas
b) experimento 29	NFOH, AND. SUCC., TEA	THF	ambiente	3 horas
c) experimento 30	NFOH, AND. SUCC.	ACN/Py 7:3	ambiente	60 horas
d) experimento 31	NFOH, AND. SUCC	THF/Py 7:3	ambiente	60 horas
e) experimento 32	NFOH, AND. SUCC	DMF/Py 9:1	ambiente	60 horas

4.3.1.7. Síntese do intermediário hemissuccinoil alendronato – composto (12)

A síntese do intermediário hemissuccinoil alendronato foi realizada a partir de métodos adaptados descritos por HARRIS, et al. (1995), utilizando-se AL e anidrido succínico em excesso, em água e em meio básico.



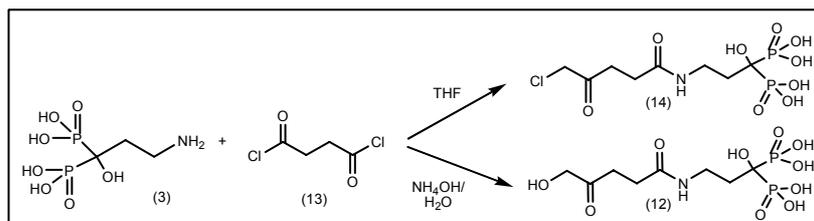
Esquema 13: Reação proposta para síntese do derivado hemissuccinoil-AL, composto (12), a partir do AL (3) e anidrido succínico (5).

Tabela 9: Métodos para síntese do derivado hemissuccinoil-AL – composto (12).

Método	Reagentes	Solvente	Temperatura	Tempo total de reação
a) experimento 33	AL, AND. SUCC. _{exc}	H ₂ O	ambiente	36 horas
b) experimento 34	AL, AND. SUCC. _{exc} ,	H ₂ O	microondas	6 minutos
c) experimento 35	AL, AND. SUCC. _{exc} , NH ₄ OH 28-30%	H ₂ O	ambiente	120 horas
d) experimento 36	AL, AND. SUCC. _{exc} , NH ₄ OH 28-30%	H ₂ O	ambiente	36 horas

4.3.1.8. Síntese do intermediário derivado de alendronato de sódio e cloreto de succinoíla – compostos (14 e 12)

A síntese do intermediário alendronato de sódio e cloreto de succinoíla foi realizada utilizando-se AL e excesso de cloreto de succinoíla, em meio orgânico e em meio aquoso na presença de uma base.



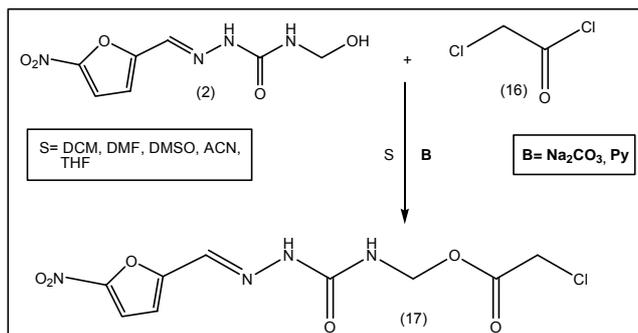
Esquema 14: Reação proposta para síntese dos derivados contendo alendronato de sódio e cloreto de succinoíla, composto (14 e 12).

Tabela 10: Métodos para síntese dos derivados contendo alendronato de sódio e cloreto de succinoíla - composto (14 e 12).

Método	Reagentes	Solvente	Temperatura	Tempo total de reação
a) experimento 37	AL, Cl. SUCC. _{exc}	THF (atmosfera N ₂)	refluxo	144 horas
b) experimento 38	AL, Cl. SUCC. _{exc} , NH ₄ OH 28- 30%	sem solvente / posterior adição de água	ambiente	36 horas

4.3.1.9. Síntese do intermediário acetilado de nitrofural hidroximetilado – composto (17).

A síntese do intermediário acetilado de NFOH foi realizada utilizando-se NFOH e excesso de cloreto de cloroacetila, em meio orgânico e na presença de uma base.



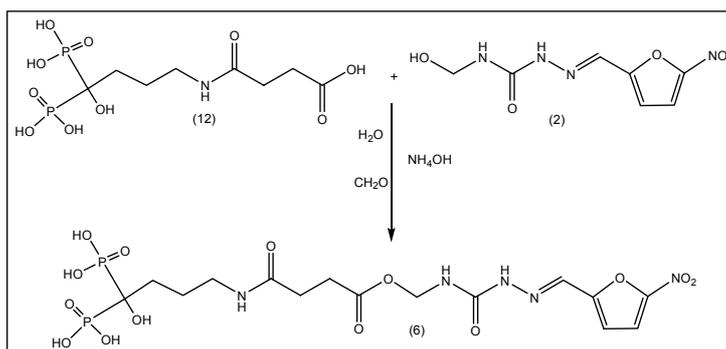
Esquema 15: Reação proposta para síntese do derivado acetilado de NFOH – composto (17).

Tabela 11: Métodos para síntese do derivado acetilado de NFOH – composto (17)

Método	Reagentes	Solvente	Temperatura	Tempo total de reação
a) experimento 39	NFOH, Na ₂ CO ₃ , Cl.Cloroacet.	DCM	ambiente	12 horas
b) experimento 40	NFOH, Na ₂ CO ₃ , Cl.Cloroacet.	DMF	ambiente	18 horas
c) experimento 41	NFOH, Na ₂ CO ₃ , Cl.Cloroacet.	DMSO	ambiente	18 horas
d) experimento 42	NFOH, Cl.Cloroacet	ACN/Py 7:3	ambiente	60 horas
e) experimento 43	NFOH, Cl.Cloroacet	THF/Py 7:3	ambiente	60 horas
f) experimento 44	NFOH, Cl.Cloroacet	DMF/Py 9:1	ambiente	60 horas

4.3.1.10. Síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural hidroximetilado e hemissuccinoil alendronato – composto (6)

A síntese do pró-fármaco foi realizada partir do derivado hemissuccinoil alendronato (HSAL) obtido anteriormente, utilizando-se quantidades equimolares de NFOH e HSAL na proporção de 1:1 (mol:mol), em água, meio básico e à temperatura ambiente.



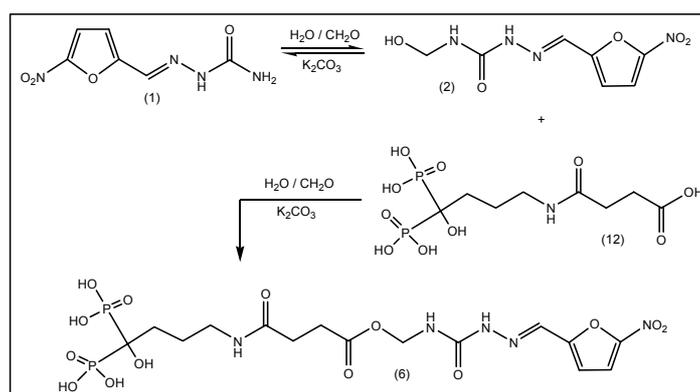
Esquema 16: Reação proposta para síntese do pró-fármaco proposto – composto (6).

Tabela 12: Método para síntese do pró-fármaco recíproco proposto - composto (6)

Método	Reagentes	Solvente	Temperatura	Tempo total de reação
a) experimento 45	NFOH, CH ₂ O, NH ₄ OH, HSAL	H ₂ O	ambiente	24 horas

4.3.1.11. Síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural e hemissuccinoil alendronato – composto (6)

A síntese do pró-fármaco foi realizada partir do derivado hemissuccinoil alendronato (HSAL) obtido anteriormente, utilizando-se quantidades equimolares de NF e HSAL na proporção de 1:1 (mol:mol), em água, meio básico e à temperatura ambiente.



Esquema 17: Reação proposta para síntese do pró-fármaco proposto – composto (6).

Tabela 13: Método para síntese do pró-fármaco proposto – composto (6).

Método	Reagentes		Solvente	Temperatura	Tempo de reação
	1ª etapa	2ª etapa			
a) experimento 46	NF, K ₂ CO ₃ , CH ₂ O	HSAL, K ₂ CO ₃ , CH ₂ O _{exc}	H ₂ O	ambiente	32 horas

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Sínteses

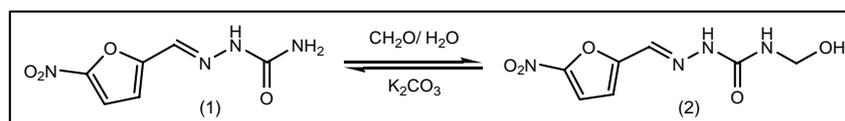
5.1.1. Síntese do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH)

Para a síntese do pró-fármaco recíproco planejado, NFOH-AL realizou-se primeiramente a síntese do derivado hidroximetilado de nitrofural.

Diante dos estudos realizados por CHUNG et al., 2003 e de seus resultados promissores do derivado hidroximetilado de nitrofural obtido, avaliou-se a metodologia descrita, já que este derivado seria intermediário fundamental para a formação do pró-fármaco. Realizaram-se três tentativas para obter melhor rendimento em menor tempo de reação.

O principal objetivo destes derivados hidroximetilados é o de obter compostos mais hidrofílicos que os de partida. Em geral, fármacos com NH-ácidos, como as amidas, imidas e ureídas são alvos em potencial para a síntese deste tipo de derivado (CHUNG et al., 2003; CHUNG et al., 2005). Neste caso, o grande objetivo é o de se obter um composto mais ativo frente o *Trypanosoma cruzi* e menos tóxico ao homem que o fármaco de partida NF (CHUNG et al., 2003).

No **experimento 1**, reproduziu-se o método descrito por CHUNG (1996), otimizando-se a reação de 49 para 24 horas. Comprovado inicialmente por CCD, observaram duas manchas, uma com $R_f = 0,82$ referente ao produto de partida NF e outra com $R_f = 0,63$ referente ao derivado hidroximetilado, conforme esquema 19. A faixa de fusão do composto obtido foi **172,7-183,7°C**.

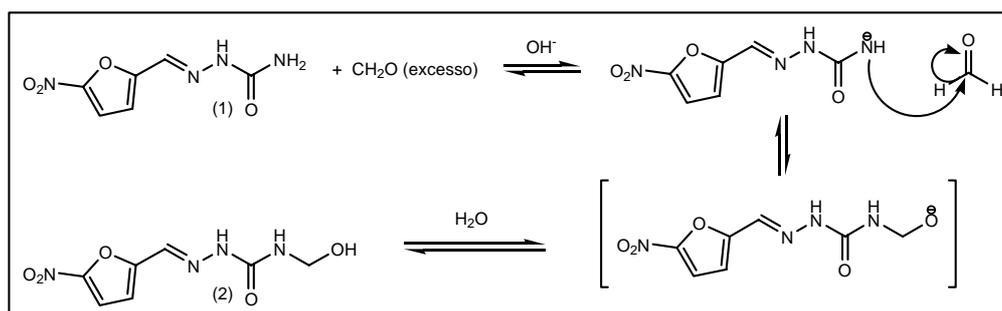


Esquema 18: Síntese do derivado NFOH em meio básico (CHUNG, 1996) – experimento 1.

O composto obtido foi avaliado no infravermelho (figura 31 e tabela 14), por espectroscopia de massas (figura 34 e esquema 20) e finalmente por RMN ^1H e RMN ^{13}C , (figuras 35 e 36 e tabela 17, respectivamente) confirmando-se a estrutura do NFOH, comparada ao composto de partida, NF (figura 33 e tabela 16). O rendimento da reação foi de 56%.

No **experimento 2**, de acordo com metodologia descrita por TROSSINI (2004), considerando a possível reversão do produto ao seu precursor, e havendo a hipótese de que se estabeleceria um equilíbrio entre o NF e o composto obtido, a adição do formaldeído em duas etapas poderia favorecer o deslocamento do equilíbrio para direita, a favor da formação do produto desejado, o NFOH em menor tempo (5 horas), composto (2). A reação foi acompanhada por CCD, observando-se $R_f = 0,6$ referente ao NFOH posteriormente analisado no infravermelho, o qual comprovou a formação do produto desejado (figura 32 e tabela 15) A faixa de fusão do composto obtido foi de 175 a 183° C. O rendimento da reação foi de 61%. O valor do rendimento obtido não é tão significativo em relação ao experimento anterior, porém, o ganho mostra-se em relação ao tempo total da reação para síntese do mesmo produto.

O esquema 19 mostra o possível mecanismo para formação do derivado de nitrofural hidroximetilado (2) em meio básico.



Esquema 19: Mecanismo da reação de formação do derivado hidroximetilado, composto (2) em meio básico.

A seguir estão apresentados os espectros no infravermelho dos experimentos 1 (24 horas) e 2 (5 horas) do derivado hidroximetilado (NFOH), composto (2) e seu composto (1) de partida, o nitrofural (NF), comprovando sua formação.

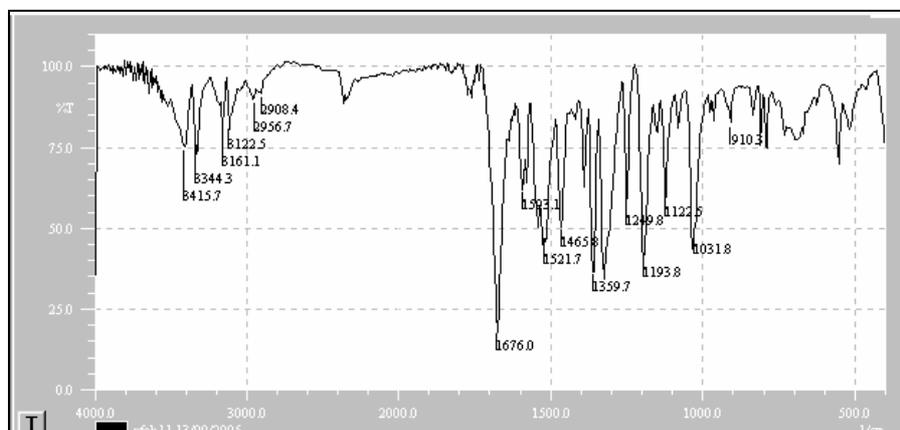
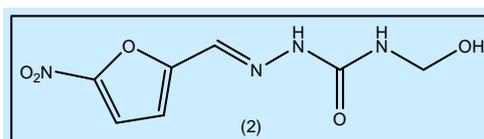


Figura 31: Espectro no infravermelho (KBr, ν cm^{-1}) do NFOH, composto (2) (experimento 1).

Tabela 14: Análise no infravermelho e faixa de fusão do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH)



Grupamento	NFOH (cm^{-1}) encontrado
$\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular	3415,7
$\nu_{\text{N-H}}$ assimétrica de amida secundária	3344,3
$\nu_{\text{N-H}}$ simétrica de amida secundária	3122,5
$\nu_{\text{C-H}}$ alifático	2956,7
	2908,4
$\nu_{\text{C=O}}$ de amida secundária	1676
ν assimétrica de NO_2 aromática	~ 1500
ν simétrica de NO_2 aromática	1359,7
$\nu_{\text{C-N}}$ de amida secundária	1249,8
$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool primário	1122,5 (~1100)
Faixa de fusão	
172,7-183,7°C (NFOH - valor encontrado)	

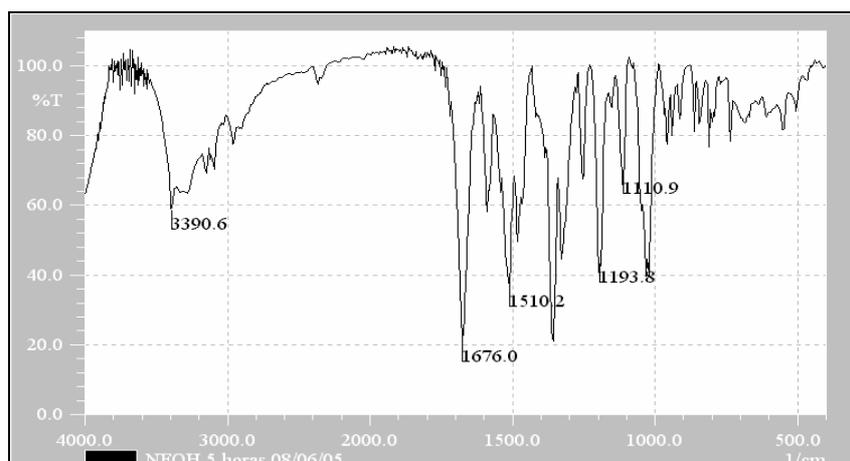
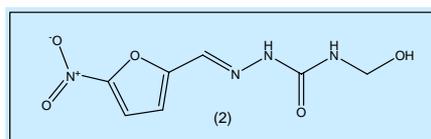


Figura 32: Espectro no infravermelho (KBr, ν cm^{-1}) NFOH em 5 horas (experimento 2).

Tabela 15: Análise no infravermelho e faixa de fusão do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH) – 5 horas.



Grupamento	NFOH (cm^{-1}) encontrado
$\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação hidrogênio intermolecular	3390,6
$\nu_{\text{N-H}}$ de amida secundária	~3200
$\nu_{\text{C=O}}$ de amida secundária	1676,0
ν de NO_2 aromática	1510,2
$\nu_{\text{C-N}}$ de amida secundária	1193,8 (~1200)
$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool primário	1110,9 (~1100)
Faixa de fusão 175-183° C (NFOH - valor encontrado)	

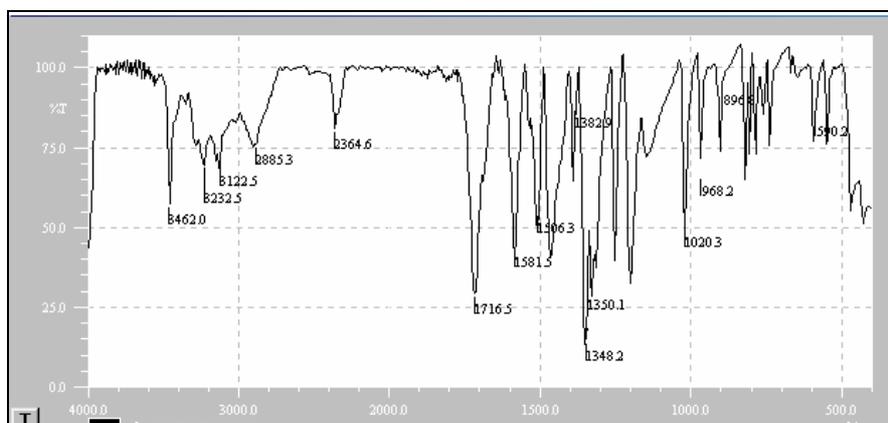
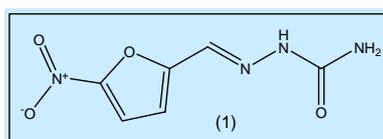


Figura 33: Espectro no infravermelho (KBr, ν cm^{-1}) do NF – composto (1).

Tabela 16: Análise no infravermelho e faixa de fusão do NF (1)



Grupamento	NF (cm^{-1}) Literatura (MILLS & ROBERSON)	NF (cm^{-1}) encontrado
Deformação axial N-H amida primária	---	3462 e 3232,5
Deformação axial $\text{C}=\text{O}$ de amida	1717	1716,5
Deformação. axial $\text{C}=\text{C}$ (anel furânico)	1583	1581,5
Deformação axial assimétrica de NO_2 aromática	---	1506,3
Deformação axial C-N amida		1382,9 (~1400)
Deformação simétrica de NO_2 aromática	1350	1348,2
Faixa de Fusão 222-232°C Dec 236-240°C (Merck, 1996)		

Na análise por espectroscopia de massas do NFOH o íon molecular respectivo aparece em $m/z = 246,12$, referente à fragmentação $[\text{NFOH}+\text{NH}_4]^+$ confirmando a presença do grupo hidroximetilado, também representado na fragmentação $m/z = 210,94$, conforme figura 34. O espectro de massas do NFOH pode ser comparado ao do produto de partida, o NF, o qual possui seu íon molecular em $m/z = 216$, referente a fragmentação $[\text{NF}+\text{NH}_4]^+$, conforme apresentado no figura 34.

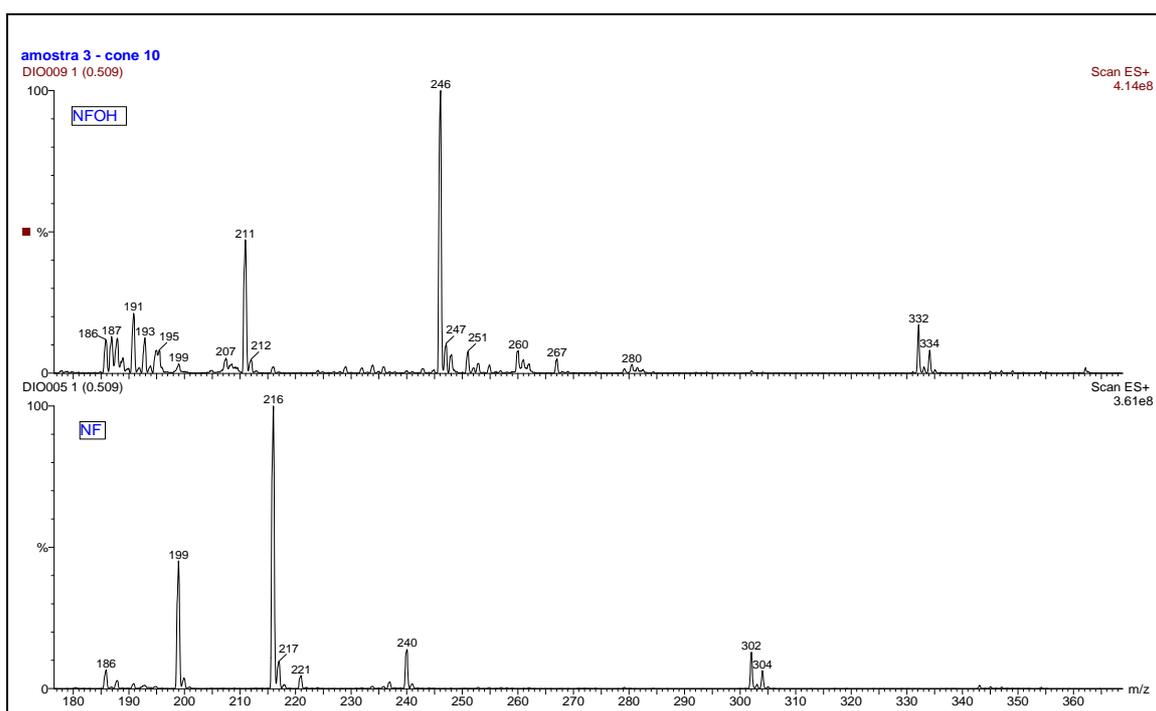
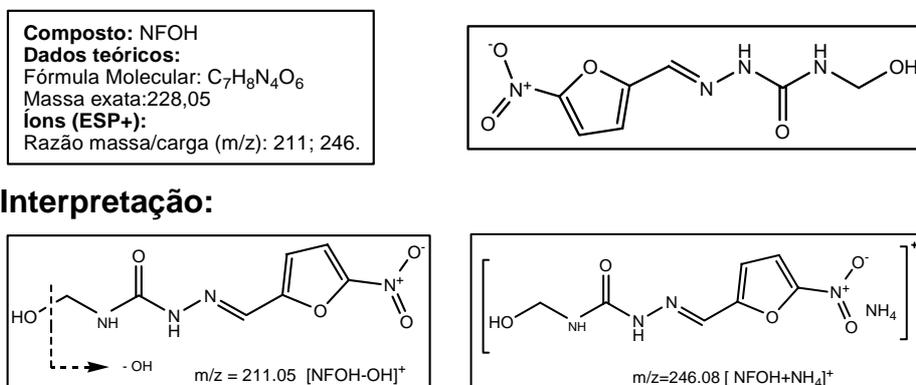


Figura 34: Espectros de massas (m/z) do derivado hidroximetilado do nitrofural (NFOH) e do nitrofural (NF).



Esquema 20: Interpretação do figura 33 (m/z) do derivado NFOH.

As análises por RMN ^1H e RMN ^{13}C (figuras 35 e 36 e tabela 17), respectivamente, também confirmaram a síntese do derivado hidroximetilado.

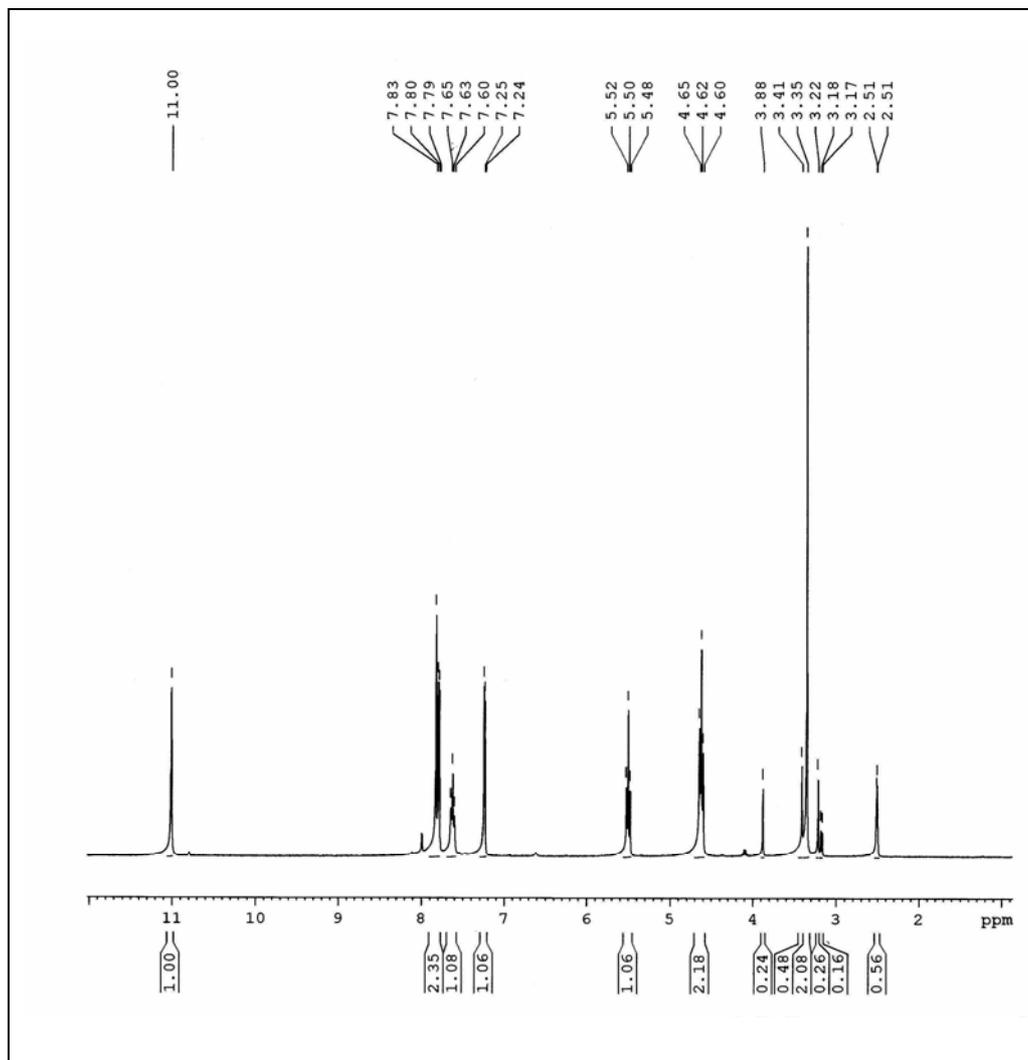


Figura 35: Espectro de RMN ^1H do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH) (DMSO-d_6 , 300 MHz).

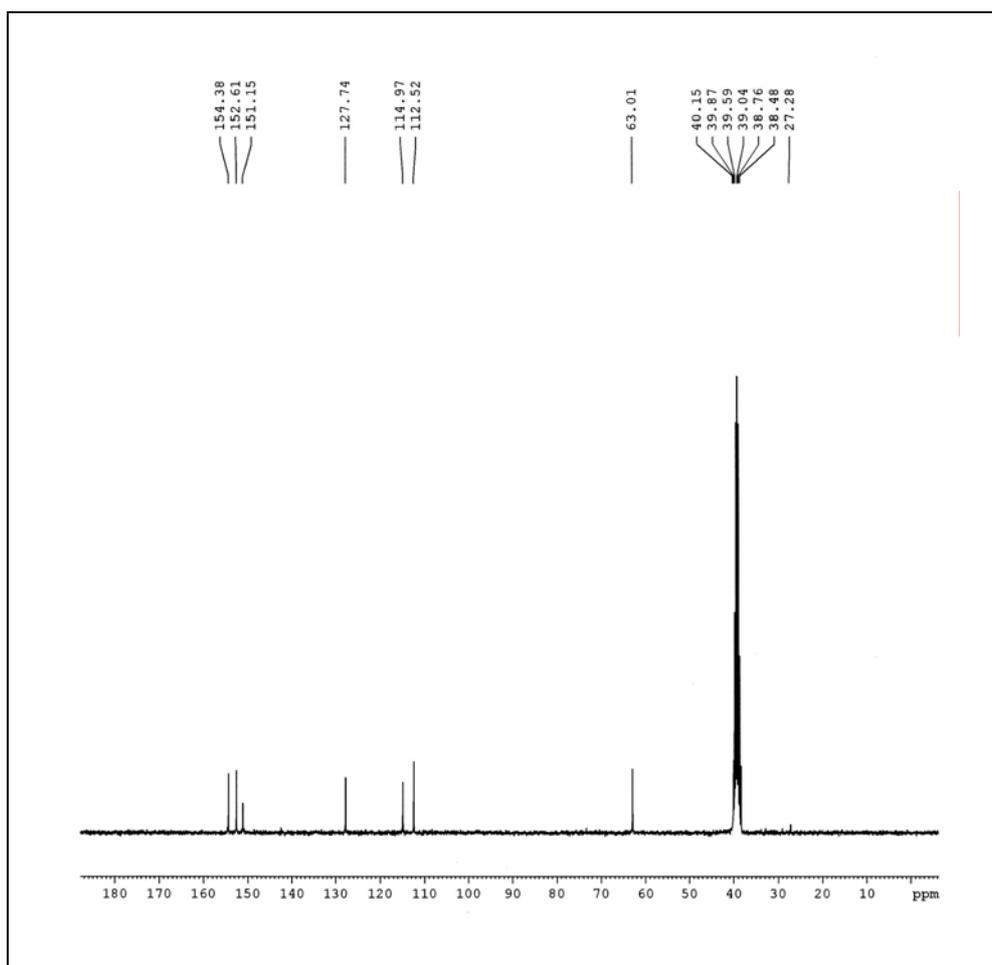
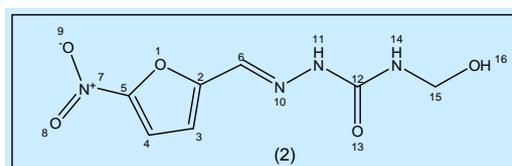


Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH) (DMSO-d_6 , 75 MHz).

Tabela 17: Atribuições de RMN ^1H e de RMN ^{13}C do NFOH.



RMN ^1H (DMSO-d_6), 300 MHz	RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz
δ (ppm) = 4,62 (t, J=6 Hz, 2H, H ₁₅); 5,5 (t, J=6 Hz, 1H, H ₁₆); 7,24 (d, J=3 Hz, 1H, H ₃); 7,63 (t, J= 6 Hz, 1H, H ₁₄); 7,80 (d, J= 3 Hz, 1H, H ₄); 7,83 (s, 1H, H ₆); 11,00 (s, 1H, H ₁₁)	δ (ppm) = 63,0 (C ₁₅); 112,5 (C ₄); 115 (C ₃); 127,7 (C ₆); 151,1 (C ₂); 152,6 (C ₅); 154,4 (C ₁₂)

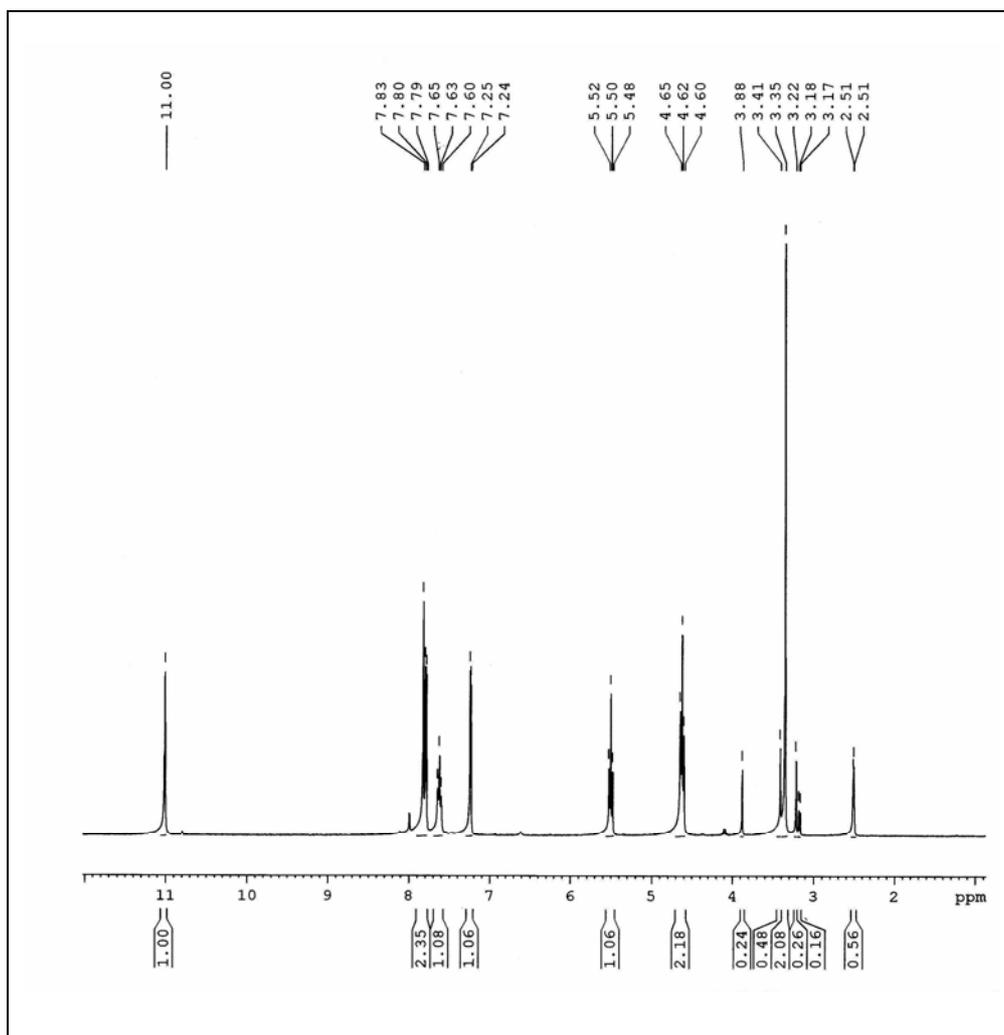


Figura 37: Espectro de RMN ^1H do nitrofural (NF) (DMSO-d_6 , 300 MHz).

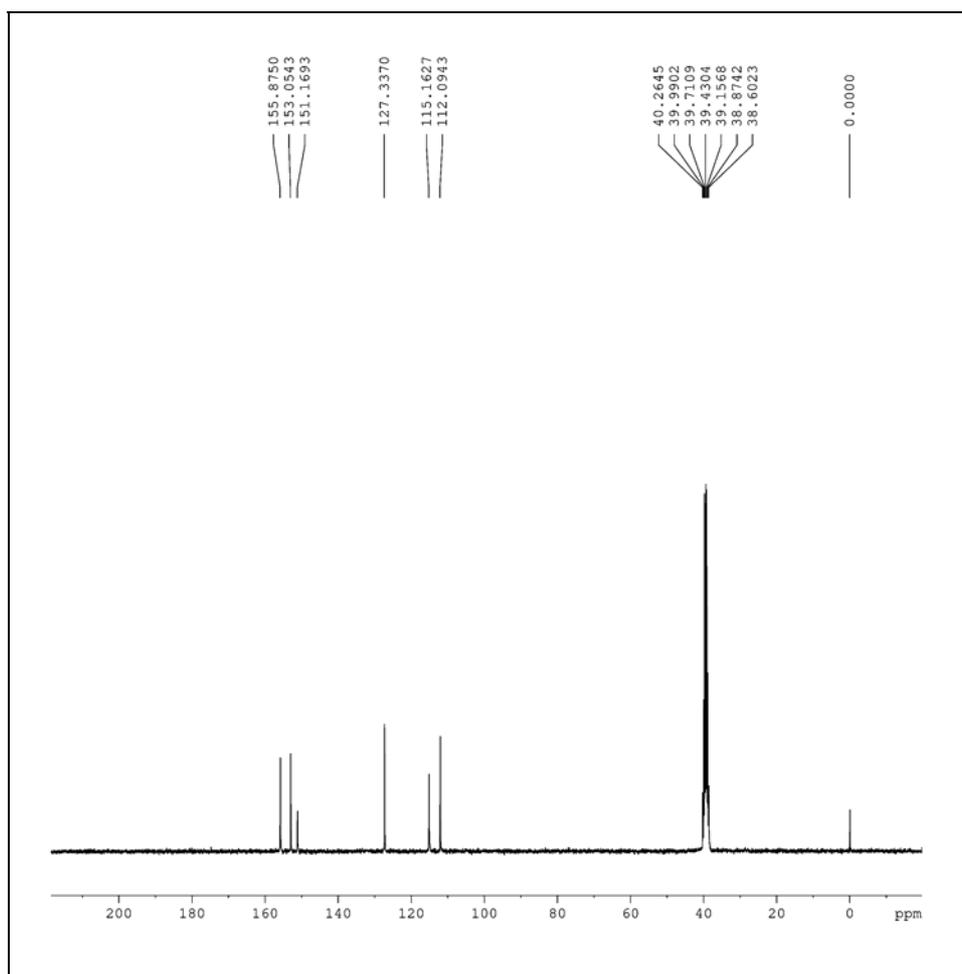
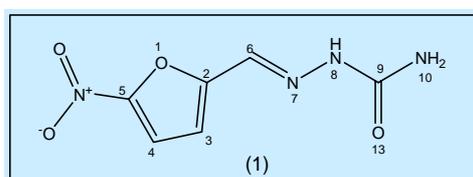


Figura 38: Espectro de RMN ^{13}C do nitrofural (NF), (DMSO- d_6 - 75 MHz).

Tabela 18: Atribuições de RMN ^1H e de RMN ^{13}C do NF (1).



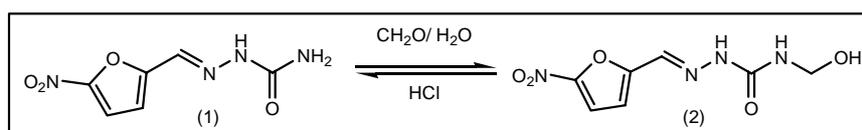
RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz

δ (ppm) = 6,63 (s, 2H, H_{10});
7,24 (d, $J = 3$ Hz, 1H, H_3); 7,79 (d, 1H, H_4);
7,81 (s, 1H, H_6); 10,81 (s, 1H, H_8)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 75 MHz

δ (ppm) = 112,1 (C_4); 115,1 (C_3);
127,3 (C_6); 151,1 (C_2); 153,1 (C_5);
155,2 (C_9)

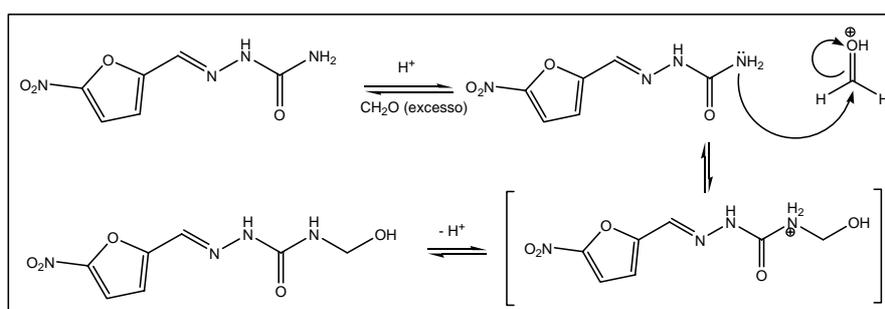
No **experimento 3**, segundo metodologia descrita por CHUNG (1996), utilizou-se nitrofural (NF) em meio ácido com pH entre 4 e 5, conforme esquema 21. A reação foi acompanhada por CCD, observando-se uma mancha referente ao derivado hidroximetilado com $R_f = 0,63$. O composto final mostrou-se totalmente solubilizado no meio reacional mesmo modificando-se drasticamente o pH da reação, de pH 4 para pH 12.



Esquema 21: Síntese do derivado NFOH em meio ácido (CHUNG, 1996) – experimento 3.

A introdução do grupo hidroximetil confere maior polaridade ao produto (CHUNG et al., 2003), acarretando, portanto, um R_f menor, como já visto nos **experimentos 1 e 2**.

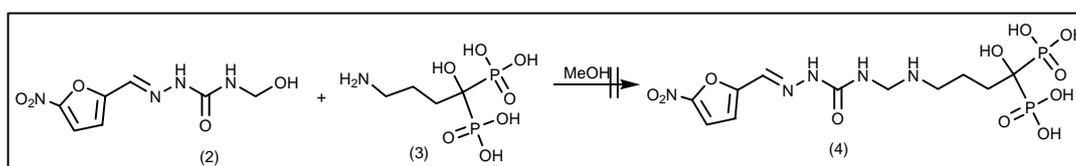
O esquema 22 mostra o possível mecanismo de reação para formação do derivado de nitrofural hidroximetilado em meio ácido.



Esquema 22: Mecanismo da reação do derivado hidroximetilado em meio ácido.

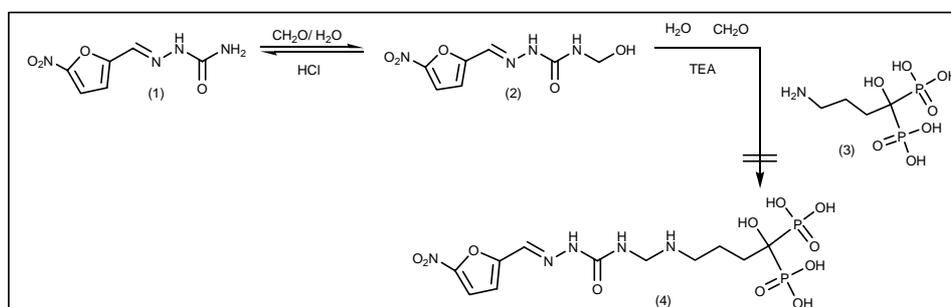
5.1.2. Tentativa de síntese da base de Mannich a partir do nitrofural hidroximetilado e alendronato de sódio

A partir do composto derivado hidroximetilado em meio básico obtido no **experimento 1** tentou-se, no **experimento 4**, esquema 23 a reação de obtenção da base de Mannich (adaptação de estudos de TROSSINI, 2004), NFOH-AL - composto (4) sem mudanças no pH do meio reacional, conforme o esquema 24. A reação foi acompanhada por CCD, observando-se a formação de mancha característica ao produto de partida NFOH. Houve dificuldade na análise do alendronato de sódio (AL) por CCD devido à sua alta polaridade. A faixa de fusão do composto obtido foi 180,4-186,2 °C. A análise no infravermelho não comprovou a formação do produto desejado.



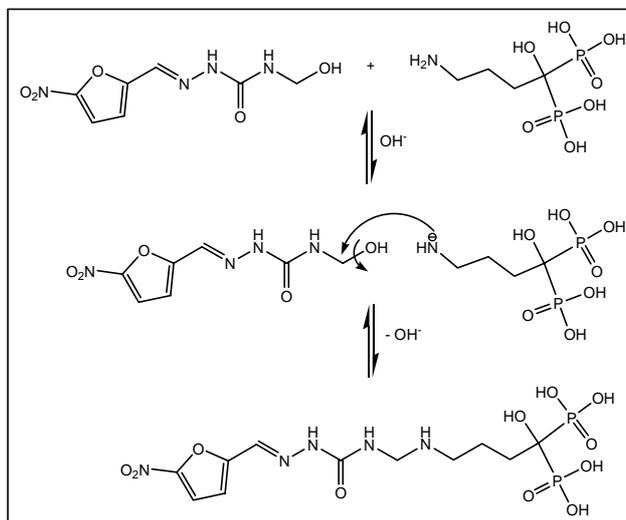
Esquema 23: Tentativa de síntese da base de Mannich NFOH-AL – experimento 4.

No **experimento 5** reagiu-se primeiramente o NF com formaldeído em meio ácido, na tentativa de se obter o derivado hidroximetilado, posteriormente ajustou-se o pH 5 e 6 com trietilamina e adicionou-se o alendronato de sódio (AL), conforme esquema 24.



Esquema 24: Tentativa de síntese da base de Mannich NFOH-AL – experimento 5.

Com o aumento do pH, esperava-se evitar a protonização da amina primária do AL facilitando o ataque nucleofílico do AL ao NFOH. Segue o esquema proposto para o mecanismo de reação para a síntese da base de Mannich, composto 4.



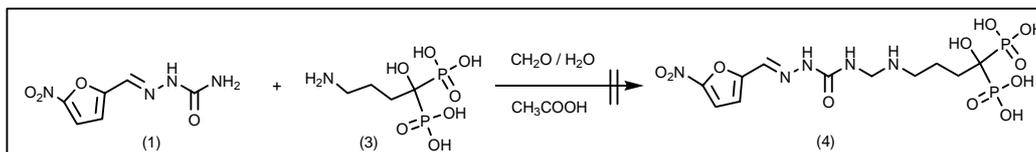
Esquema 25: Mecanismo proposto para a reação de síntese de base de Mannich NFOH – alendronato de sódio em meio básico.

A grande dificuldade encontrada é que, sendo os hidrogênios das hidroxilas mais ácidos, em meio básico, o ataque aos hidrogênios da amina ocorreria após o ataque aos outros hidrogênios das OH das duas moléculas, o que dificultaria a saída da hidroxila do NFOH para a formação da ligação da base de Mannich. Por isso, a derivatização do NFOH seria algo interessante a ser feito, facilitando sua ligação ao AL.

A reação foi acompanhada por CCD observando-se o aparecimento de duas manchas, uma referente ao produto de partida, e outra rastreada, não sendo conclusiva para a análise do produto formado. Esta reação não apresentou nenhum precipitado, o sobrenadante foi colocado no rotaevaporador onde foi contaminado e descartado.

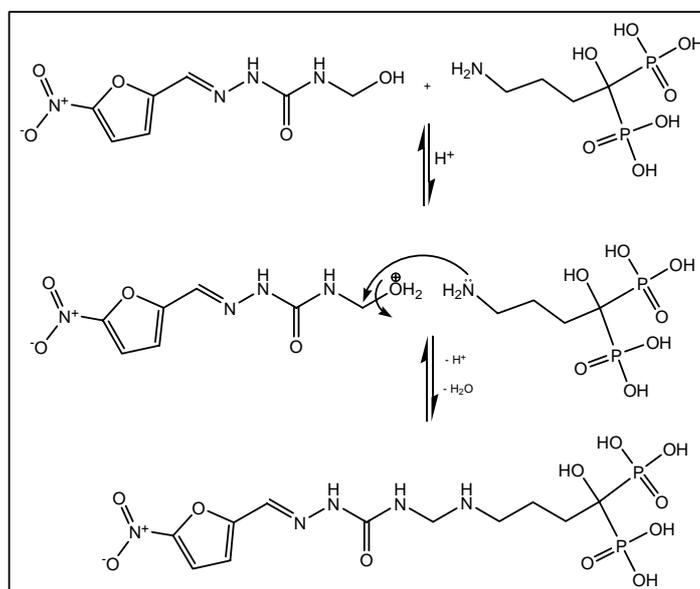
No **experimento 6**, esquema 26 procedeu-se a reação utilizando-se quantidades equimolares de NF e alendronato de sódio (AL), com excesso de CH₂O em meio ácido. A reação foi feita *one pot*, em meio ácido. Observou-se apenas o aparecimento de mancha com R_f = 0,82, característica do NF. A

faixa de fusão do composto obtido foi 220-230,7 °C. Sugere-se que seja uma mistura física dos produtos de partida, já que o ponto de fusão obtido para esta mistura foi 222,9°C.



Esquema 26: Tentativa de síntese da base de Mannich NF-AL – experimento 6.

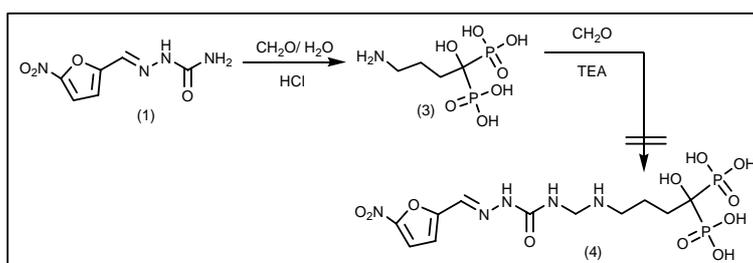
De acordo com o mecanismo de reação proposto para a síntese da base de Mannich, que tem como estrutura geral R-CH₂-N, em meio ácido observa-se a protonização tanto da amina do AL quanto da hidroxila do derivado hidroximetilado, o que desfavorece a reação, em especial porque, sendo este um processo dinâmico, ambas as espécies poderão estar protonadas ou não, posto que a formação da base ocorra quando a amina está na forma molecular e a hidroxila protonada. Segue no esquema 27 o mecanismo proposto para esta reação.



Esquema 27: Mecanismo proposto para reação de síntese da base de Mannich de NFOH - alendronato de sódio em meio ácido.

Realizaram-se análises no infravermelho, tanto para o precipitado quanto para o líquido, não confirmando a formação do produto.

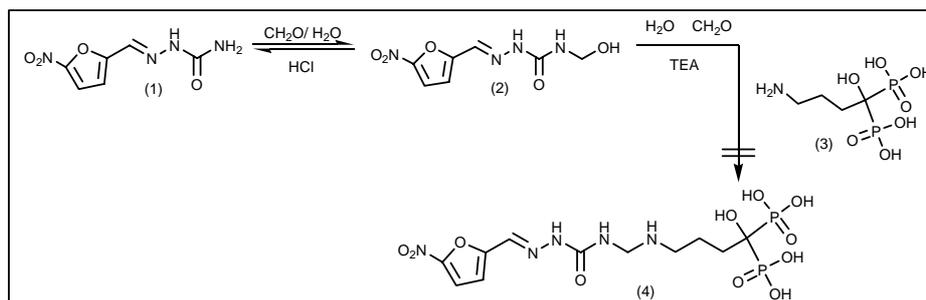
Em outra tentativa da síntese desta base de Mannich, no **experimento 7** (esquema 28), optou-se pela reação em meio inicialmente ácido, sendo o pH posteriormente ajustado com TEA.



Esquema 28: Tentativa de síntese da base de Mannich NFOH-AL – experimento 7.

A reação foi acompanhada por CCD observando-se o aparecimento de duas manchas, uma com $R_f = 0,83$ referente ao NF e outra no ponto de aplicação. O AL não se deslocou novamente do ponto de aplicação na fase estacionária, observando-se assim uma mancha rosada no local. Realizou-se análise no infravermelho, tanto para o precipitado quanto para o líquido não confirmando a formação do produto.

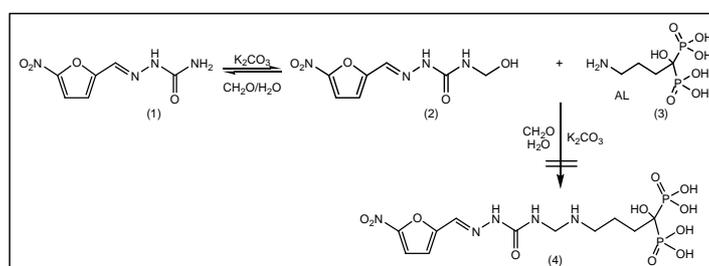
No **experimento 8** a reação foi feita *one pot*, em meio inicialmente ácido sendo o pH posteriormente ajustado para pH 12. Obteve-se a formação do derivado NFOH *in situ*, em meio ácido. A reação foi acompanhada por CCD observando-se a formação de duas manchas, uma referente ao produto de partida (NF) com $R_f = 0,82$ e outra referente ao derivado hidroximetilado, com $R_f = 0,63$. O AL foi adicionado e o pH da reação reajustado para pH 12. A adição da base gerou liberação de calor (reação exotérmica) e o produto degradou, apresentando coloração marrom escuro. Repetiu-se o experimento em banho de gelo, adicionando-se a base gota a gota, no **experimento 9**, conforme esquema 29.



Esquema 29: Tentativa de síntese da base de Mannich NFOH-AL – experimentos 8 e 9.

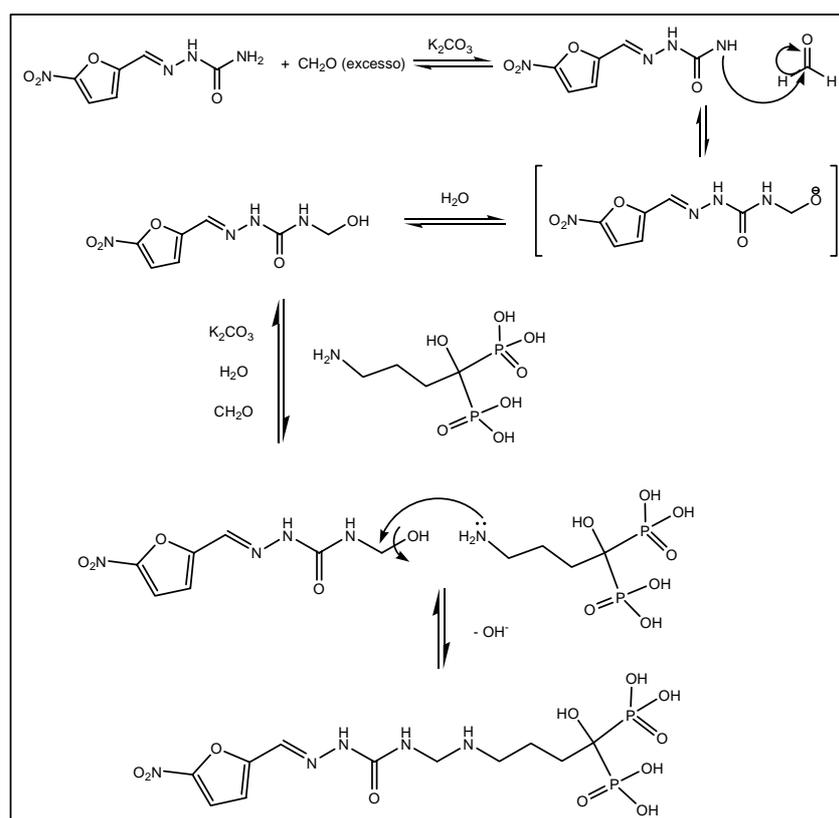
Obteve-se o NFOH, a reação foi acompanhada por CCD observando-se apenas o aparecimento de mancha amarela, com $R_f = 0,83$ referente ao NF. Apesar da primeira etapa da reação apresentar resultado positivo, indicando a presença do derivado hidroximetilado, ao final, observou-se apenas a presença do produto de partida NF. A mudança drástica do pH do meio reacional pode ter acarretado a hidrólise do NFOH, degradando-o e regenerando os compostos de partida.

No **experimento 10** (esquema 30), partiu-se do NF obtendo-se o NFOH *in situ*, em meio básico, sendo a reação acompanhada por CCD observando-se a formação de duas manchas, uma referente ao produto de partida (NF) com $R_f = 0,83$ e outra referente ao derivado hidroximetilado, com $R_f = 0,64$. O AL foi adicionado ao meio, mantendo-se o pH entre 9 e 10, na presença de carbonato de potássio e excesso de formaldeído.



Esquema 30: Tentativa de síntese da base de Mannich NFOH-AL – experimento 10.

Este meio reacional visou manter o equilíbrio de formação do derivado NFOH, evitando-se sua degradação a NF, e manter um valor de pH suficiente para favorecer a forma molecular da amina primária do alendronato, visto que seu pKa é de 9,81 (PALLAS, 1994,95), conforme mecanismo de reação proposto (esquema 31).



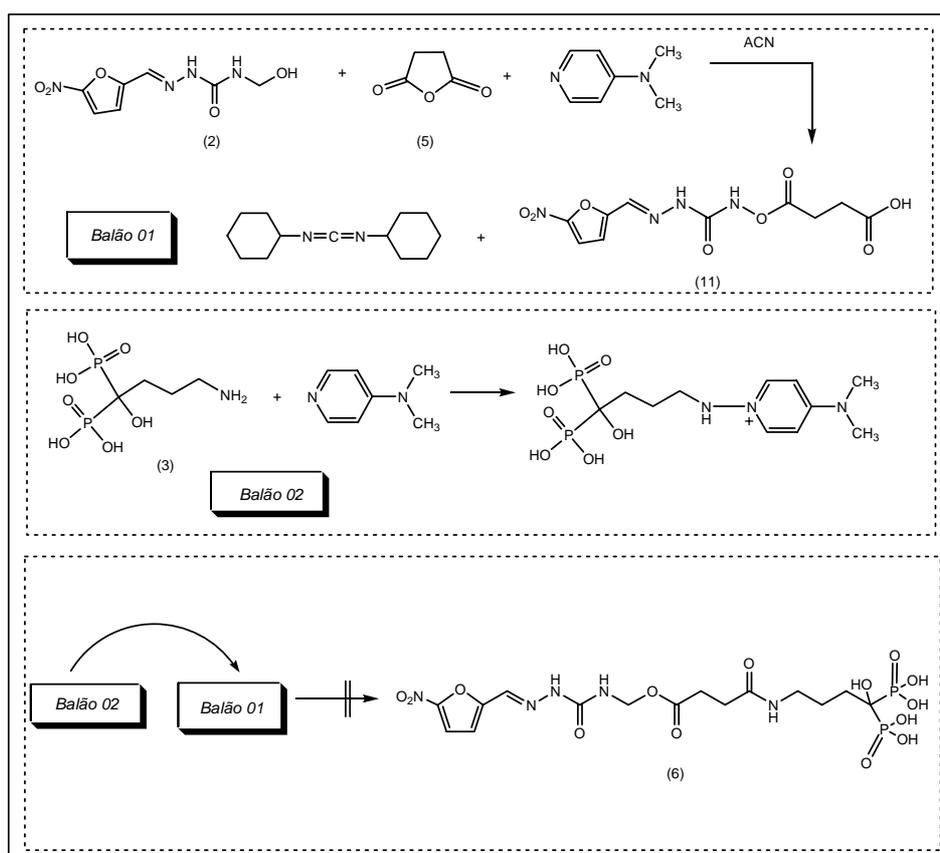
Esquema 31: Mecanismo proposto para reação de síntese da base de Mannich - composto 4, em meio básico.

A reação foi acompanhada por CCD, observando-se duas manchas, uma referente ao NFOH com $R_f = 0,64$ e outra rastreada. Visualizou-se o AL como uma mancha rosada no ponto de aplicação, com o revelador ninhidrina. O filtrado foi submetido à análise de espectroscopia de massas não confirmando que o produto desejado não se formou.

5.1.3. Tentativa de síntese do pró-fármaco nitrofural hidroximetilado – anidrido succínico - alendronato de sódio

Na tentativa de síntese do pró-fármaco recíproco NFOH-AL, optou-se, também, pela reação destes dois compostos tendo um ácido dicarboxílico como grupo espaçante. Para tanto, empregou-se o anidrido correspondente, já que estes são compostos bem reativos.

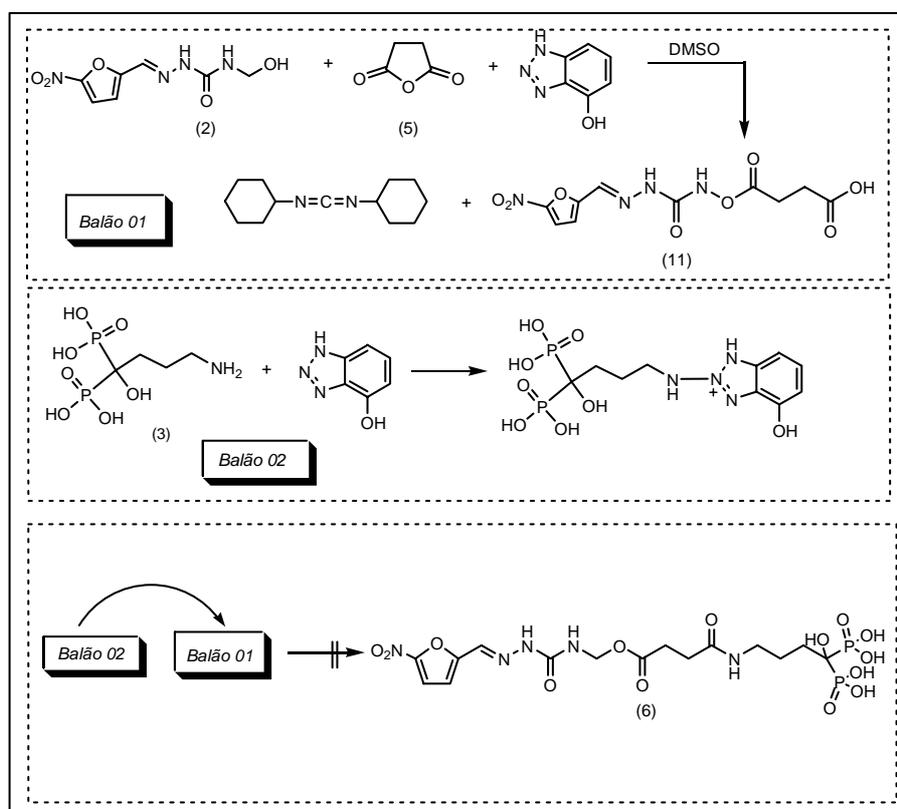
No **experimento 11** (esquema 32) utilizou-se 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) e dicicloexilcarbodiimida (DCC). O primeiro age como catalisador básico, característico por ativar nucleófilos, neste caso a hidroxila (-OH) do NFOH e a amina (-NH₂) do AL; o segundo, um agente acoplante, age como condensante, ativando as carbonilas do anidrido succínico. A reação foi acompanhada por CCD, observando-se uma mancha referente ao produto de partida (NFOH), com R_f = 0,65.



Esquema 32: Tentativa de síntese do pró-fármaco NFOH-ácido succínico-AL – experimento 11.

Observou-se depois de 24 horas um precipitado no sobrenadante, que com auxílio do espectro de IV identificou-se como sendo DCU (dicicloexiluréia) subproduto da reação formado a partir do DCC. Os produtos da reação foram analisados no infravermelho não comprovando a formação do produto desejado.

Na segunda tentativa para a síntese do pró-fármaco recíproco contendo o anidrido como grupo espaçante, utilizou-se do hidroxibenzotriazol (HOBt) como catalisador (**experimento 12**), conforme esquema 33.



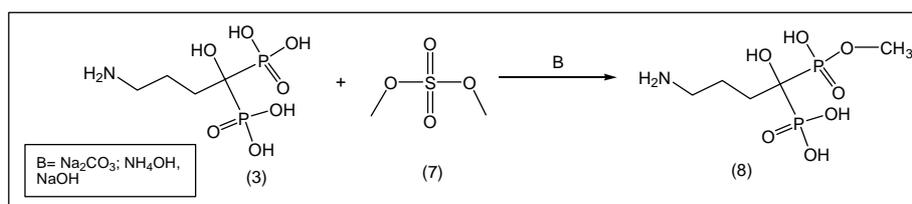
Esquema 33: Tentativa de síntese do pró-fármaco NFOH-ácido succínico-AL – experimento 12.

Ao término da reação, a suspensão obtida foi filtrada, o precipitado e o sobrenadante foram analisados por CCD, infravermelho e por espectroscopia de massas. A partir dos resultados obtidos com estas análises, sugere-se apenas mistura dos compostos de partida, sem a formação do produto desejado.

5.1.4. Síntese do intermediário esterificado de alendronato de sódio

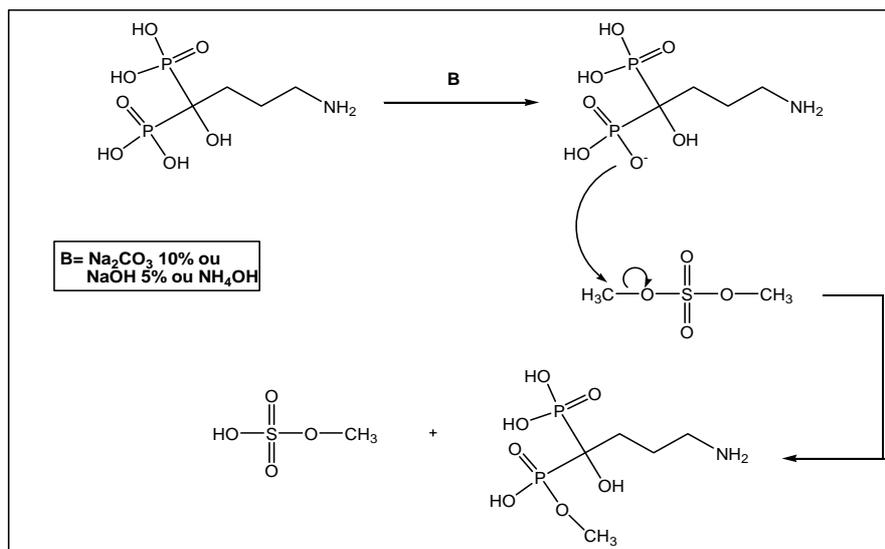
De acordo com os experimentos realizados anteriormente e as dificuldades encontradas ao se reagir o AL e o NFOH, optou-se por derivatizar as hidroxilas pertencentes aos grupos fosfato através de uma reação de esterificação, com intuito de diminuir a polaridade da molécula, conseqüentemente aumentar sua lipossolubilidade e o respectivo log P (VEPSLAINEN, 2002), eliminando estes possíveis pontos de ligação, já que em cada grupo fosfato existem duas hidroxilas livres. A eliminação de um ou mais de seus grupos ionizáveis pode ser feita mascarando-os com grupos funcionais biorreversíveis (VEPSLAINEN, 2002).

Optou-se por uma reação de esterificação, utilizando-se alendronato de sódio e um agente de metilação, sulfato de dimetila (DMS), na presença de uma base, conforme esquema 34.



Esquema 34: Síntese do derivado esterificado de AL.

A base tem como função manter o pH entre 9-10, deixando assim as hidroxilas dos grupos fosfato desprotonadas, permitindo o ataque ao DMS. Segue o mecanismo proposto para esta reação, esquema 35.



Esquema 35: Mecanismo proposto para a reação de esterificação do alendronato em meio básico.

Mantendo-se o pH entre 9 e 10, o ataque do DMS permanece contínuo, facilitando o processo de esterificação e possivelmente obtendo-se um aumento no rendimento químico.

Através das análises por espectroscopia de massas para o **experimento 15**, observou-se a metilação nas hidroxilas dos grupos fosfato, conforme mostra a figura 39, nas regiões de razão $m/z = 262,03$, $276,00$, $291,01$ e $303,95$, de acordo com o número de metilações AL-CH_3 ; $\text{AL-(CH}_3)_2$; $\text{AL-(CH}_3)_3$ e $\text{AL-(CH}_3)_4$, respectivamente. Seguem abaixo os espectros de massas do alendronato de sódio metilado, do alendronato de sódio e a interpretação do primeiro, figuras 39 e 40 e esquema 36.

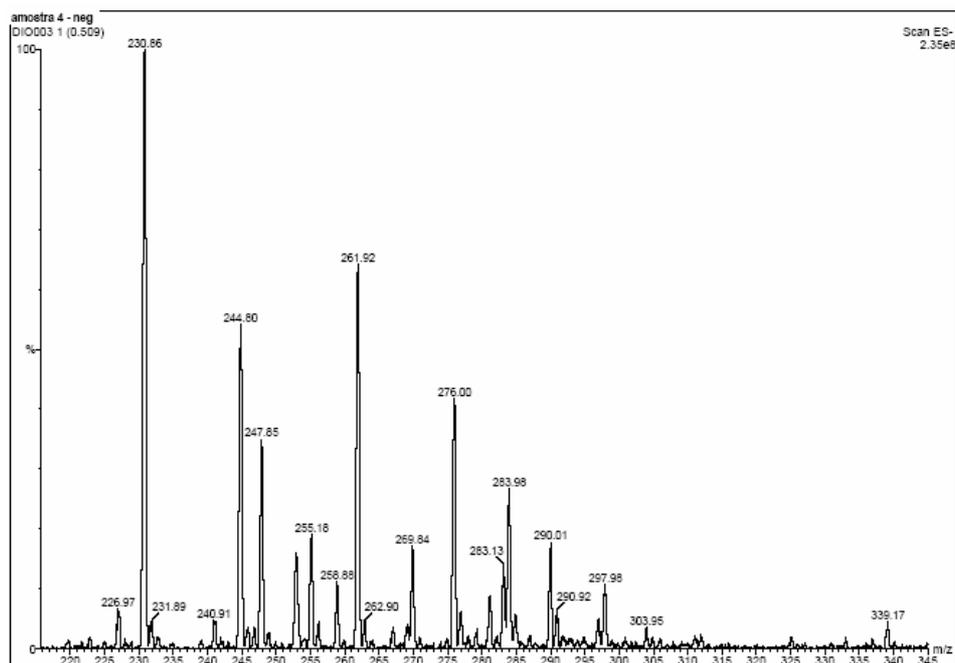


Figura 39: Espectro de massas (m/z) do alendronato metilado (8).

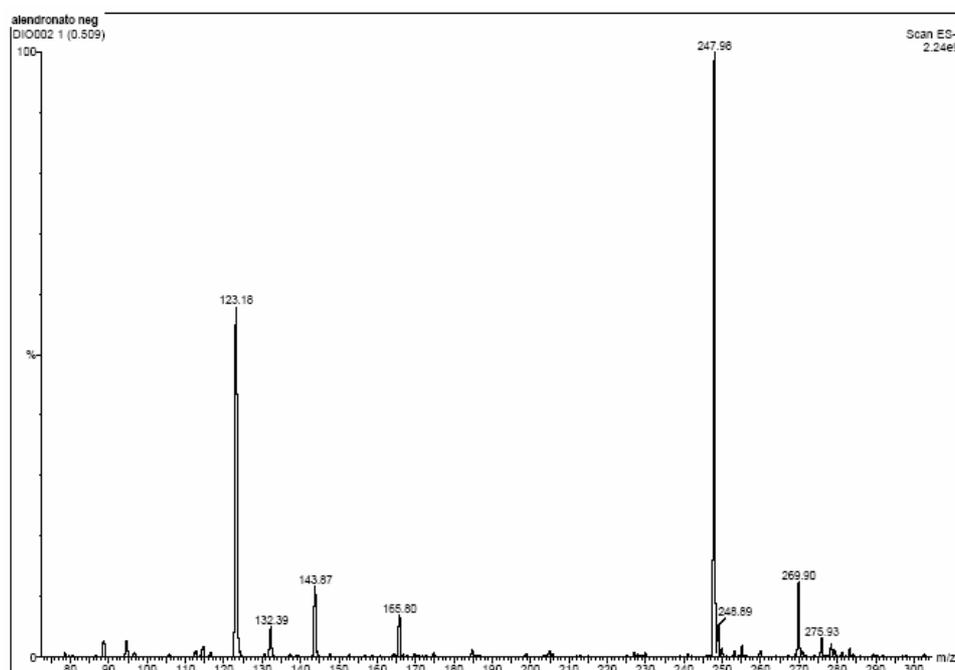
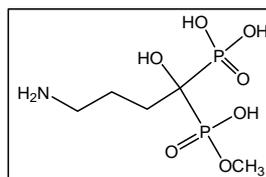
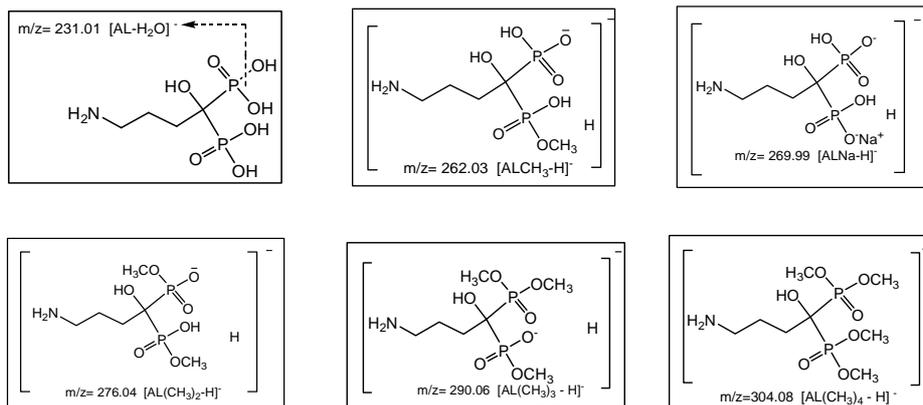


Figura 40: Espectro de massas (m/z) do alendronato de sódio (3).

Composto: Alendronato de sódio metilado
Dados teóricos:
 Fórmula Molecular: $C_5H_{15}NO_7P_2$
 Massa exata: 263,03
Ions Encontrados (ESP-):
 Razão massa/carga [m/z]: 230.86; 261.92;
 269.84; 276; 283.98; 291.01; 303.95.

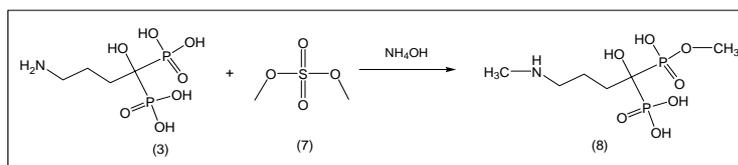


Interpretação:



Esquema 36: Interpretação da figura 39 (m/z) do alendronato de sódio metilado (8).

Porém, graças às análises de RMN 1H , (figura 43, tabela 20) observa-se que além da metilação ocorrer na hidroxila do grupamento fosfato, ocorreu também na amina primária da molécula, como mostrado no esquema 37.



Esquema 37: Síntese do derivado metilado de AL – experimento 15.

Este fato foi comprovado pela presença de um duplete (d), em 3,52 ppm, com constante de acoplamento de $J = 9$ Hz, referente a uma metila acoplado com grupo fosfato (SILVERSTEIN, 2000). Este fato inviabiliza a utilização deste método, no entanto, a observação de que o valor de pH entre 9

e 12 favorece a derivatização da amina primária, oferece subsídios para uma nova proposta de reação do pró-fármaco recíproco NFOH-AL.

A seguir estão apresentados os espectros de RMN ^1H e de ^{13}C para o composto de partida AL (3) e o RMN ^1H para produto da reação obtido no **experimento 15** (composto 8), AL-metilado.

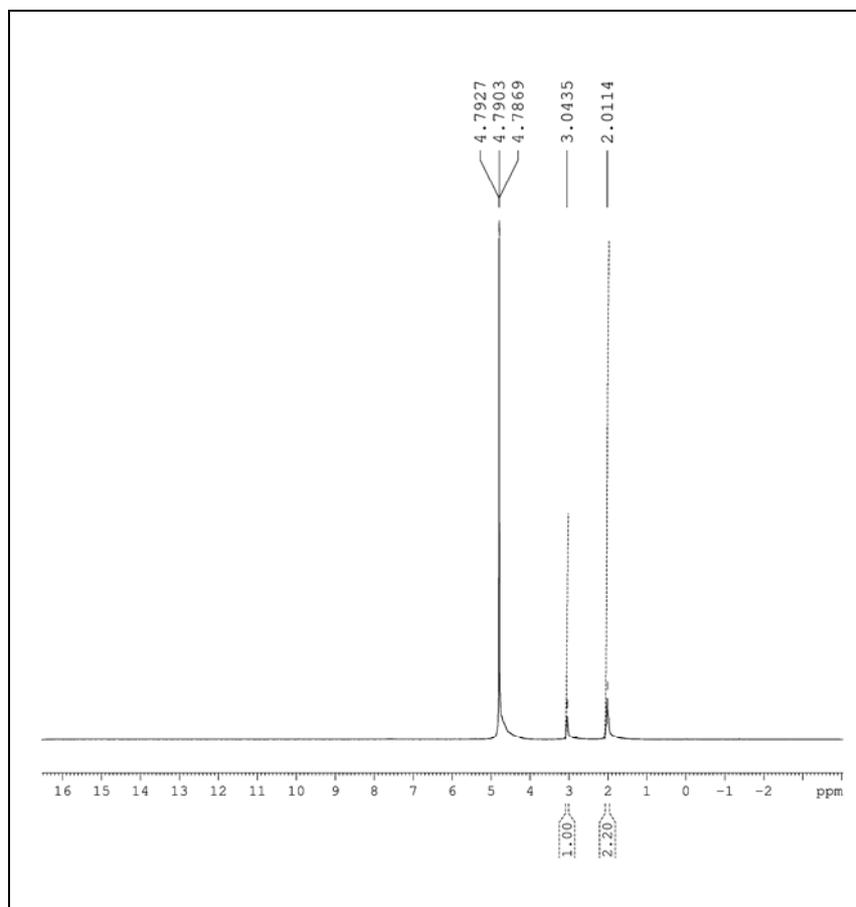


Figura 41: Espectro de RMN ^1H do alendronato de sódio (3) (D_2O – 300 MHz).

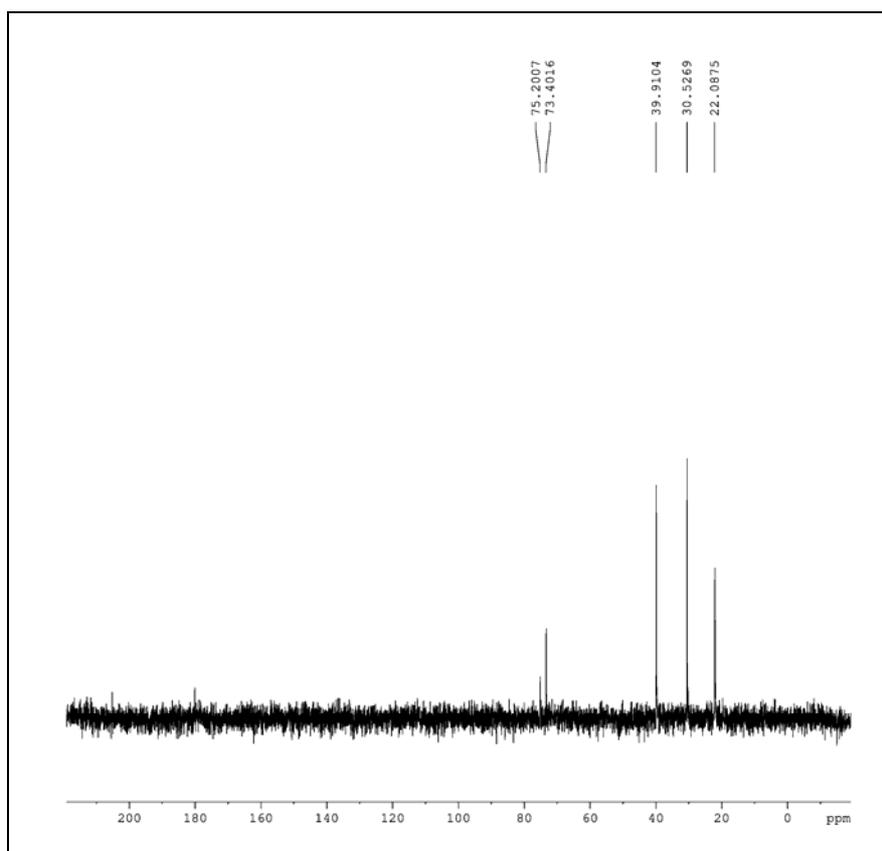
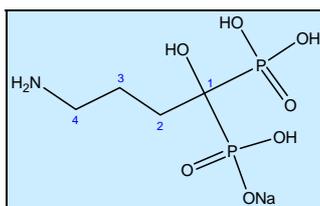


Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C do alendronato de sódio (3) (D_2O - 75 MHz).

Tabela 19: Atribuições de RMN ^1H e de RMN ^{13}C do alendronato de sódio (3).



RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}-d_6$), 300 MHz	RMN ^{13}C ($\text{D}_2\text{O}-d_6$), 75 MHz
δ (ppm) = 2,01 (s largo, 4H, H_2 e H_3); 3,04 (s largo, 2H, H_4).	δ (ppm) = 22,1 (C_3), 30,5 (C_2); 39,9 (C_4); 75.2 (t, J (C-P) = 135 Hz, C_1)

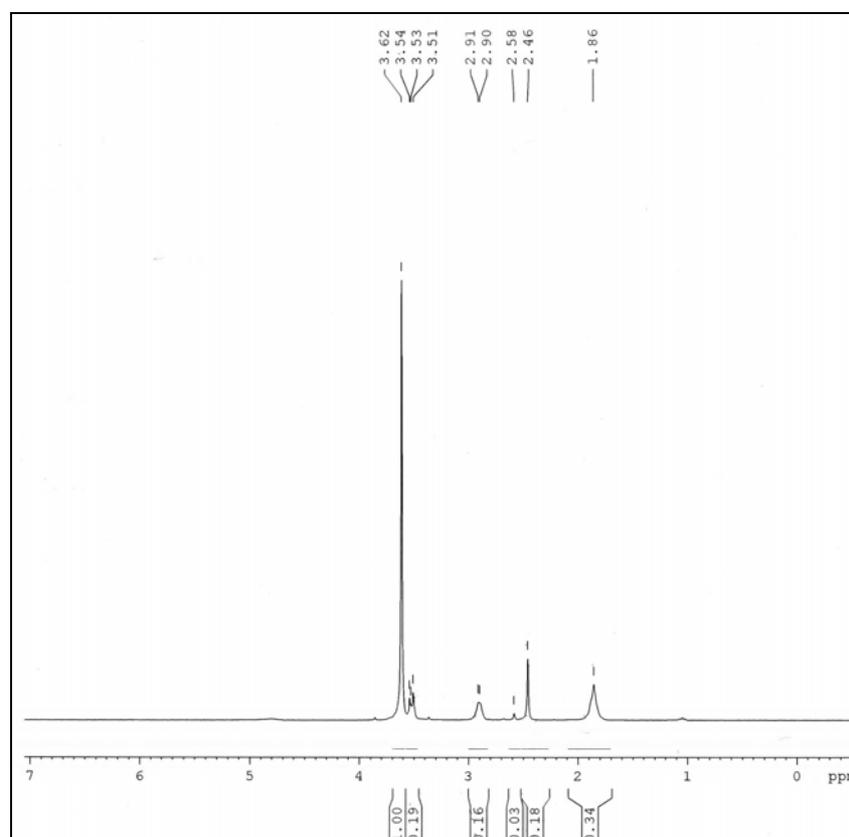
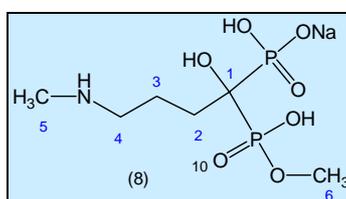


Figura 43: Espectro de RMN ^1H do alendronato de sódio metilado (8) (**experimento 15**) (D_2O – 300 MHz).

Tabela 20: Atribuições de RMN ^1H do produto obtido no **experimento 15**, composto AL-metilado (8).



RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}-d_6$), 300 MHz,

δ (ppm) = 1,86 (s largo, 4H, H_2 e H_3);
2,46 (s, 3H, H_5); 2,90 (s largo, 2H, H_4),
3,52 (d, $J = 9$ Hz, 3H, H_6).

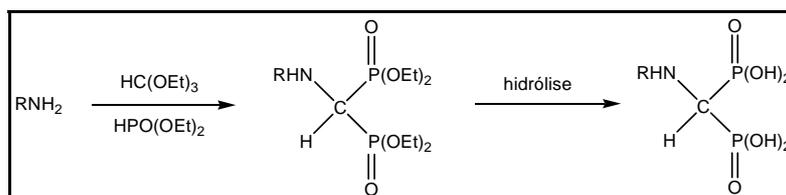
Observou-se, através das análises realizadas no infravermelho e de RMN ^1H para o **experimento 16**, que a reação não deve ser realizada a quente, devido à hidrólise do agente de metilação DMS (MERCK INDEX,1996), sensível a altas temperaturas.

No **experimento 17**, a reação foi feita em banho de ultrassom, na tentativa de otimizar seu tempo reacional. Houve dificuldade em homogeneizar os dois reagentes, AL e DMS, e as análises no infravermelho e espectroscopia de massas revelaram que a reação acontece, apresentando os mesmos resultados já mencionados no experimento 16.

No **experimento 18**, a tentativa de realizar a reação através de microondas foi descartada devido à carbonização do DMS.

Apesar da tentativa de esterificação do alendronato de sódio (AL) não ter logrado êxito, devido à metilação da amina primária inviabilizando a etapa seguinte de síntese, esta rota sintética forneceu subsídios para estudo e reconhecimento do composto, suas particularidades e características físico-químicas. Tais características, como alta polaridade, baixa e/ou nenhuma solubilidade em solventes orgânicos, grupos funcionais volumosos e de difícil acesso para derivatizações seletivas, entre outras características, estão agora elucidadas. Este reconhecimento foi de extrema valia para a elaboração de novas tentativas e rotas de síntese.

De acordo com a literatura, esterificações nestas hidroxilas são passíveis de acontecerem, porém, desde que a síntese da molécula seja refeita, deixando-se de realizar a etapa final de hidrólise, como, por exemplo, mostra o esquema 38 (GUITTENS et al., 2005).



Esquema 38: Rota de síntese de aminobifosfonato.

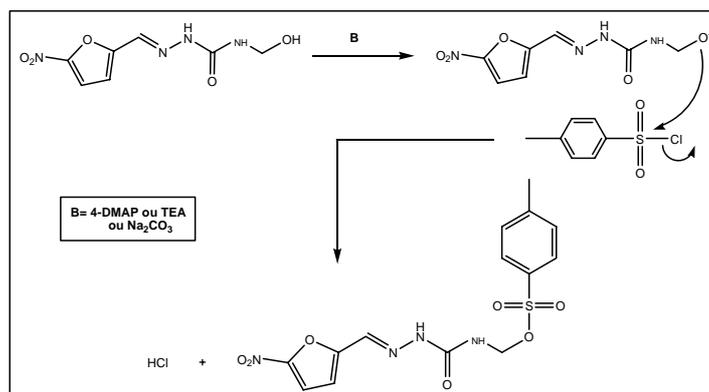
Fonte: GUITTENS et al. 2005.

A derivatização nos átomos próximos ao átomo de fósforo é dificultada devido ao impedimento estérico, sendo a modificação seletiva sinteticamente difícil (VEPSLAINEN, 2002).

5.1.5. Tentativa de síntese do derivado tosilado de nitrofural hidroximetilado

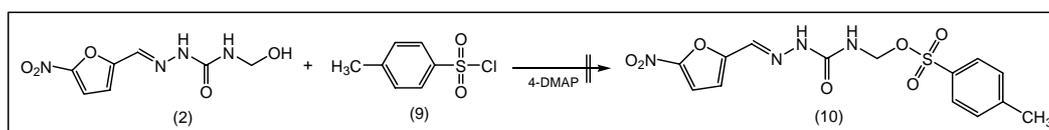
Diante das dificuldades encontradas nos experimentos testados ligando-se o derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH) diretamente ao alendronato de sódio (AL), optou-se também por modificar a molécula do NFOH, ligando-o ao cloreto de tosilato (Tos-Cl) na tentativa de melhorar o seu grupo de saída (SIMIAN et al., 2004; ZOU et al., 2005).

Os experimentos foram realizados em diversos solventes, visto a dificuldade em se solubilizar o NFOH. Reagiu-se o NFOH ao Tos-Cl na presença de uma base, 4-DMAP, TEA ou Na_2CO_3 , utilizadas com a função de desprotonar a hidroxila do NFOH permitindo a ligação ao Tos-Cl, como mostra o esquema 39.



Esquema 39: Mecanismo proposto para a reação de formação do derivado tosilado de NFOH em meio básico.

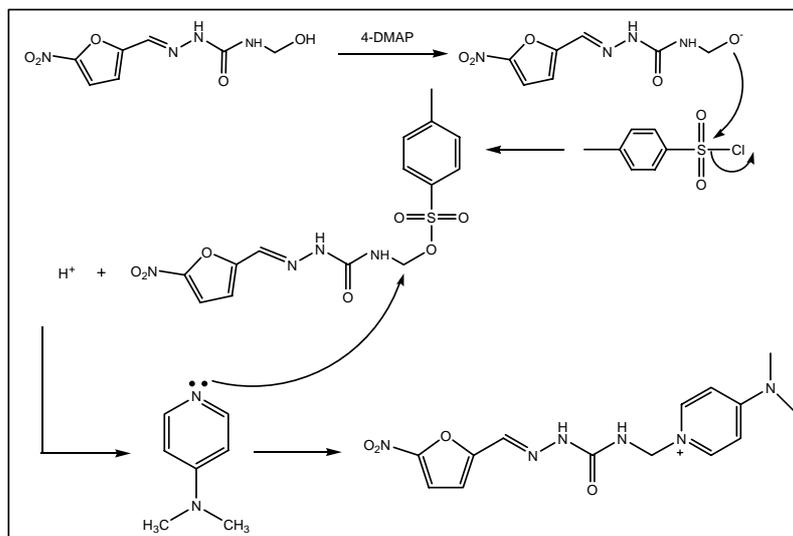
No **experimento 19**, reagiu-se o NFOH ao 4-DMAP adicionando-se o Tos-Cl a baixa temperatura.



Esquema 40: Tentativa de síntese do derivado tosilado de NFOH – experimento 19.

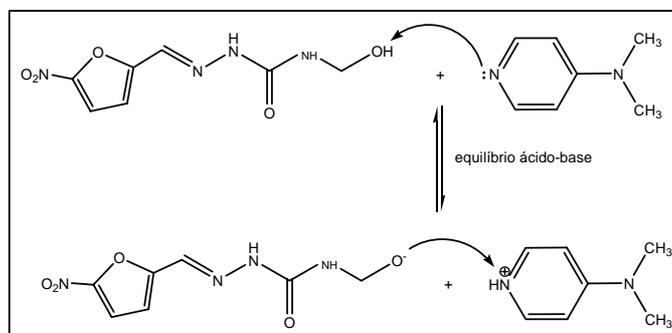
Observou-se através da espectroscopia de massas (figura 44, esquema 43) a formação de um derivado (NFCH₂DMAP) na região de razão $m/z = 333,20$. Este derivado formou-se devido ao fato de tanto o 4-DMAP quanto o (NFO⁻) terem característica de nucleófilos, e com a presença remanescente do 4-DMAP este promoveu a substituição do Tos-Cl.

Segue o esquema 41 com o mecanismo da reação de formação do derivado NFCH₂DMAP e o espectro de massas correspondente.



Esquema 41: Mecanismo da formação do derivado NFCH₂DMAP - experimento 19.

Há um equilíbrio ácido-base dinâmico entre os dois nucleófilos, o NFOH e o 4-DMAP, que pode ser observado no esquema abaixo.



Esquema 42: Mecanismo do equilíbrio ácido-base do NFOH e 4-DMAP - experimento 19.

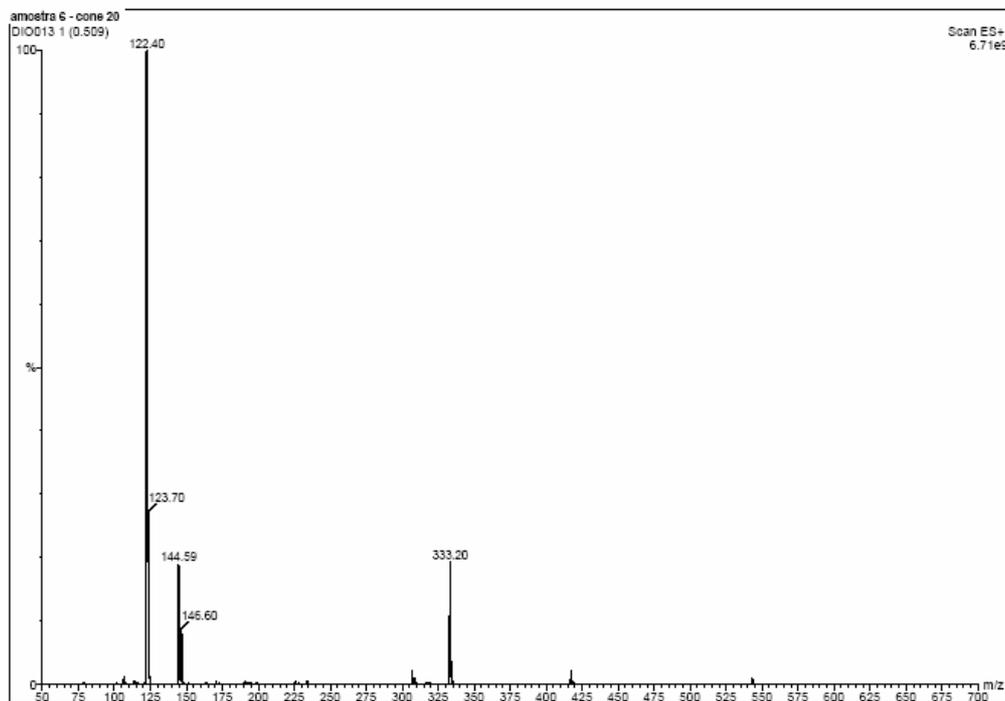
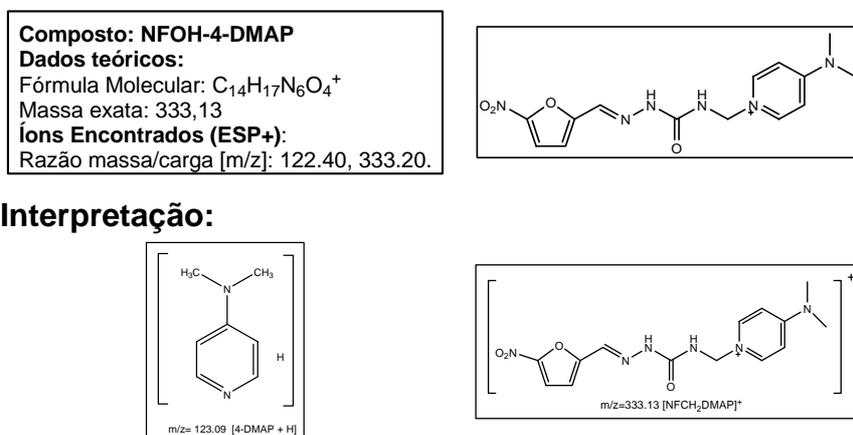


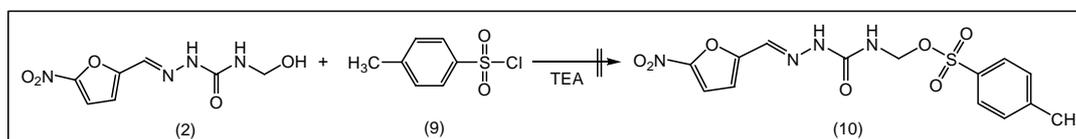
Figura 44: Espectro de massas (m/z) da tentativa de ligação NFOH-cloreto de tosila usando 4-DMAP como base (experimento 19).



Esquema 43: Interpretação da figura 44 (m/z) da tentativa de ligação NFOH-cloreto tosila.

Este fato confirma a hipótese de o derivado hidroximetilado reagir com o Tos-Cl, o que remete à viabilidade da derivatização, devendo ser melhor adequado em relação ao uso da base.

Por esta razão, para os **experimentos 20** e **21** utilizou-se como base a trietilamina (TEA), um nucleófilo fraco por ser estericamente impedido. No entanto, as análises realizadas por espectroscopia de massas e por RMN ^1H não confirmaram a síntese do produto.

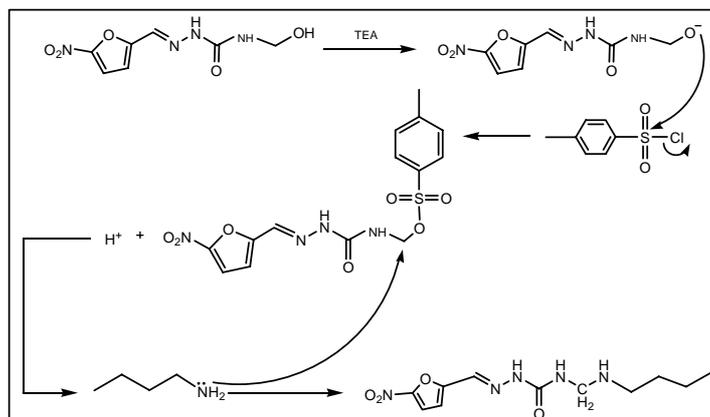


Esquema 44: Tentativa de síntese do derivado NFOH-tosila – experimento 20.

Para os experimentos seguintes, testaram-se diversos sistemas solventes na tentativa de melhorar a solubilização do NFOH, e outras bases para manter o meio básico. As tentativas também não foram bem sucedidas e as reações não aconteceram. Observou-se nas análises de CCD realizadas, a presença do composto de partida (NFOH), sua degradação e o aparecimento do NF, provavelmente devido à instabilidade do derivado hidroximetilado em mudanças de pH. Para todos os experimentos, realizaram-se análises por espectroscopia de massas, as quais não confirmaram a formação do produto desejado.

Apesar de as reações ainda não terem logrado êxito, estudos confirmam que o cloreto de tosilato é um bom grupo abandonador e vem sendo utilizado com sucesso (SIMIAN et al., 2004; TERANISHI, 2002; ZOU et al., 2005). Esses estudos sugerem que a tosilatação seja feita em temperaturas baixas, em meio básico e de preferência na presença de TEA devido à geração de HCl durante a tosilatação. A ausência da TEA pode gerar um meio ácido capaz de degradar o próprio NFOH. O produto desta neutralização é o $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ (ZOU et al., 2005).

No **experimento 26**, após 4 horas de reação, adicionou-se 1 mmol de butilamina.



Esquema 45: Mecanismo da formação do derivado $\text{NFCH}_2\text{ButNH}_2$ – experimento 26.

Esta adição teve como objetivo verificar se o NFOH poderia reagir com a butilamina, assim como ocorreu no **experimento 19**, quando houve a formação do derivado $\text{NFCH}_2\text{-DMAP}$ (esquema 41, esquema 46). A ligação entre o NFOH e a ButNH_2 ocorreu, como mostra a figura 45, na região de razão $m/z = 286$. Isso prova que a ligação do NFOH ao Tos-Cl ocorre, e mais uma vez, outro nucleófilo (ButNH_2) deslocou a tosila.

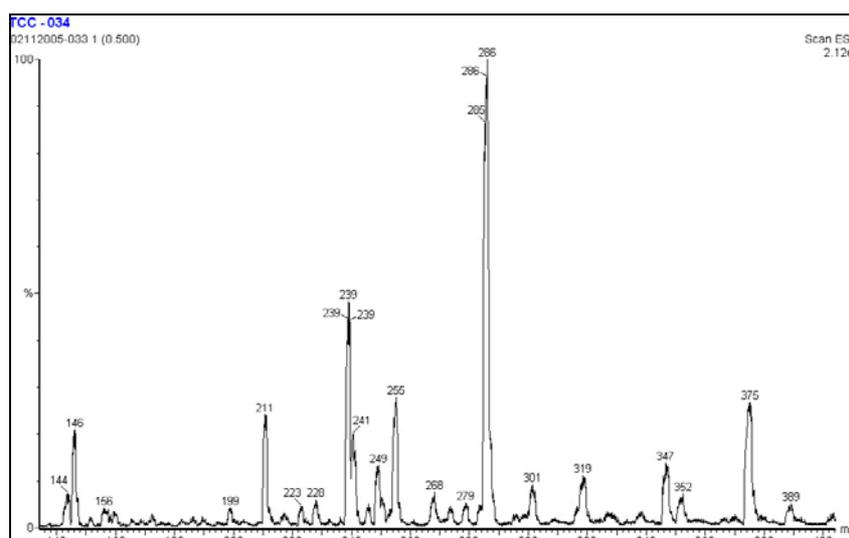
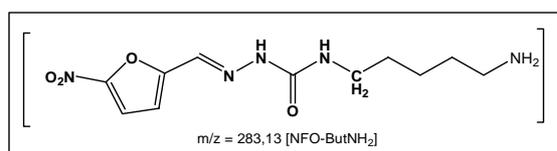
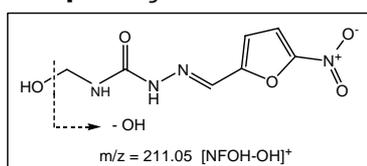


Figura 45: Espectro de massas (m/z) da tentativa de ligação do NFOH-cloreto tosila usando TEA e butilamina (experimento 26).

Composto: NFCH₂ButNH₂
Dados teóricos:
 Fórmula molecular: C₁₁H₁₇N₅O₄
 Massa exata: 283.13
Ions Encontrados (ESP+):
 Razão massa/carga [m/z]= 211; 286

Interpretação:



Esquema 46: Interpretação da figura 44 (m/z) da tentativa de ligação NFOH-cloreto tosila na presença de butilamina.

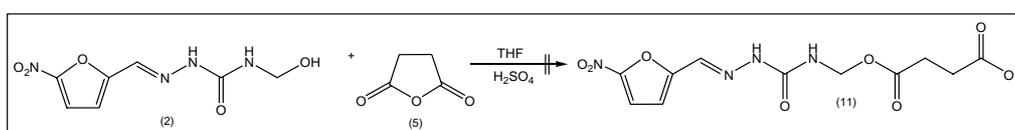
A tosilção do NFOH mostra-se promissora, proporcionando melhora no grupo de saída de NFOH para NFOTos (NFOH tosilado). Isso facilitaria a ligação do derivado ao AL, no entanto mesmo depois de todos os meios reacionais testados, e estando o meio básico como sugerido pela literatura (SIMIAN et al., 2004; TERANISHI, 2002; ZOU et al., 2005), não houve a formação do derivado tosilado. A formação dos derivados NFCH₂DMAP e NFCH₂ButNH₂ prova que a tosilção acontece, ocorrendo uma competição entre os nucleófilos (NFO⁻, DMAP ou ButNH₂) e o deslocamento da tosila.

A reação entre NFOH e Tos-Cl utilizando-se 4-DMAP como base foi refeita no **experimento 27**, porém utilizando-se proporção molar dez vezes menor do que aquela realizada no experimento 20. Esta tentativa visou evitar a formação do derivado NFCH₂DMAP. No entanto, conforme análise de espectroscopia de massas realizada observou-se novamente a formação do derivado (NFCH₂DMAP) na região de razão m/z= 333,1, possivelmente em menor quantidade, mas certamente inviabilizando esta metodologia.

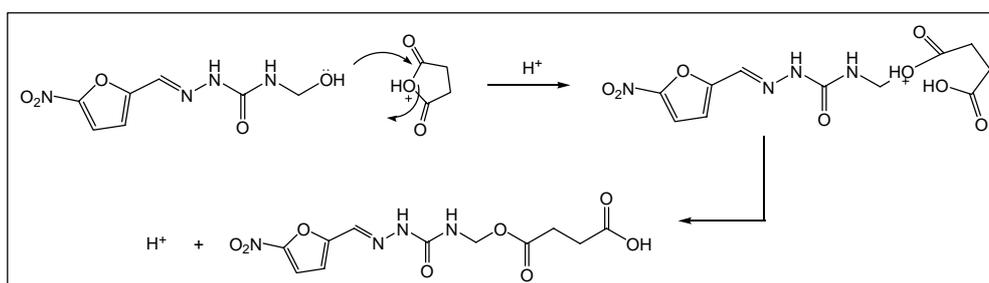
5.1.6. Tentativa de síntese do intermediário hemissuccinato de nitrofural hidroximetilado

Paralelamente à derivatização do NFOH-Tos-Cl, testou-se também a síntese do hemissuccinato de NFOH (HSNFOH) tanto em meio ácido quanto em meio básico, utilizando como uma das metodologias, estudos adaptados de SANTOS (2005).

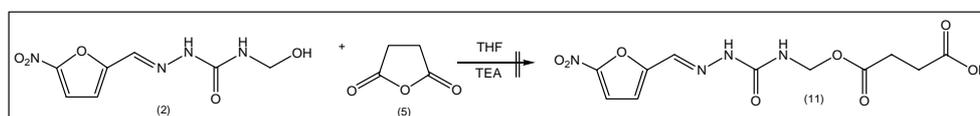
Seguem os esquemas 47, 48, 49, 50 e 51 das reações propostas e seus mecanismos.



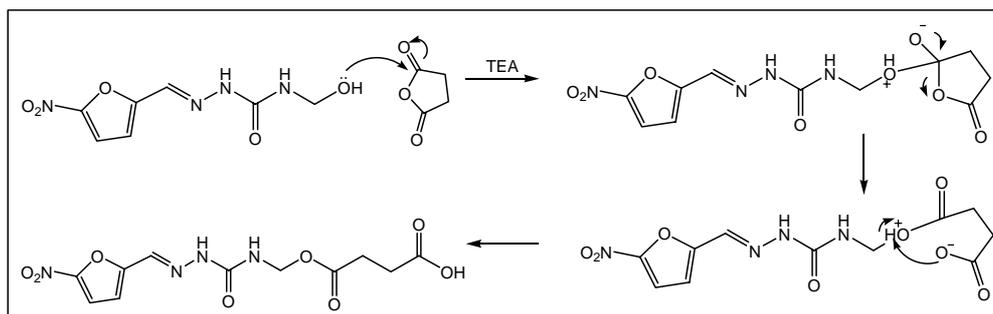
Esquema 47: Tentativa de síntese do derivado HSNFOH, em meio ácido – experimento 28.



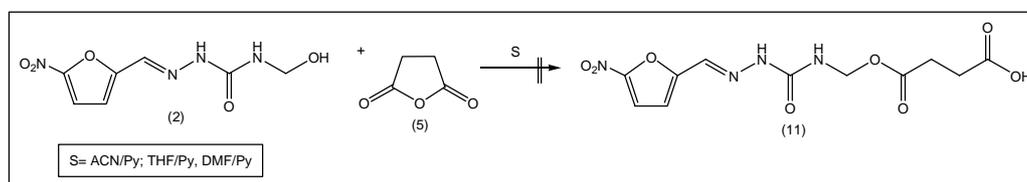
Esquema 48: Mecanismo proposto para reação de síntese do hemissuccinato de NFOH em meio ácido.



Esquema 49: Tentativa de síntese do derivado HSNFOH, em meio básico – experimento 29.



Esquema 50: Mecanismo proposto para reação de síntese do hemissuccinato de NFOH em meio básico.



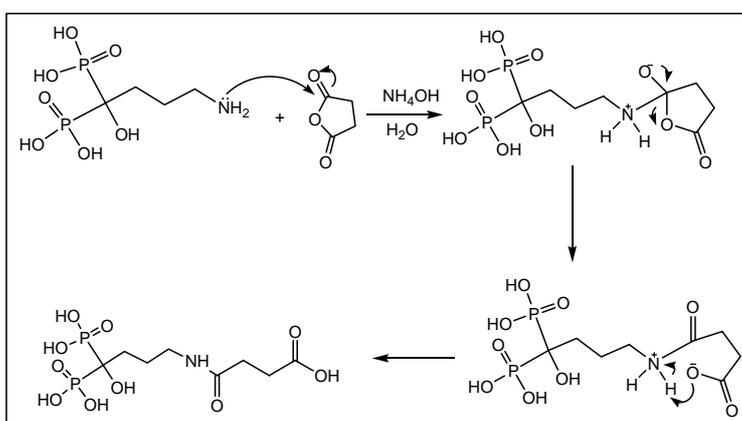
Esquema 51: Tentativa de síntese do derivado HSNFOH, em meio básico – experimentos 31, 32 e 33.

As reações foram acompanhadas por CCD, observando-se duas manchas características, uma referente ao produto de partida NFOH, com $R_f = 0,67$ e outra referente ao produto da degradação do NFOH, o NF, com $R_f = 0,82$, a partir de 24 horas de reação. As análises realizadas por espectroscopia de massas também não confirmam a formação dos produtos desejados.

5.1.7. Síntese do intermediário hemissuccinóil alendronato (HSAL)

Diante a possibilidade de derivatização da amina primária do AL, como discutido anteriormente no item 5.1.4, testou-se a síntese do derivado alendronato de sódio (AL) tendo o ácido dicarboxílico como grupo espaçante.

Discute-se muito sobre a reatividade deste grupamento amínico e segundo estudos realizados por GUITTENS et al (2005). No entanto, existe a possibilidade de derivatizar esta porção da molécula em meio básico, com pH entre 9 e 12, possibilitando a síntese de um novo composto a partir desta derivatização (GUITTENS et al., 2005; VEPSLAINEN, 2002). A seguir, o mecanismo para a reação de síntese do HSAL em meio básico.

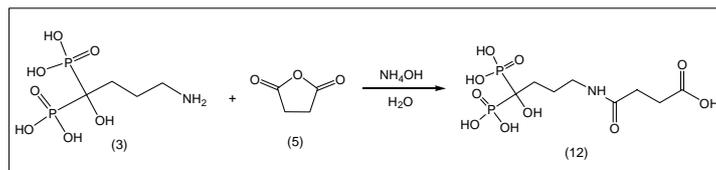


Esquema 52: Mecanismo para reação de síntese do derivado HSAL em meio básico.

As primeiras tentativas de síntese deste derivado foram feitas apenas em água, não sendo bem sucedidas.

De acordo com a literatura, a derivatização do AL é possível utilizando-se meio básico, para a desprotonação da amina primária do AL (GUITTENS et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005; SPARIDANS et al., 1997).

Assim, no **experimento 36** (esquema 53), o pH do meio reacional foi mantido no valor de pH 11 desde o início da reação. A reação foi acompanhada por CCD, a qual não confirmou a formação do produto.



Esquema 53: Síntese do derivado HSAL – experimento 36.

No entanto, a análise por espectroscopia de massas realizada, confirmou a formação do derivado HSAL, (figura 46) na região de razão $m/z = 348$ e $m/z = 370$. Observa-se por este íon $m/z = 370$ a formação de um complexo [Na-fosfato]. Apesar de o AL estar em água, favorecendo o composto estar em sua forma ionizada (AL^+Na^-), o meio apresenta-se básico, contendo excesso de (-OH), que faz com que o Na esteja quelado ao AL. Os íons de razão $m/z = 266$ e $m/z = 248$ sugerem ter apenas um sódio (Na) de diferença entre eles (Na - massa atômica = 22,9898).

O produto obtido, o derivado HSAL foi mantido em solução para ser utilizado em futuras reações. Segue os espectros de massas do produto HSAL, figura 46 e sua interpretação, esquema 54.

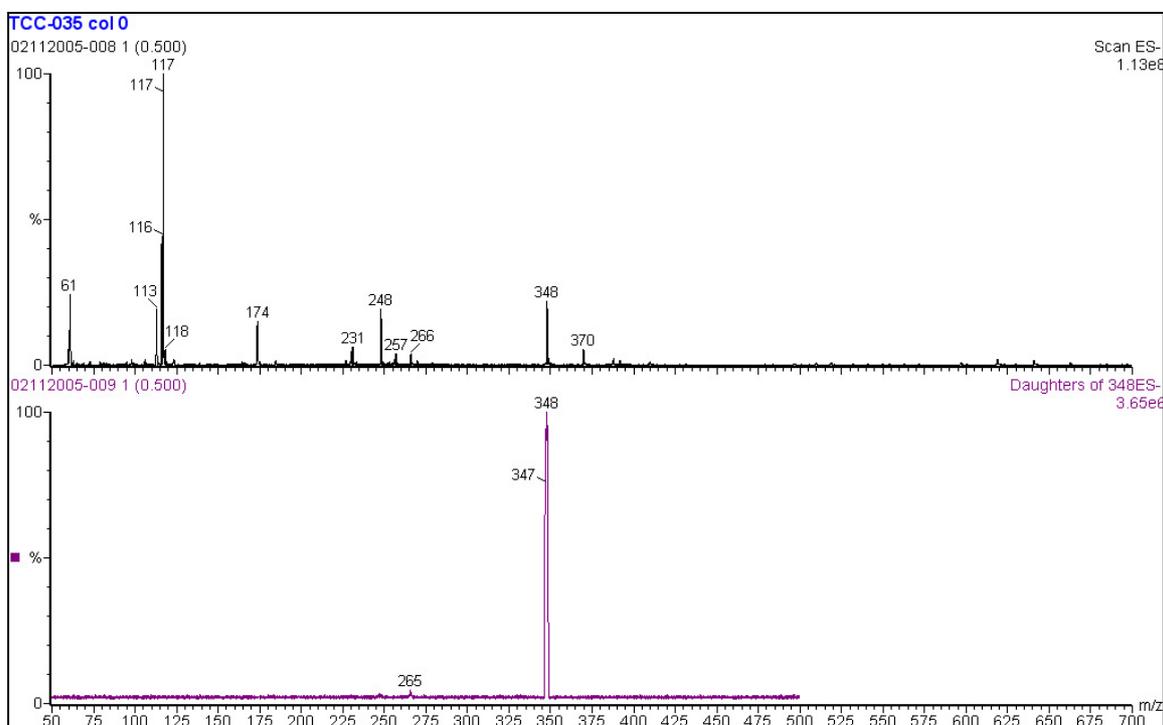
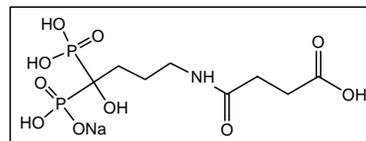
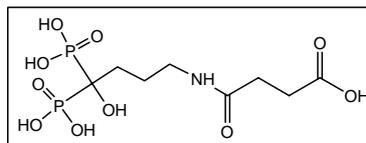
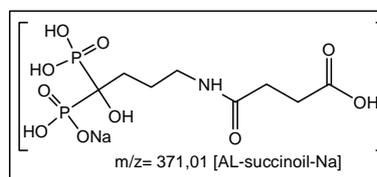
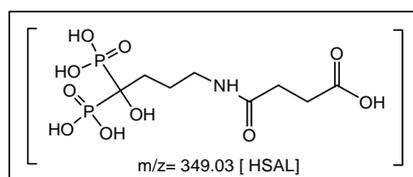
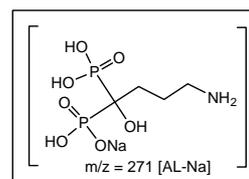
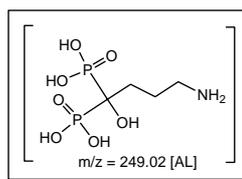
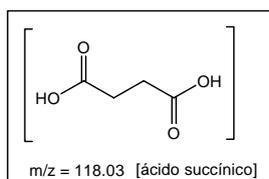


Figura 46: Espectro de massas (m/z) do derivado HSAL (experimento 36).

Composto: HSAL
Dados teóricos:
 Fórmula molecular: $C_8H_{17}NO_{10}P_2$
 Massa exata: 349,03/371,01
Íons Encontrados: (ESP-):
 Razão massa/carga [m/z]: 117,0; 248,0; 266;
 348; 307.



Interpretação:

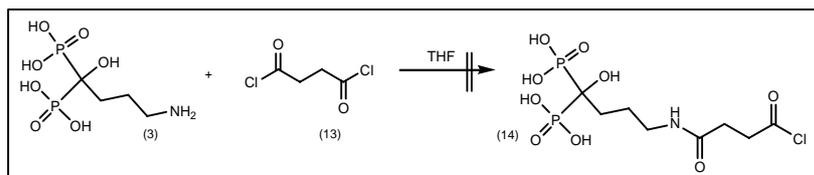


Esquema 54: Fragmentações (m/z) do derivado HSAL, referente à figura 46.

A análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de 1H e ^{13}C foi realizada, porém não foi conclusiva devido à presença de excesso de anidrido succínico. Para o sucesso desta reação e formação do derivado HSAL o excesso de anidrido succínico é necessário, conseqüentemente a formação de seu ácido como subproduto dificulta a sua separação do produto final. O derivado HSAL foi identificado por espectroscopia de massas, conforme figura 46 e esquema 55 observando-se também a grande quantidade de ácido presente no meio.

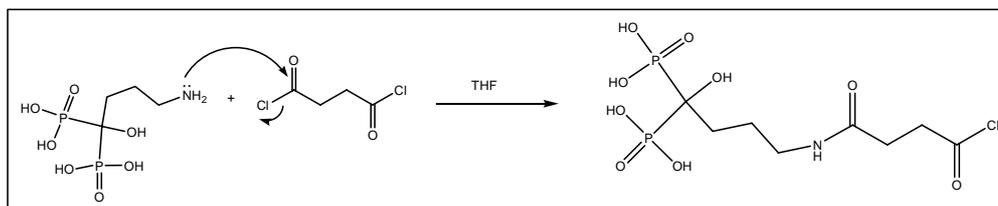
5.1.8. Síntese do intermediário derivado de alendronato de sódio e cloreto de succinoíla

Paralelamente à derivatização do AL com anidrido succínico, realizou-se a reação do derivado AL com cloreto de succinoíla, uma vez que os cloretos de ácido apresentam maior reatividade.



Esquema 55: Tentativa de síntese do derivado AL- cloreto de succinoíla – experimento 37.

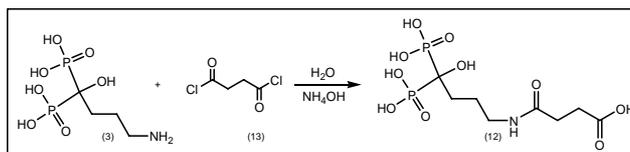
Segue no esquema 57 o mecanismo para esta reação.



Esquema 56: Mecanismo para a síntese do derivado AL - cloreto de succinoíla.

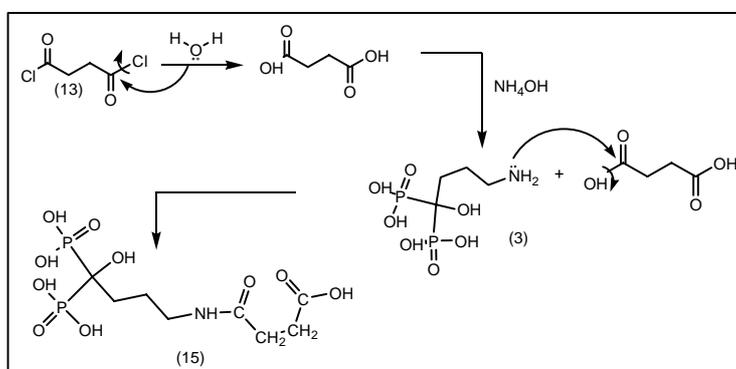
Porém o AL possui o grande inconveniente de ser completamente solúvel apenas em água, dificultando a utilização de solventes orgânicos. A tentativa de solubilizá-lo no próprio cloreto de succinoíla (**experimento 37**), e posteriormente em THF não foi bem sucedida.

No **experimento 38** realizou-se a reação do derivado proposto em cloreto de succinoíla e posterior adição de água, mantendo-se o meio com pH 11.



Esquema 57: Síntese do derivado AL-hemissuccinoil – experimento 38.

É sabido que o cloreto de succinoíla em água assume a forma de ácido succínico, gerando um derivado igual ao obtido no **experimento 36**.



Esquema 58: Mecanismo para síntese do derivado AL-hemissuccinoil em água e meio básico.

De acordo com a análise de espectroscopia de massas, confirma-se a síntese do derivado AL-succinoil, na região de razão $m/z = 348$. O cloreto de succinoíla, por ser mais reativo, apresenta maior quantidade de subprodutos reacionais, como se pode observar no espectro de massas do produto da reação. Segue o espectro de massas do composto AL-succinoil, figura 47 e sua interpretação, esquema 59.

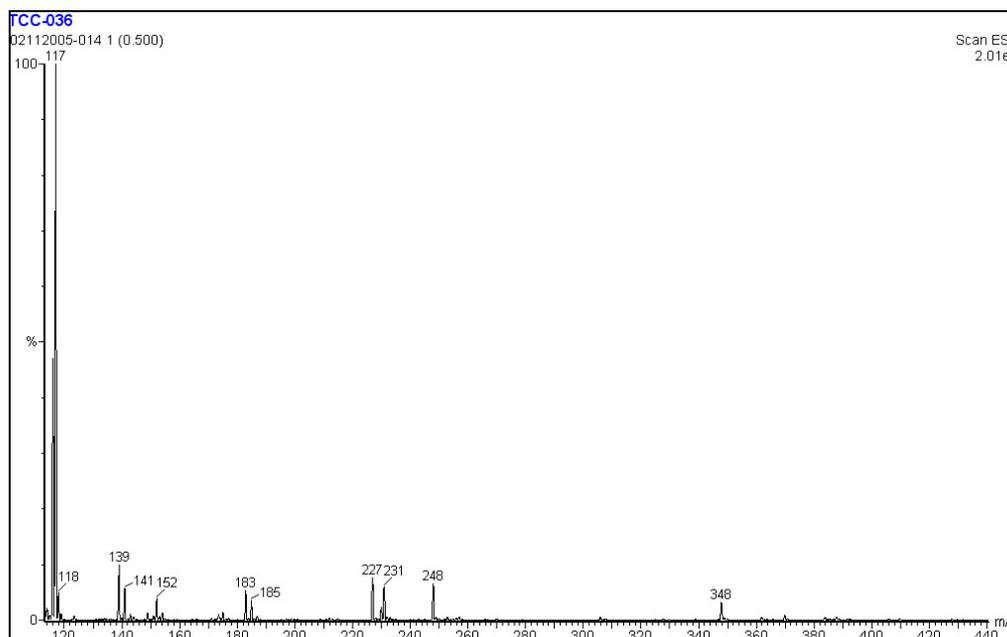
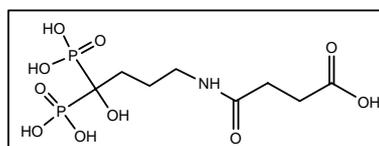
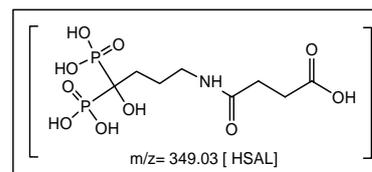
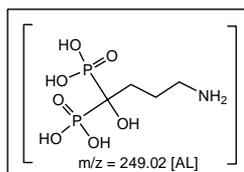
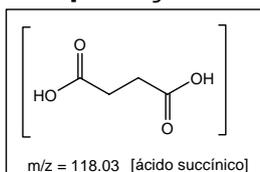


Figura 47: Espectro de massas (m/z) do derivado AL-succinoil (experimento 38).

Composto: AL-succinoil
Dados teóricos:
 Fórmula molecular: $C_8H_{17}NO_{10}P_2$
 Massa exata: 349,03
Íons encontrados (ESP-):
 Razão massa/carga: 117,0, 248,0, 348.



Interpretação:



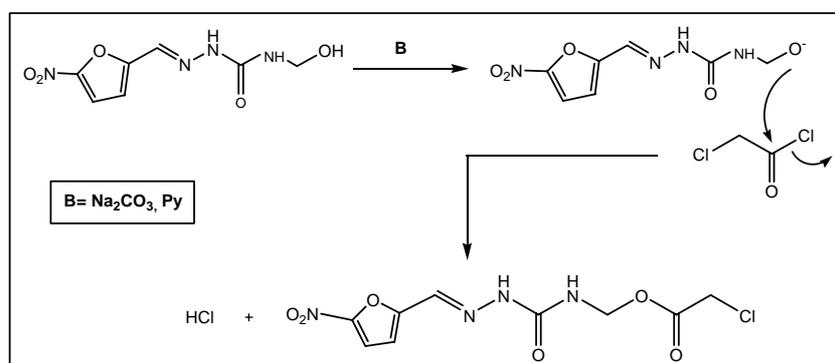
Esquema 59: Fragmentações (m/z) do derivado AL-succinoil, referente à figura 46.

Apesar de o derivado ter sido formado, esta metodologia não será utilizada, por três fatores – (a) por este derivado também ter sido obtido pela reação do AL ao anidrido succínico (HSAL); (b) a reação com o cloreto de succinoíla apresentar muitos subprodutos, o que dificultaria a purificação do produto desejado; (c) maior facilidade no manuseio do anidrido succínico, comparado ao cloreto de succinoíla.

5.1.9. Tentativa de síntese do intermediário acetilado de nitrofural hidroximetilado

Diante dificuldades encontradas nos experimentos testados para a síntese do derivado tosilado de nitrofural hidroximetilado (NFOH), optou-se também por diferente derivatização da molécula do derivado NFOH, ligando-o ao cloreto de cloroacetila, outra tentativa de melhorar o seu grupo de saída.

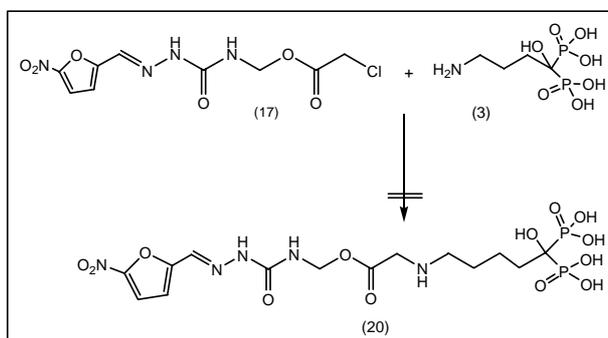
Os experimentos foram realizados em solventes diferentes, diclorometano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetonitrila/piridina, tetraidrofurano/piridina e dimetilformamida/piridina, **experimentos 39, 40, 41, 42, 43 e 44**, respectivamente, haja vista a dificuldade em se solubilizar o NFOH. Reagiu-se o NFOH com o cloreto de cloroacetila na presença de uma base, carbonato de sódio (Na_2CO_3) e piridina (Py), utilizados com a função de desprotonar a hidroxila do NFOH permitindo a ligação ao cloreto de cloroacetila, como mostra o esquema 60 abaixo, e ainda, captar o ácido clorídrico liberado da reação do cloreto ao derivado hidroximetilado.



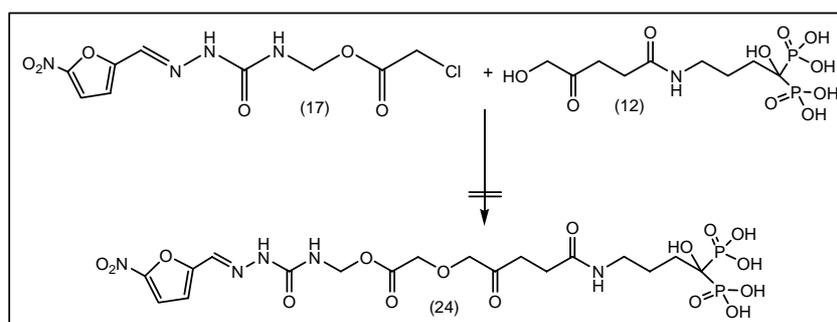
Esquema 60: Mecanismo proposto para síntese do derivado acetilado de nitrofural hidroximetilado em meio básico.

Além de se obter um melhor grupo abandonador que a hidroxila pertencente ao derivado hidroximetilado, esta reação teve também como objetivo a síntese de um derivado acetilado como um intermediário mais polar que o derivado tosilado, a ser reagido futuramente com o alendronato de sódio (composto 20) ou com seu derivado hemissuccinoil - HSAL (composto 24), para síntese do pró-fármaco recíproco, visto que o derivado HSAL apresentou

resultados promissores na sua etapa de síntese. Seguem os esquemas 61 e 62 dos pró-fármacos propostos.



Esquema 61: Pró-fármaco proposto a partir do derivado acetilado de NFOH e AL – composto 20.



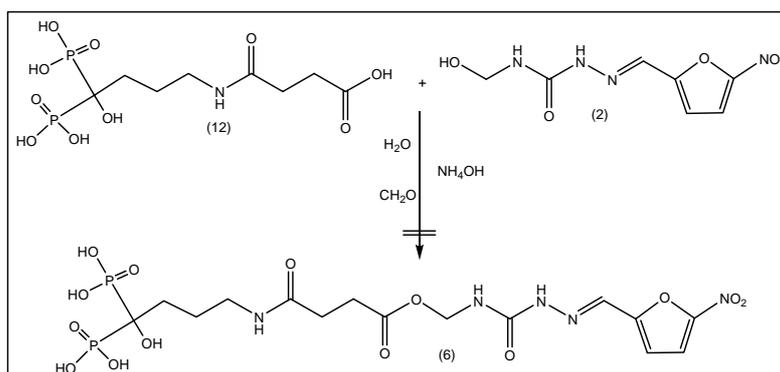
Esquema 62: Pró-fármaco proposto a partir do derivado acetilado de NFOH e HSAL – composto 24.

Observou-se através da espectroscopia de massas realizada a não formação do derivado acetilado de NFOH, inviabilizando as etapas futuras de síntese dos pró-fármacos propostos. Acreditava-se que esta reação ocorresse em um curto período de tempo, porém, através dos resultados obtidos com os experimentos 42, 43 e 44, os quais foram monitorados integralmente por CCD, observou-se a não formação do derivado acetilado proposto e ainda, a degradação do NFOH a seu composto de partida NF, a partir de 24 horas de reação.

5.1.10. Tentativa de síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural hidroximetilado e hemissuccinil alendronato.

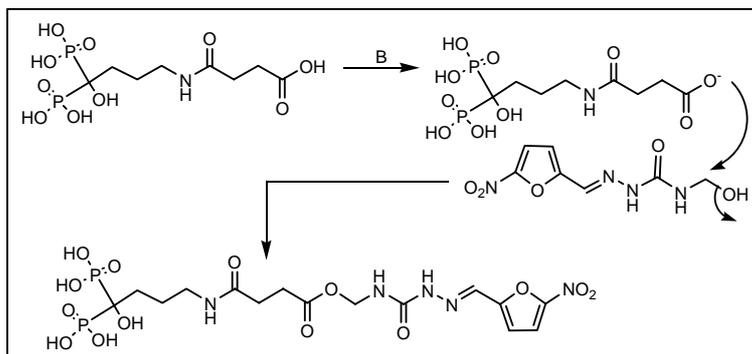
Diante as dificuldades encontradas em se reagir o derivado hidroximetilado ao alendronato de sódio e a partir dos resultados promissores obtidos com o derivado hemissuccinil alendronato (HSAL), propôs-se a síntese de um pró-fármaco derivado de NFOH e HSAL.

Visto que os dois compostos possuem características físico-químicas distintas principalmente em relação à solubilidade, optou-se por se fazer a reação em água e em meio básico. Essa condição teve como intuito manter a formação do derivado HSAL mesmo tendo em vista que este meio não seria o mais adequado para a solubilização do derivado NFOH. No entanto, a presença do formaldeído favoreceria a não degradação do NFOH a seu composto de partida NF. Segue o esquema 63 da reação proposta.



Esquema 63: Pró-fármaco proposto a partir do derivado NFOH e HSAL – composto 6.

De acordo com os valores da constante de ionização dos compostos de partida, HSAL, grupo ácido – RCOCH₂CH₂COOH, pKa = 5,03 e derivado NFOH, grupo ácido – RCH₂OH, pKa = 13,60 (PALLAS, 1994, 95), espera-se que o pH do meio favoreça o ataque do derivado HSAL ao derivado NFOH deslocando sua hidroxila. Segue o mecanismo proposto para esta reação, esquema 64.

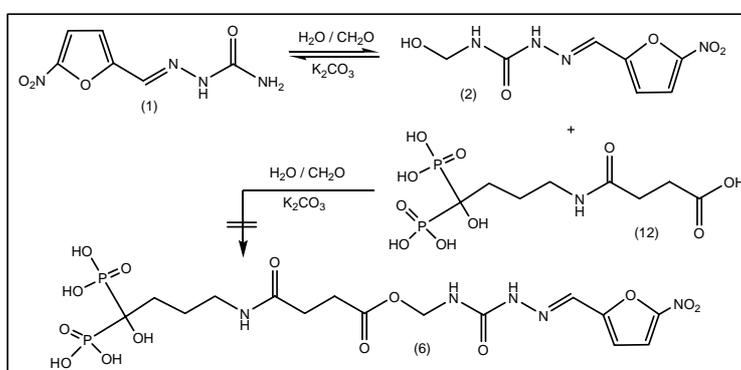


Esquema 64: Mecanismo proposto para síntese do pró-fármaco derivado de NFOH e HSAL, em meio básico.

As análises de CCD realizadas mostraram duas manchas, uma característica ao produto de partida, NFOH, com $R_f = 0,63$, e outra rastreada, tornando esta análise inconclusiva. Observou-se através da espectroscopia de massas realizada que o pró-fármaco proposto não se formou.

5.1.11. Tentativa de síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural e hemissuccinóil alendronato.

Paralelamente à reação anterior, baseando-se na mesma proposta, testou-se a síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural e derivado hemissuccinóil alendronato, em água e formaldeído, tendo carbonato de potássio como base. Este meio reacional sendo favorável à formação do derivado hidroximetilado facilitaria sua síntese *in situ*, sendo mantido para posterior reação de esterificação entre os derivados NFOH e HSAL. Segue abaixo o esquema 65 do pró-fármaco proposto.



Esquema 65: Pró-fármaco proposto a partir do NF e HSAL – composto 6.

O derivado NFOH foi obtido *in situ*, confirmado pela análise de CCD, observando-se uma mancha característica, com $R_f = 0,62$. Observou-se, no entanto, através de análise de espectroscopia de massas, a não formação do pró-fármaco proposto.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6.1. Considerações finais

- Obteve-se o derivado hidroximetilado em meio básico.
- Obteve-se o derivado hidroximetilado em meio ácido.
- O tempo de obtenção do derivado hidroximetilado em meio básico foi reduzido para 24 e 5 horas em seus respectivos experimentos.
- As tentativas de síntese da base de Mannich NFOH-AL realizadas não foram bem sucedidas, observando-se muitas vezes a degradação do composto de partida (NFOH).
- O pró-fármaco recíproco nitrofural hidroximetilado-anidrido succínico-alendronato de sódio não foi obtido.
- Durante a esterificação do alendronato de sódio houve a formação de derivado metilado, caracterizado por espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , porém este derivado não se mostrou útil e apropriado para a síntese do pró-fármaco proposto.
- O derivado tosilado de nitrofural hidroximetilado não foi obtido.
- O derivado hemissuccinato de nitrofural hidroximetilado não foi obtido.
- O derivado hemissuccinoil de alendronato de sódio (HSAL) foi obtido e identificado por espectroscopia de massas.

-
- O produto da reação entre alendronato de sódio e cloreto de succinoíla em meio aquoso foi obtido.
 - O derivado acetilado de nitrofural hidroximetilado não foi obtido, devido à degradação do composto de partida.
 - As tentativas de obtenção de pró-fármacos derivados de hemissuccinoil alendronato de sódio - nitrofural hidroximetilado e hemissuccinoil alendronato de sódio - nitrofural, não foram coroadas de êxito.

6.2. Perspectivas

- Obtenção de derivado do AL para preparação da base de Mannich com o derivado hidroximetilado de nitrofural.
- Obtenção de derivado do AL com maior lipofilicidade (maior log P) aumentando-se as possibilidades de síntese e solubilização do composto em solventes orgânicos.
- Obtenção de derivado de NFOH com maior hidrofiliicidade (menor log P) aumentando-se as possibilidades de solubilização deste composto em água.
- Síntese de pró-fármaco recíproco alendronato de sódio-primaquina (BLAU, 2005).
- Obtenção de pró-fármaco recíproco derivado de nitrofural utilizando-se outro fármaco pertencente ao grupo dos aminobifosfonatos.
- A partir dos resultados promissores obtidos com as pesquisas referentes a atividade seletiva dos aminobifosfonatos, propor e planejar pró-fármacos potencialmente antichagásicos tendo o pirofosfato como alvo na via metabólica do *Trypanosoma cruzi*.

7. EXPERIMENTOS

7.1. Métodos de Síntese

7.1.1. Síntese do derivado hidroximetilado de nitrofural (NFOH)

7.1.1.1. Meio básico

Experimento 1

Realizou-se o experimento segundo a metodologia descrita por CHUNG (1996), partindo-se de 5 mmol (0,99 g) de NF, 5 mmol (0,69 g) de K_2CO_3 , em suspensão de 10 mL de água com 18 mL de solução aquosa de CH_2O (37%, v/v) sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Após o término da reação, a suspensão foi filtrada e lavada com metanol a frio, sob pressão reduzida. O precipitado foi recristalizado com solução metanol:água (170:50, v/v) e avaliado por CCD utilizando-se como fase móvel, sistema solvente 1. Realizou-se análise no infravermelho, por espectroscopia de massas e por ressonância magnética nuclear de 1H e C^{13} (RMN 1H e C^{13}).

Experimento 2

Nas mesmas condições do experimento 1 e segundo metodologia descrita em TROSSINI (2004), realizou-se a reação de hidroximetilação do NF, com adição de solução aquosa de CH_2O (37%, v/v) em duas etapas: metade da concentração logo no início da reação e outra metade após 2,5 horas, observando-se a reação por CCD utilizando-se como fase móvel, sistema solvente 1. Interrompeu-se após 5 horas de reação com provável formação do produto final. Filtrou-se sob pressão reduzida, lavando-se o precipitado com metanol a frio até remoção total do formaldeído. Realizou-se análise no infravermelho.

7.1.1.2. Meio ácido

Experimento 3

Realizou-se o experimento segundo a metodologia descrita por CHUNG, 1996, partindo-se de 5 mmol (0,99 g) de NF com excesso de solução

aquosa de CH_2O (37%, v/v) em presença de HCl 0,1 M até pH 4 e água. A reação permaneceu à temperatura ambiente, em pH 4-5 sob agitação constante, durante 24 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel, sistema solvente 1.

7.1.2. Síntese da base de Mannich nitrofural hidroximetilado e alendronato de sódio

Experimento 4

A partir do derivado hidroximetilado obtido no experimento 1, realizou-se a reação do pró-fármaco proposto partindo-se de 1 mmol de NFOH (0,23 g) suspenso em metanol, 1 mmol de AL (0,325 g) solubilizado em água sob agitação constante à temperatura ambiente por 24 horas. O meio foi filtrado sob pressão reduzida e o precipitado foi analisado por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 1. Realizou-se a análise no infravermelho.

Experimento 5

Realizou-se a reação do pró-fármaco proposto através duas etapas. Na primeira, a reação de hidroximetilação do NF, com excesso de CH_2O , na presença de água e ácido clorídrico (HCl). Partiu-se de 1 mmol de NF (0,2 g), 3,6 mL de solução aquosa de CH_2O (37%, v/v) e 2 mL de água. Ajustou-se o pH da reação para 4 com solução de HCl 0,1 M. A etapa procedeu-se por 24 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 1. Após as primeiras 24 horas, ajustou-se o pH do meio para pH 5-6 com trietilamina (TEA) e adicionou-se então 1 mmol do AL (0,325 g) solubilizado em água em proporção de 1:1 (mol:mol) com o NF, e outros 3,6 mL de solução aquosa de CH_2O (37%, v/v). Ajustou-se novamente o pH 5-6, mantendo-se a reação sob agitação constante à temperatura ambiente por mais 24 horas. Acompanhou-se a reação por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 1. Ao final das 24 horas o solvente foi rotaevaporado e o material analisado no infravermelho.

Experimento 6

Partiu-se de 1 mmol de NF (0,2 g) suspenso em CH_3OH , 1 mmol do AL (0,325 g) solubilizado em água e 1,0 mL de solução aquosa de CH_2O (37%,

v/v). Ajustou-se o pH da reação para 4 com ácido acético. Após 1 hora de reação, adicionou-se mais 1,0 mL de solução aquosa de CH_2O (37%, v/v). A reação permaneceu sob agitação magnética por 24 horas, sendo por CCD utilizando-se como fases móveis os sistemas solvente 2 e 3. O meio foi filtrado sob pressão reduzida, o filtrado rotaevaporado. Ambos, precipitado e produto rotaevaporado foram analisados no infravermelho.

Experimento 7

Partiu-se de 1 mmol de NF (0,2 g) suspenso em CH_3OH e 1,0 mL de solução aquosa de CH_2O (37%, v/v). Ajustou-se o pH da reação para 4 com HCl 0,1M. Após 1 hora de reação, adicionou-se mais 1,0 mL de solução aquosa de CH_2O (37%, v/v), 1 mmol do AL (0,325 g) solubilizado em água e ajustou-se o pH da reação para 8 com trietilamina (TEA). A reação permaneceu sob agitação magnética por 24 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 1, revelando-se as placas com ninhidrina. O meio foi filtrado sob pressão reduzida, o filtrado rotaevaporado. Ambos, precipitado e produto rotaevaporado foram analisados no infravermelho.

Experimento 8

Partiu-se de 1 mmol de NF (0,2 g) suspenso em 3,6 mL de solução aquosa de CH_2O (37%, v/v) e 2,0 mL de água. Ajustou-se o pH da reação (pH 4) com HCl 0,1M. Após 1 hora de reação, adicionou-se mais 3,6 mL de solução aquosa de CH_2O (37%, v/v). Esta etapa da reação foi acompanhada por CCD utilizando-se sistema solvente 1. Após mais 1 hora de reação, até o meio parecer todo solubilizado, adicionou-se 1 mmol (0,325 g) do AL solubilizado em água, 2,0 mL de solução aquosa de CH_2O (37%, v/v) e ajustou-se o pH da reação (pH 12) com TEA. A reação permaneceu sob agitação magnética por mais 24 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 4, revelando-se as placas com ninhidrina. O produto da reação foi rotaevaporado e analisado no infravermelho.

Experimento 9

O experimento foi realizado conforme o experimento anterior, utilizando-se quantidades equimolares de NF e alendronato de sódio, na

proporção de 1:1(mol:mol) com excesso de CH_2O em meio inicialmente ácido, com a diferença de que o pH do meio foi ajustado com TEA para pH 12 em banho de gelo. Acompanhou-se a reação por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 4, revelando-se as placas com ninhidrina. O produto da reação foi rotaevaporado e analisado no infravermelho.

Experimento10

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,198 g) de NF, 1 mmol (0,14 g) de carbonato de potássio (K_2CO_3), em 5 mL de água e 4 mL de CH_2O . A reação permaneceu sob agitação constante à temperatura ambiente por 24 horas. Adicionou-se 1 mmol (0,3251 g) de AL solubilizado em 5 mL de água, ajustou-se o pH para pH 9 com K_2CO_3 e adicionou-se 1 mL de CH_2O (37%). O pH foi novamente ajustado para pH 10, lentamente, com 4 mmol (0,56 g) de K_2CO_3 . A reação permaneceu sob agitação constante à temperatura ambiente por 24 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6 e reveladores luz de UV e ninhidrina. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, precipitado e filtrado foram analisados separadamente por CCD, utilizando-se como fase móvel sistema solvente 4, sendo o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

7.1.3. Síntese do pró-fármaco nitrofural hidroximetilado – anidrido succínico – alendronato de sódio

Experimento 11 (Em acetonitrila na presença de DCC e 4-DMAP)

O experimento foi realizado em balões separados, por 12 horas, e logo após vertidos um ao outro. Reagiram-se 1 mmol (0,2 g) de NFOH e 1,2 mmol (0,12 g) anidrido succínico na presença de 0,12 mmol (0,015 g) de 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) em acetonitrila (ACN) (*balão 01*). Paralelamente, reagiram-se 1 mmol (0,325 g) de AL e 0,12 mmol (0,015 g) de 4-DMAP em ACN (*balão 02*). Ambas as reações permaneceram à temperatura ambiente, sob agitação constante, por 12 horas. Após este período, adicionou-se 1,2 mmol (0,24 g) de dicicloexilcarbodiimida (DCC) à reação do NFOH (*balão 01*), sob agitação vigorosa por 10 minutos. Verteu-se a reação do *balão 02* ao *balão 01*. A reação permaneceu à temperatura ambiente, sob agitação constante por 24 horas. Ao

término da reação, a suspensão foi filtrada. O precipitado e o sobrenadante foram analisados separadamente por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6, e posteriormente analisados no infravermelho.

Experimento 12 (Em dimetilsulfóxido e na presença de DCC e HOBt)

O experimento foi realizado como o anterior, em balões separados, durante 12 horas, depois vertidos um no outro. Reagiram-se 1 mmol (0,2 g) de NFOH e 1,2 mmol (0,12 g) anidrido succínico, na presença de 1,2 mmol (0,1621 g) de hidroxibenzotriazol (HOBt) em dimetilsulfóxido (DMSO) (*balão 01*). Paralelamente, reagiu-se 1 mmol (0,325 g) de AL e 1,2 mmol (0,1621 g) de HOBt em DMSO (*balão 02*). Ambas as reações permaneceram à temperatura ambiente, sob agitação constante, por 12 horas. Após este período, adicionou-se 1,2 mmol (0,24 g) de DCC à reação do NFOH (*balão 01*), sob agitação vigorosa por 10 minutos. Verteu-se a reação do *balão 02* ao *balão 01*. A reação permaneceu à temperatura ambiente, sob agitação constante por 24 horas. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada. O precipitado e o sobrenadante foram analisados separadamente por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6 e posteriormente no infravermelho.

7.1.4. Síntese do intermediário esterificado de alendronato de sódio

Experimento 13 (Em solução aquosa de carbonato de sódio 10%)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,325 g) de AL, na presença de 10 mL de solução de carbonato de sódio a 10% (Na_2CO_3 10%) por 10 minutos. Após este período, adicionou-se 3 mmol (0,3 mL) de sulfato de dimetila (DMS). A reação permaneceu sob agitação vigorosa e constante, à temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, a solução foi extraída, por extração líquido/líquido (L/L), com 90 mL de diclorometano (DCM) (três vezes, com 30 mL cada), o extrato orgânico foi filtrado na presença de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e rotaevaporado. Ajustou-se o pH da fase aquosa (pH 7) com solução aquosa de ácido acético 50% (CH_3COOH) e realizou-se nova extração com 30 mL de acetato de etila (AcOEt). Filtrou-se novamente a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. O extrato orgânico obtido foi rotaevaporado e analisado no infravermelho.

Experimento 14 (Em diclorometano e solução aquosa de NaOH 5%)

A reação foi feita reagindo-se 2 mmol (0,65 g) de AL, na presença de 5 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 5% com 5 mmol (0,5 mL) de DMS em DCM. A reação permaneceu sob agitação vigorosa e constante, à temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, a solução foi extraída, por extração líquido/líquido (L/L), com 45 mL de DCM (três vezes, com 15 mL cada) e o extrato orgânico foi filtrado na presença de sulfato de sódio anidro e rotaevaporado. Os extratos aquoso e orgânico foram analisados separadamente no infravermelho e por espectroscopia de massas.

Experimento 15 (Em solução aquosa de hidróxido de amônio, 1:1,v/v)

A reação foi feita reagindo-se 2 mmol (0,65 g) de AL com 10 mmol (1 mL) de DMS. Ajustou-se o pH com solução aquosa de NH_4OH (1:1, v/v) para pH 9. A reação permaneceu sob agitação vigorosa e constante, à temperatura ambiente por 36 horas mantendo-se este valor de pH. Ao término da reação, ajustou-se o pH com solução aquosa de HCl 0,1 M para pH 7. O produto foi congelado, liofilizado e analisado por espectroscopia de massas. Após esta análise, o produto foi lavado com acetona e analisado novamente por espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear ^1H .

Experimento 16 (Em solução aquosa de hidróxido de sódio – a quente)

A reação foi feita reagindo-se 2 mmol (0,65 g) de AL previamente solubilizado em água com 15 mmol (1,5 mL) de DMS. Ajustou-se o pH com solução aquosa de NaOH 10% para pH 9. A reação permaneceu sob refluxo, com agitação vigorosa e constante à 70°C por 36 horas mantendo-se o valor de pH 9. Ao término da reação, ajustou-se o pH com solução aquosa de HCl 0,1 M para pH 7. O produto foi congelado, liofilizado e analisado no infravermelho e por RMN ^1H .

Experimento 17 (Em solução aquosa de hidróxido de amônio (1:1, v/v) – via sonicação)

A reação foi feita reagindo-se 4 mmol (1,3 g) de AL previamente solubilizado em água com 30 mmol (3 mL) de DMS, na presença de 10 mL de ACN. Ajustou-se o pH com solução aquosa de NH_4OH (1:1, v/v) para pH 9. A reação permaneceu em banho de ultrassom à temperatura ambiente por 6 horas

mantendo-se o valor de pH 9. Ao término da reação, ajustou-se o pH com solução aquosa de HCl 0,1 M para pH 7. O produto foi congelado, liofilizado e analisado por espectroscopia de massas. Após esta análise, o produto foi lavado com acetona e analisado novamente, no infravermelho e por espectroscopia de massas.

Experimento 18(Em água – microondas)

A reação foi feita reagindo-se 2 mmol (0,65 g) de AL solubilizado previamente em 10 mL água com 10 mmol (1 mL) de DMS. A reação ocorreria em microondas, em potência máxima de 1 em 1 minuto sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 5. A reação foi interrompida aos 2 minutos.

7.1.5. Síntese do intermediário tosilado de nitrofural hidroximetilado

Experimento 19 (Em diclorometano e 4-dimetilaminopiridina)

A reação foi feita reagindo-se, 1 mmol (0,23 g) do NFOH com 1 mmol (0,122 g) de 4-DMAP em 5 mL de DCM. Resfriou-se a reação a 0°C e, após 10 minutos, adicionou-se 1,2 mmol (0,228 g) de cloreto de tosilato (Tos-Cl). A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada e o precipitado separado. Realizou-se uma extração líquido/líquido (L/L), com 45 mL de DCM (três vezes, com 15 mL cada) e o extrato orgânico foi filtrado na presença de sulfato de sódio anidro e rotaevaporado. Os extratos aquoso e orgânico foram analisados no infravermelho e por espectroscopia de massas separadamente.

Experimento 20 (Em diclorometano e trietilamina)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) de NFOH com 0,5 mL de TEA em 5 mL de DCM, e após 10 minutos de agitação, adicionou-se 1,2 mmol (0,228 g) de Tos-Cl a temperatura ambiente. A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 144 horas. A reação foi acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6. Ao término da reação, adicionou-se água e DCM à reação, e as frações foram extraídas, por extração líquido/líquido (L/L), na presença de 30 mL de DCM (3 vezes, com 10 mL cada) e

20 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 10%. O extrato orgânico foi filtrado na presença de sulfato de sódio anidro e rotaevaporado. Os extratos aquoso e orgânico foram analisados por CCD, por espectroscopia de massas e por ressonância magnética nuclear de ^1H .

Experimento 21 (Em acetonitrila e trietilamina)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) do NFOH com 0,5 mL de TEA, 1,2 mmol (0,228 g) de Tos-Cl em ACN. A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 24 horas. A reação foi acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, precipitado e filtrado foram analisados separadamente por CCD, sendo o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 22 (Em acetonitrila e carbonato de sódio)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) de NFOH com 1,5 mmol (0,16 g) de carbonato de sódio (Na_2CO_3), 1,2 mmol (0,23 g) de Tos-Cl em ACN. A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 47 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6. Ao término da reação, o produto foi filtrado, rotaevaporado e analisado no infravermelho.

Experimento 23 (Em tetraidrofurano e trietilamina)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) do NFOH com 0,5 mL de TEA, 1,2 mmol (0,228 g) de Tos-Cl em 10 mL de tetraidrofurano (THF). A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 36 horas. A reação foi acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, precipitado e filtrado foram analisados separadamente por CCD, sendo o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 24 (Em trietilamina)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) de NFOH com 1,2 mmol (0,23 g) de Tos-Cl tendo TEA com solvente. A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 72 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 1. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, o precipitado e o filtrado foram analisados separadamente por CCD, sendo o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 25 (Em acetonitrila e trietilamina - a 0°C)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) do NFOH com 0,5 mL de TEA, 1,5 mmol (0,287 g) de Tos-Cl em 10 mL de ACN. Adicionou-se o NFOH, a ACN e a TEA, em banho de gelo, até 0°C. Após a suspensão ter atingido esta temperatura, adicionou-se o Tos-Cl, gota a gota, previamente solubilizado em ACN também a 0°C. A reação permaneceu sob agitação constante, em banho de gelo, até atingir a temperatura ambiente (2 horas), continuando sob agitação por mais 94 horas, tendo um tempo total de 96 horas. A reação foi acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, precipitado e filtrado foram analisados separadamente por CCD, sendo o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 26 (Em acetonitrila e trietilamina – a 0°C na presença de butilamina)

A reação foi feita reagindo-se 0,5 mmol (0,114 g) do NFOH com 0,25 mL de TEA, 0,75 mmol (0,143 g) de Tos-Cl em 5 mL de ACN. Adicionou-se o NFOH, a ACN e a TEA, em banho de gelo, até 0°C. Após a suspensão ter atingido esta temperatura, adicionou-se o Tos-Cl, gota a gota, previamente solubilizado em ACN a 0°C, e a reação permaneceu sob agitação constante, em banho de gelo, até atingir a temperatura ambiente. Após 4 horas, adicionou-se 1 mmol de butilamina (ButNH₂) ao meio reacional. A reação continuou sob agitação constante por mais 8 horas, tendo um tempo total de 12 horas. Acompanhou-se a reação por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, o precipitado e o filtrado foram analisados

separadamente por CCD, sendo o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 27 (Em dimetilformamida e 4-DMAP)

A reação foi feita reagindo-se, 1 mmol (0,23 g) do NFOH com 0,1 mmol (0,0122 g) de 4-DMAP em 5 mL de DMF. Resfriou-se a reação a 0°C e, após 10 minutos, adicionou-se 1,2 mmol (0,228 g) de Tos-Cl, também a 0°C, gota a gota. Após 10 horas de reação, adicionou-se lentamente 1 mmol de carbonato de sódio (Na₂CO₃). A reação permaneceu sob agitação vigorosa e constante, à ambiente por 24 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 1. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, precipitado e filtrado foram analisados separadamente por CCD, sendo o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

7.1.6. Tentativa de síntese do derivado hemissuccinato de nitrofural hidroximetilado

Experimento 28 (Em tetraidrofurano e ácido sulfúrico)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) de NFOH com 1 mmol (0,1 g) de anidrido succínico na presença de 2 gotas de solução aquosa de H₂SO₄ 20% em 10 mL de THF. A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 3 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 1. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, o precipitado e o filtrado foram analisados separadamente por CCD, sendo o filtrado posteriormente rotaevaporado.

Experimento 29 (Em tetraidrofurano e trietilamina)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) de NFOH com 1,2 mmol (0,12 g) de anidrido succínico na presença de 2 gotas de TEA em 10 mL de THF. A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 3 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 1. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, o precipitado e o filtrado foram analisados separadamente por CCD, sendo o filtrado posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 30 (Em acetonitrila e piridina)

A reação foi feita reagindo 0,1 mmol (0,023 g) de NFOH com 0,1 mmol (0,01 g) de anidrido succínico em 5 mL de solução ACN/Py (7:3, v/v), e 0,5 mL de solução DMF/Py (9:1). A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 60 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 1.

Experimento 31 (Em tetraidrofurano e piridina)

A reação foi realizada e analisada conforme a anterior, porém, em 5 mL de solução THF/Py (7:3, v/v) e 0,5 mL de solução DMF/Py (9:1).

Experimento 32 (Em dimetilformamida e piridina)

A reação foi realizada e analisada conforme a anterior, porém, em 5,5 mL de solução DMF/Py (9:1, v/v).

7.1.7. Síntese do derivado hemissuccinoil alendronato**Experimento 33 (Em água - adaptação de HARRIS, 1995)**

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,325 g) de AL solubilizado em 10 mL de água e 3 mmol (0,3 g) de anidrido succínico. A reação permaneceu sob agitação constante à temperatura ambiente por 36 horas sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 5 e ninhidrina como revelador. Ao término da reação o produto foi congelado, liofilizado e analisado no infravermelho e por espectroscopia de massas.

Experimento 34 (Em água – via microondas)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,325 g) de AL solubilizado em 10 mL de água e 3 mmol (0,3 g) de anidrido succínico. A reação ocorreu em microondas, em potência máxima de 1 em 1 minuto sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 5 e ninhidrina como revelador. Ao término da reação, com tempo total de 6 minutos, o produto foi congelado, liofilizado e analisado no infravermelho e por espectroscopia de massas.

Experimento 35 (Em água - posterior adição de hidróxido de amônio - adaptação de HARRIS, 1995)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,325 g) de AL solubilizado em 10 mL de água e 6 mmol (0,6 g) de anidrido succínico. Após 120 horas de reação, adicionou-se mais 3 mmol de anidrido succínico (0,3 g) solubilizados em água. A reação permaneceu sob agitação constante à temperatura ambiente por mais 48 horas sendo acompanhada por CCD utilizando-se primeiramente como fase móvel sistema solvente 7 (adaptação WIDLER et al., 2002) e ninhidrina como revelador. Ajustou-se o pH da reação para pH 11 com NH_4OH 28-30%, e após este ajuste de pH, adicionou-se mais 5 mmol de anidrido succínico (0,5 g). A reação continuou sendo acompanhada por CCD, agora utilizando-se como fase móvel sistema solvente 8 e revelador ninhidrina. Ao término da reação, num total de 120 horas, reajustou-se o pH para pH 7 com solução aquosa de HCl 0,1 M. O produto foi liofilizado e analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 36 (Em água e hidróxido de amônio)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,325 g) de AL solubilizado em 10 mL de água e 6 mmol (0,6 g) de anidrido succínico. Ajustou-se o pH da reação para pH 11 com NH_4OH 28-30%. A reação permaneceu sob agitação constante à temperatura ambiente por 36 horas sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 8 (adaptação WIDLER et al., 2002) e revelador ninhidrina. Ao término da reação, o produto foi analisado por espectroscopia de massas.

7.1.8. Síntese do intermediário derivado de alendronato de sódio e cloreto de succinoíla

Experimento 37 (Em tetraidrofurano)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,325 g) de AL em 1 mmol (0,11 mL) de cloreto de succinoíla, em THF e em atmosfera de N_2 . A reação permaneceu sob agitação vigorosa e constante, sob refluxo por 144 horas. A reação foi acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 8 (adaptação WIDLER et al., 2002) e revelador ninhidrina. Ao término da reação o produto foi analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 38 (Em água hidróxido de amônio)

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,325 g) de AL em 6 mmol (0,7 mL) de cloreto de succinoíla. Adicionou-se NH_4OH puro. A reação permaneceu sob agitação vigorosa e constante, à temperatura ambiente por 24 horas, sendo posteriormente adicionado 10 mL de água. A reação permaneceu sob agitação por mais 12 horas sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 8 (adaptação WIDLER et al., 2002) e revelador ninhidrina. Ao término da reação o produto foi analisado por espectroscopia de massas.

7.1.9. Síntese do intermediário acetilado de nitrofural hidroximetilado

Experimento 39

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) de NFOH com em 10 mL de diclorometano (DCM) e 2 mmol (0,212g) de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 1,5 mmol (0,12mL) de cloreto de cloroacetila a temperatura ambiente. A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 12 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, precipitado e filtrado foram analisados por CCD utilizando-se mesma fase móvel e o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 40

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) de NFOH com em 5 mL de dimetilformamida (DMF) e 2 mmol (0,212g) de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e adicionou-se 1,5 mmol (0,12mL) de cloreto de cloroacetila a frio. A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 18 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, precipitado e filtrado foram analisados por CCD utilizando-se mesma fase móvel e o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 41

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,23 g) de NFOH em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 2 mmol (0,212g) de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e adicionou-se 1,5 mmol (0,12mL) de cloreto de cloroacetila a frio. A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 18 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada, precipitado e filtrado foram analisados por CCD utilizando-se mesma fase móvel e o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

Experimento 42 (Em acetonitrila e piridina)

A reação foi feita reagindo-se 0,1 mmol (0,023 g) de NFOH com 0,15 mmol (0,15 mL) de cloreto de cloroacetila a frio em 5 mL de solução ACN/Py (7:3, v,v) e 0,5 mL de solução DMF/Py (9:1, v/v). A reação permaneceu sob agitação constante, à temperatura ambiente por 60 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 1.

Experimento 43 (Em tetraidrofurano e piridina)

A reação foi realizada e analisada conforme a anterior, porém, em 5 mL de solução THF/Py (7:3, v/v) e 0,5 mL de solução DMF/Py (9:1).

Experimento 44 (Em dimetilformamida e piridina)

A reação foi realizada e analisada conforme a anterior, porém, em 5,5 mL de solução DMF/Py (9:1, v/v).

7.1.10. Síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural hidroximetilado e hemissuccinoil alendronato

Experimento 45

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,228 g) de NFOH em 10 mL de água, 5 mL de CH_2O (37%), e o pH ajustado para 7 com NH_4OH 28-30%, e 1 mmol (0,349 g) de HSAL em água. Ajustou-se o pH da reação para pH 10 com NH_4OH 28-30%. A reação permaneceu sob agitação constante à

temperatura ambiente overnight, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6 e reveladores luz de UV e ninhidrina. Depois de 24 horas de reação, a suspensão foi filtrada, precipitado e filtrado foram analisados separadamente por CCD, tendo como fase móvel sistema solvente 6, sendo o filtrado posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

7.1.11. Síntese do pró-fármaco derivado de nitrofural e hemissuccinóil alendronato

Experimento 46

A reação foi feita reagindo-se 1 mmol (0,198 g) de NF, 1 mmol (0,14 g) de carbonato de potássio (K_2CO_3), em 5 mL de água e 4 mL de CH_2O (37%). A reação permaneceu sob agitação constante à temperatura ambiente por 24 horas. Adicionou-se 10 mmol (3,49 g) de HSAL solubilizado em 5 mL de água, ajustou-se o pH para pH 9 com K_2CO_3 e adicionou-se 1 mL de CH_2O (37%). O pH foi novamente ajustado para pH 10, lentamente, com 4 mmol (0,56 g) de K_2CO_3 . A reação permaneceu sob agitação constante à temperatura ambiente por 8 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando-se como fase móvel sistema solvente 6 e reveladores luz de UV e ninhidrina. Ao final de 32 horas, a suspensão foi filtrada, precipitado e filtrado foram analisados separadamente por CCD, sendo o filtrado, posteriormente analisado por espectroscopia de massas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEJANDRE-DURAN, E.; CLARAMUNT, R.M.; SANZ, D.; VILAPLANA, M.J.; MOLINA, P.; PUEYO, C. **Mutat. Res.**, v.206, p. 193 – 200, 1988.
- ALENDRONATE – New Drugs – Reports of New Drugs Recently Approved by the FDA. S0968-0896(96)00042-9. **Bioorg. Med. Chem.**, v.4, n°. 1, p. 3-4, 1996.
- ANANDAN, J.V. Parasitic disease. In: DIPIRO, J.T. et al (Eds). **Pharmacotherapy physiological approach**. 3rd. ed. London: Appleton & Lange, 1997. p.2161-2172.
- ANDRADE, Z., A. Patologia da Doença de Chagas. Em: BRENER, Z.; ANDRADE; Z.A.; BARRAL, M. N. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.201-230.
- AUGUSTYNS, K.; AMSSOMS, K.; YAMANI, A.; RAJAN, P.K.; HAEMERS, A. Trypanothione as a target in the design of antitrypanosomal and antileishmanial agents. **Curr. Pharm. Des.**, v.7, p.1117-1141, 2001.
- BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Quim. Nova**, v.25, p.1172-1180, 2002.
- BODOR, N.; ABDELALIM, A.M. Improved delivery through biological membranes XIX: novel redox carriers for brain-specific chemical delivery systems. **J. Pharm. Sci.**, v.74, p.241-245, 1985.
- BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.3, p.43-49, 1961.
- BRENER, Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. In: CANÇADO, J.R. **Doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial de Minas Gerais, 1968. p.510-516.
- BUNDGAARD, H. **Design of prodrugs**. Amsterdam: Elsevier, 1985, p. 360.
- BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. **Drugs Fut.**, v.16, p. 443-458, 1991.
- CAMANDAROBA, E.L.; PINHEIRO LIMA, C.M.; ANDRADE, S.G. Oral transmission of Chaga's disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric

- experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.44, p.97-103, March-April, 2002.
- CASTRO, L. F. **Síntese de pró-fármaco osteotrópico derivado de naproxeno**. 2003. 116 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
 - CHUNG, M.C.; FERREIRA, E. I. O Processo de Latenciação no planejamento de fármacos. **Quim. Nova**, v.20. p.75-84, 1999.
 - CHUNG, M.C. **Planejamento e sínteses de pró-fármaco recíprocos derivados de nitrofurazone e primaquina potencialmente antichagásicos**. 1996. 196 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 - CHUNG, M.C.; MARTINELLI, T.F.; GONÇALVES, M.T.; GÜIDO, R.V.C.; VARANDA, E.A.; POLLI, M.C.; BOTELHO, K.C.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E.I. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): A new nitrofurazone prodrug. **Bioorg. Med. Chem.**, v.11, p.4779-4783, 2003.
 - CHUNG, M. C.; SILVA, A. T. A, CASTRO, L. F., GÜIDO, R. V. C., NASSUTE, J.C., FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p.155-179, 2005.
 - COURA, J.R.; FERREIRA, L.F.; SAAD, E.A.; MORTEL, R.E.; SILVA, J.R. Tentativa terapêutica com a nitrofurazona (Furacin) na forma crônica da doença de Chagas. **Hospital**, v.60, p.425-429, 1961.
 - COURA, J.R.; FERREIRA, L.F.; SILVA, J.R. Experiências com nitrofurazona na fase crônica da doença de Chagas. **Hospital**, v.62, p.957-964, 1962.
 - COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, p. 3-24, 2002.
 - CRUZ, M.L. **Preparação e análise estrutural de iminas derivadas de dextrano oxidados e antimaláricos**. 1995. 236 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 - DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A Review of the parasite diversity and the potential of the selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 98, p.1-12, 2003.

- DEVY, L.; DE GROOT, F.M.; BLACHER, S.; HAJITOU, A.; BEUSKER, P.H.; SCHEERE, H. W.; FOIDART, J.M.; NOEL, A. Plasmim-activated doxorubicin prodrugs containing a spacer reduce tumor growth and angiogenesis without systemic toxicity. **FASEB J.**, V.18, P.565-567, 2004.
- DIAS, J.C.P. Epidemiologia. Em: BRENER, Z., ANDRADE, Z.A., BARRAL, M. NETTO. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.48-74.
- DIAS, J.C.P. **Doença de Chagas**. Em: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. p. 81-111.
- DIAS, J.C.P.; COURA, JR. Epidemiologia. Em: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (Eds). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ editora, 1997. p. 33-66.
- DIAS, J.C.P.; JATENE A.D. Doença de Chagas no Brasil – situação atual e perspectivas. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, v.25, p. 6-8, 1992.
- DIEZ-PEREZ, A. Bisphosphonates. **Maturitas**, 43 Suppl. 1, S19-S26, 2002.
- DOCAMPO, R. Recent Developments in the Chemotherapy of Chaga's Disease. **Curr. Pharm. Design**, v.7, p. 1157-1164, 2001.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. The acidocalcisome. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.33, p.151-159, 2001.
- ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 2393-2404, 2004.
- FERNANDES, C.; LEITE, R.S.; LANÇAS, F.M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Quim. Nova**, v. 28, p.274-280, 2005.
- FERREIRA, H. A forma aguda da doença de Chagas tratada pela nitrofurazona. **Rev. Inst. Med. São Paulo**, v.3, p.287-289, 2003.
- FERREIRA, H. Forma aguda da doença de Chagas. **Hospital**, v.61, p.307-311, 1962.
- FERREIRA, H.; PRATA, A.; RASSI, A. Administração prolongada de nitrofurazonano tratamento de chagas aguda. **Hospital**, v.63, p.131-139, 1963.
- FIOCRUZ, 2005. Glossário de doenças - Doença de Chagas. Pesquisado em: www.fiocruz.br/ccs/glossario/chagas.htm, acessado em 20/05/2005.

- FLEISCH, H. Development of bisphosphonates. **BCR/Breast Cancer Research**, v.4, p.30-34, 2002.
- FRIIS, G.J.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P, LILJEFORDS, T., MADSEN, U., eds. **A textbook of drug design and development**. 2. ed. Amsterdam: Harwood Academic, 1996. p.351-385.
- GARZONI, L.R.; WAGHABI, M.C.; BAPTISTA, M.M. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chaga's disease. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.23, p.286-290, 2004.
- GÜIDO, R.V.C., FERREIRA, E.I., NASSUTE, J.C., VARANDA, E.A., CHUNG, M.C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofuril. **Rev. Brás.Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v.22, p 319-333, 2001.
- GUITTENS, S.A.; BANSAL, G.; ZERNICKE, R.F.; ULUDAH, H. Designing proteins for bone targeting. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.57, p.1011-1036, 2005.
- HAN, H. K.; AMIDON, G.L. Target prodrug design to optimize drug delivery. **AAPS Pharm. Sci.**, v.2, p.E6, 2000.
- HARRIS, W.T.; TENJARLA, S.N.; HOLBROOK, J.M. n-Pentyl n-acetylprolinate – a new skin penetration enhancer. **J. Pharm. Sci.**, v.84, p.640-642, 1995.
- 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.**, v.85, p. 5374-5378, 1988.
- HIRABAYASHI,H.; TAKAHASHI,T.; FUJISAKI, J.; MASUNAGA, T.; SATO, S.; HIROI, J.; TOKUNAGA, Y.; KIMURA, S.; HATA, T. Bone-specific delivery and sustained release of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, via bisphosphonic prodrug based on the Osteotropic Drug Delivery System (ODDS), **J. Control. Release**, v.70, p. 183-191, 2001.
- JOCKERS-SCHRÜBL, M.C.; SCHIMER, R.H.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Trypanothione reductase from *T. cruzi*, catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with tripanocidal compounds. **Eur. J. Biochem.**, v.180, p. 267-272, 1989.
- KIECZKOWSKI, G.R.; JOBSON, R.B.; MELILLO, D.G.; REINHOLD, D.F.; GREYDA, V.J.; SHINKAI, I. Preparation of (4-Amino-1-Hydroxybutylidini)

- bisphosphonic acid sodium salt, MK-217 (Alendronate Sodium). An improved procedure for the preparation of 1-Hydroxy-1, 1-bisphosphonic acids. **J. Org. Chem.** v.60, p. 8310-8312, 1995.
- KOROLKOVAS, A. **Essentials of medicinal chemistry**. 2nd. ed. New York: Wiley-Interscience, 1988, p.579-670.
 - KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara 2000-2001**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
 - LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi*. Em: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 8 ed. São Paulo: Atheneu, 1991. p.73-104.
 - MARTIN, M.B.; GRIMLEY, J.S.; LEWIS, J.C.; HEATH, H.T; BAILEY, B.N.; KINDRICK, H.; YARDLEY, U.; CALDERA, A.;LIRA, R; URBINA J.A.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R.; CROFT, S.L.; OLDFIELD, E. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: A potential route for chemotherapy. **J. Med. Chem.**, v.44, p.909-916, 2001.
 - MILLS, T. III; ROBERSON, C. Em: Instrumental Data for Drug Analysis. 2nd ed. New York: Elsevier, 1984, p.1628-1629.
 - MONCAYO, A. Chagas disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the America's. **Trimest. Sanit. Mond.**, v.46, p. 276-279, 1992.
 - MONTALVETTI, A.; BAILEY, B.N.; MARTIN, M.B.; SEVERIN, G.W.; OLDFIELD, E.; DOCAMPO, R. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 33930-33937, 2001.
 - NELSON, D.L.; COX, M.M. Biossíntese de Lipídios. In: **Lehninger Princípios de Bioquímica**.3 ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002. p.599-639.
 - ORIHEL, T.C.; ASH, L.A. *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei gambiense* and *T. brucei rhodesiense*. In: **Parasites in Human Tissues**. Chicago: Ed. ASCP PRESS, American Society of Clinical Pathologists, 1995. p.60-63.
 - PALLAS 3.0 – Written by CompuDrug Chemistry, Ltd. Copyright (c) 1994, 95.
 - POLLI, M. C. **Antichagásicos Potenciais: Síntese de pró-fármacos recíprocos de megazol e primaquina**. 2002. 145 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- RASSI, A.; TRANCHESI, J.; TRANCHESI, B. Doença de Chagas. In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p.675-705.
- REVISTA ÉPOCA – Dezenove pessoas foram contaminadas pela doença de Chagas em Santa Catarina. Disponível em: (acessado em 06/12/2005)
<http://revistaepoca.globo.com/Epoca/0,6993,EPT934367-1664,00.html>.
- RIBEIRO, A.F.; VOLPATO, N.M. Alendronato de sódio: metodologias para análise quantitativa. **Quim. Nova**, v. 28, p.852-858, 2005.
- RODRIGUEZ, J.B. Specific molecular targets to control tropical diseases. **Curr. Pharm. Des.**, v.7, p.1105-1116, 2001.
- SANTOS, K.S.C.R. **Membranas de liberação controlada de derivado hidroximetilado de nitrofural utilizando quitosana modificada**. 2005. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- SDR – **Strategic Direction for Research, WHO**, 2002 disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/directions.htm> (acessado em 14/02/2005).
- SEUFFERHELD, M.; VIEIRA, M.C.F.; RUIZ, F.A.; RODRIGUES, C.O.; MORENO, S.N.J; DOCAMPO, R. Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. **J. Biol. Chem.** v.278, p.29971-29978, 2003.
- SHERLOCK, I. A. Vetores. In: BRENER,Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL, M.N. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.21-47.
- SHINKAI I.; OHTA, Y. Alendronate. **Bioorg. Med. Chem.** v. 4, p. 3-4, 1996.
- SILVA, A.T.A.; CHUNG, M.C.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R. V. C.; FERREIRA, E. I. Advances in prodrug design. **Mini Rev. Med. Chem.**, v.5, p.893-914, 2005.
- SILVEIRA, H.J.; MOZART, O.N.; NORBERG, A.N.; PILE, E.A. *Trypanosoma cruzi* prevalence and clinical forms in blood donor candidates in Brazil. **Rev. Saude Publica**, v.37, p.807-809, 2003.
- SILVERMAN, R.B. **The organic chemistry of drug design and drug action**. San Diego. Academic Press, INC, 1992,. p.1-51, 352-401.

- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.
- SIMIAN, H.; ROBERT, F.; BLANK, I. Identification and synthesis of 2-heptanethiol, a new flavor compound found in Bell Peppers. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p.306-310, 2004.
- SMITH, T.P.; O'DONNELL, M.E.; O'CONNOR, M.J.; St LEDGER, J.O. β -Lactamase dependent prodrugs recent developments. **Tetrahedron**, v.56, 5699-5707, 2000.
- SINGH, G.; SHARMA, P.D. Mutual Prodrugs – a recent trend in prodrug design. **Indian J. Pharm. Sci.**, v.56, p.69-79, 1994.
- STEFFANSEN, B.; NIELSEN, C.U.; BRODIN, B.; ERIKSSON, A.H.; FROKJAER, S. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.21, p.3-16, 2004.
- SZAJNMAN, S.H.; MONTAVELTTI, A.; WANG, Y.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J.B. Bisphosphonates derived from fatty acids are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.13, p.3132-3235, 2003.
- SZAJNMAN, S.H.; RAVASCHINO, E.L.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J.B. Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1-bisphosphonates derived from fatty acids against *Trypanosoma cruzi* targeting farnesyl pyrophosphate synthase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.15, p.4685-4690, 2005.
- TDR – Training in Tropical Diseases, **Strategic Direction: Chagas Disease**, 2002. (Disponível no site: www.who.int/tdr, acessado em 01/09/2004).
- TERANISHI, K. Direct regioselective 2-O-(p-toluenesulfonylation) of sucrose. **Carbohydr. Res.** v.337, p. 613-619, 2002.
- THE MERCK INDEX, 12th ed. Publisher: Merck & Co., Rahway, New Jersey, U.S Inc. White House Station, NJ. 1996.
- 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**. 10.ed. New York: McGraw Hill, 200. p. 1059-1069.
- TRAMONTINI, M. Advances in chemistry of Mannich bases. **Synthesis**, v.12, p. 703-775, 1973.

- TRAMONTINI, M.; ANGIOLINI, L. Further advances in the chemistry of Mannich Bases. **Tetrahedron**, v.46, p.1791-1837, 1990.
- TROSSINI, G.H.G. **Antichagásicos potenciais: síntese de bases de Mannich do hidroximetilnitrofural**. 2004. 130 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- TROUET, A.; CAMPENEERE D.D.; BAURAIN, R.; ACHNEIDER, Y.J. Targeting of drugs. In: JOLLES, G., WOOLDRIDGE, K.R.H. (Eds.) *Drug design: fact or fantasy?* New York: Academic Press, 1984.p.47-72.
- URBINA, J.A., et al., *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 33609-33615, 1999.
- URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, v.19, p. 495-501, 2003.
- URBINA, J.A.; MORENO, B.; VIERKOTTER, S.; OLDFIELD, E.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BAILEY, B.N.; YAN, W.; SCOTT, D.A.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R., Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Antimicrob. Agents.** v.23, p.273-285, 2004.
- VEPSÄLÄINEN, J.J, Bisphosphonates Prodrugs. **Curr. Med. Chem.**, v.9, p. 1201-1208, 2002.
- VRUDHULA, V.M.; SVENSSON, H. P.; KENNEDY, K.A.; et al. Antitumor activities of a cephalosporin prodrug in combination with monoclonal antibody - β - lactamase conjugates. **Bioconjug. Chem.**, v. 4, p. 334-340, 1993.
- WANG, Y.; YUAN, H.; WRIGHT, S.C.; WANG, H.; LARRICK, J.W. Synthesis and preliminary cytotoxicity study of a cephalosporin-CC-1065 analogue prodrug. **BMC Chem. Biol.** v.1, 2001. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6769/1/4>
- WERMUTH, C.G. In: **Drug Design: fact or fantasy?** K. R. H. Wooldridge e G. Jolles, Eds. London: Academic Press, 1984. p.47-72.
- WERMUTH, C, G. In: **The Practice of Medicinal Chemistry.**, San Diego: Academic Press, 1996. p. 11-12, 672-715.

- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) **Reports of meeting of development of drugs against african trypanosomiasis, leishmaniasis and Chagas disease**, Geneva: UNDP/World Bank/WHO, 1990.
- WHO **Technical Report Series – Control of Chagas Disease**, Geneva, 1990.
- WHO. **Control of Chagas` disease**. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO Technical Report Series, 811:95, 1991.
- WHO. **Chagas Disease**. Disponível em:
<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm> (acessado em 10/04/2002)
- WHO. **Diseases status**, disponível em: <http://www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm> (acessado em 14/02/2005).
- WHO - Disease **Burden and epidemiological trends**. Disponível em <http://www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm> (acessado em 14/02/2005)
- WIDLER, L.; JAEGGI, K.A.; GLATT, M.; MÜLLER, K. Highly potent bisphosphonates. From Pamidronate Disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). **J. Med. Chem.**, v.45, p.3721-3738, 2002.
- WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5th ed., Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
- WOLFF, M.E. (Ed). **Burger's medicinal chemistry and drug discovery. Principles and practice**. New York: John Wiley & sons. 1995, v.1, p.1064.
- ZOU, Y.; KHOR, E. Preparation of C-6 chitin derivates under homogenous conditions. **Biomacromol.**, v.6, p.80-87, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)