

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PLANEJAMENTO DE NOVOS AGENTES ANTI-CHAGÁSICOS: SÍNTESE
E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NUCLEOSÍDEOS COMO INIBIDORES
DA ENZIMA GLICERALDEIDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE
GLICOSSOMAL (gGAPDH) DE *Trypanossoma cruzi*

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO SUBMETIDO A UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA PARA A OBTENSÃO DO GRAU DE BACHAREL EM QUÍMICA

ALUNO: RODRIGO A. M. BALDISSERA
ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcus Mandolesi Sá

Florianópolis – SC, Fevereiro de 2003.



03739044

Dedico este trabalho aos meus pais José e Neiva e à minha namorada Rafaela, que são as pessoas que fazem minha vida ter sentido.

AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. Marcus Mandolesi Sá, por todo o conhecimento repassado à mim, pelas longas horas de discussão e por todo o apoio e incentivo nas horas de dúvida, além da amizade que se formou e se tornou maior a cada dia.
- Aos meus pais Seu Zéca e Dona Neiva que sempre me apoiaram e me incentivaram a enfrentar os meus problemas apenas como se fosse mais um. E por todo o amor e carinho por eles transmitido.
- A minha namorada Rafaela, sem a qual eu não teria chego até aqui, por ter me apoiado e me entendido desde o começo e por ter feito a minha vida tomar um norte, me ensinando o sentido da palavra Amar.
- Aos meus amigos, Malaka, Fábio, Binho, Marcos, Giba pelos baletaços tomados juntos e pelas horas de discussão tentando resolver os problemas do mundo ou criando mais problemas.
- Aos colegas do curso de química, por todos os momentos legais e de entusiasmo que passamos juntos e por todos os momentos em que discutimos, aprofundando o nosso saber.
- Aos meus irmãos que sempre me apoiaram e meus avós que sempre rezaram por mim.
- Aos meus colegas de grupo, Gaúcho, Gugu, Jú, Natália e de laboratório Alemão, Móra, prof. Joussef, Luca, Dali, Bigode, Villa, Kely, Carol, Paulinha por todos os momentos juntos e pela amizade que se formou entre nós.
- Ao CNPQ-Pibic pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica.
- A Universidade Federal de Santa Catarina a ao Departamento de Química pela oportunidade.
- A FETICOM pelo empréstimo de suas dependências.
- E ao cara lá de cima, DEUS, que sempre olhou por mim e me guiou para o caminho certo.

SUMÁRIO

ÍNDICE ANALÍTICO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Caracterização do problema.....	1
1.2 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	2
1.3 Planejamento racional de fármacos.....	4
1.4 Seleção de moléculas como possíveis inibidores da enzima alvo GAPDH.....	9
2 JUSTIFICATIVA.....	12
3 OBJETIVOS.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 Tentativa de acilação da posição 5'- da inosina.....	15
4.2 Benzoilação seletiva das posições 2' e 3' da inosina.....	16
4.3 Acilação das hidroxilas do anel ribosídeo do nucleosídeo.....	18
4.3.1 Acilação das hidroxilas utilizando-se anidrido acético.....	19
4.3.2 Acetilação das hidroxilas utilizando-se cloreto de 4-clorobenzoila.....	20
4.4 Substituição do grupamento OH por SH na posição 6- do anel purina.....	21
4.4.1 Tionação das triacilinosinas 8 e 9.....	21
4.5 Desproteção dos derivados da tioinosina.....	23
4.5.1 Solvólise a partir de cloreto de acetila.....	24
4.5.2. Solvólise a partir de NaOH e NaHCO ₃	25
4.5.3 Solvólise catalisada por KCN.....	25
4.5.4 Solvólise a partir de amônia.....	28
4.5.5 Solvólise através de trietilamina (TEA).....	30
4.6 Considerações sobre a preparação de tioinosina 13 a partir da inosina 1.....	31
5 PARTE EXPERIMENTAL.....	33

5.1 Reagentes e instrumentação.....	33
5.2 Procedimento para as reações.....	33
5.2.1 Preparação da 2',3'- O-dibenzoilinosina 7.....	33
5.2.2 Preparação da 2',3',5'-O-triacetilinosina 8.....	34
5.2.3 Preparação dos derivados de tióis triacilados.....	35
5.2.3.1 Preparação da 2',3',5'-O-triacetiltioinosina 10.....	35
5.2.3.2 Preparação da 2',3',5'-O-tri-4-clorobenzoiltioinosina 11.....	35
5.2.4 preparação da 5'-O-benzoiltioinosina 14.....	36
5.2.5 Preparação da tioinosina 13.....	37
5.2.5.1 Solvólise utilizando NH ₃ /MeOH.....	37
5.2.5.2 Solvólise utilizando TEA/EtOH/H ₂ O.....	38
6 CONCLUSÃO.....	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXOS.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Vista lateral do barbeiro fazendo uma refeição sanguínea e excretando.....	4
Figura 2 - Fosforilação oxidativa do D-gliceraldeido-3-fosfato (GAP) para 1,3-difosfoglicerato (DPG) a partir de fosfato inorgânico e da catálise com GAPDH.....	5
Figura 3: (a) Adenosina ligando-se às cavidades da gGAPDH de <i>T. brucei</i> (b) Adenosina ligando-se às cavidades na GAPDH humana (c) 2'-desoxi-2'-(3-metoxibenzamido)adenosina.....	6
Figura 4: Representação espacial da adenosina ligando-se às cavidades da gGAPDH de <i>T. brucei</i>	4
Figura 5 - Representação 3D da estrutura da enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	9
Figura 6 - Derivados de nucleosídeos sintetizados como inibidores da gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	10
Figura 7 – 2',3'-O-dibenzoilinosina.....	18
Figura 8 – Estrutura da 5'-O-benzoiltioinosina.....	27

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Tentativa de síntese dos derivados 5'- acilados.....	15
Esquema 2 – Acilação da inosina 1.....	19
Esquema 3 – Síntese dos derivados da tioinosina.....	21
Esquema 4 – Solvólise dos derivados triacilados.....	23
Esquema 5 – Curso da reação de desacilação utilizando KCN como catalisador.....	26
Esquema 6 – Curso para as hidrólises seletivas.....	28
Esquema 7 – Rota proposta para a preparação de tioinosina 13.....	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Inibição seletiva de GAPDH de parasitas por derivados de 2'- desoxi-2'-(3-metoxibenzamido)adenosina (IC50 em $\mu\text{mol L}^{-1}$).....	7
Tabela 2 – Compostos submetidos a reação de solvólise e suas respectivas condições reacionais.....	23

SIGLAS E ABREVIATURAS

AcOH – Ácido acético;

AcOEt – Acetato de etila;

ATP – Adenosina Trifosfato;

d – Dupleto;

dd – Duplo dupleto;

DMF – N,N'-dimetil formamida;

DMSO – Dimetil sulfóxido;

EtOH – Etanol;

GAPDH – Gliceraldeido-3-fosfato-desidrogenase;

gGAPDH – Gliceraldeido-3-fosfato-desidrogenase glicossomal;

IC₅₀ – Concentração necessária para 50% de inibição enzimática;

IV – Espectroscopia na região infravermelho;

m – Multipleteo;

MeOH – Metanol;

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo;

P.f. – Ponto de fusão;

Py – piridina;

Rend. – Rendimento;

R_f – Fator de retenção

RMN-¹H – Ressonância Magnética nuclear de próton;

RMN-¹³C – Ressonância Magnética nuclear de carbono 13;

s – Singleto;

t.a. – Temperatura ambiente;

TEA – Trietilamina;

δ - Deslocamento químico;

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e representa um grave problema de saúde em países tropicais como o Brasil. A técnica de planejamento racional de fármacos tem sido aplicada no desenho de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal (gGAPDH) de *T. cruzi*, uma proteína essencial ao parasita. Através da determinação da estrutura de gGAPDH por difração de Raio-X, modelagem molecular e *docking* da região do sítio do co-fator NAD⁺, um conjunto de moléculas representando potenciais inibidores de gGAPDH foi selecionado para síntese, destacando-se alguns derivados de nucleosídeos purínicos. Dentre os análogos sintetizados e testados, aqueles contendo grupos aromáticos nas posições 2'-, 3'- e 5'- apresentaram atividade inibitória elevada (IC₅₀ = 70-250 μM).

Estes resultados conduziram ao planejamento de uma nova geração de nucleosídeos como potenciais inibidores de gGAPDH. O presente trabalho envolve a síntese de análogos de nucleosídeos e posterior avaliação inibitória frente à gGAPDH de *T. cruzi*. Os alvos sintéticos são derivados de inosina e 6-tioinosina contendo grupos aril, seletivamente substituídos no anel ribofuranosídeo. As metodologias sintéticas que estão empregadas neste trabalho estão bem estabelecidas na literatura e envolvem modificações seletivas sobre os vários grupos funcionais presentes, além de química de grupos protetores.

Para a preparação dos derivados foram efetuadas reações de benzoilação seletiva na posição 5'- do anel tetrahydrofurano, e também foram preparados derivados seletivamente benzoilados nas posições 2'- e 3'-, obtendo-se assim, derivados seletivamente substituídos nas posições 5'- e 2'-, 3'-. Além do preparo da tioinosina que servirá como precursor sintético para uma vasta coleção de derivados de tióis seletivamente substituídos.

Com a síntese destes análogos de nucleosídeos para posterior avaliação da atividade inibitória frente à gGAPDH, pretende-se obter um grupo de inibidores potentes e aptos para desenvolvimentos subsequentes até tornarem-se candidatos a testes clínicos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema

Apesar dos vários avanços da medicina moderna, a doença de Chagas ainda se apresenta como um problema de saúde extremamente importante nos dias de hoje. Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem entre 16 e 18 milhões de pessoas no mundo que encontram-se infectadas pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*,¹⁻³ causador da doença de Chagas, ocorrendo anualmente cerca de 21000 mortes relacionadas com a infecção.⁴ Esta é uma endemia que possui várias relações com o Brasil: foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, estende-se basicamente do México até o sul da Argentina e atinge principalmente populações negligenciadas economicamente.⁵ Estima-se que existam 100 milhões de pessoas, ou seja, em torno de 25% da população da América Latina, correndo o risco de adquirir a doença de Chagas. No Brasil há cerca de 2 milhões de infectados.⁶

Há dois estágios da doença em humanos: o estágio agudo, que aparece logo após a infecção e o estágio crônico, que pode levar alguns anos até apresentar os sintomas. As lesões causadas na fase crônica são irreversíveis e afetam freqüentemente órgãos como o coração, esôfago, cólon e o sistema nervoso periférico. Após vários anos de um período assintomático, 27% das pessoas infectadas desenvolvem problemas cardíacos que podem levar a uma repentina parada do coração, 6% apresentam problemas digestivos, e 3% irão indicar sinais de distúrbios no sistema nervoso periférico.⁷

Cabe ressaltar que a transmissão natural do *T. cruzi* a humanos está associada, em grande extensão, com a picada de um inseto-vetor conhecido popularmente como *barbeiro*¹⁻³ (outro nome para o triatomina: *chupão*).⁸ Este inseto deposita excremento contendo formas infecciosas de tripomastigotas metacíclicas, que então contaminam a ferida formada a partir da sua picada.³

As migrações dos centros rurais para os urbanos, que ocorreram durante as décadas de 70 e 80 na América Latina, mudaram o padrão epidemiológico da

doença de Chagas e transformaram-na em um tipo de infecção urbana, que pode ser transmitida através de transfusão sanguínea. A infecção sanguínea em bancos de sangue de algumas cidades selecionadas do continente americano varia entre 3 e 53%, mostrando que a quantidade de sangue contaminado por *T. cruzi* é maior que a quantidade contaminada por HIV e pelos vírus causadores das hepatites tipo B e C, na América.⁷

Embora os programas de controle dirigidos ao decréscimo da transmissão do *T. cruzi* a seres humanos a partir da redução da população do inseto-vetor tenham tido sucesso em algumas áreas da América Latina, um controle efetivo não é atingido na maioria das regiões de endemicidade. Vale ainda salientar que, apesar do considerável trabalho experimental desenvolvido, ainda não existe um tratamento terapêutico eficiente para a doença, já que as drogas mais utilizadas – Lampit (nifurtimox) e Rochagan (benzonidazol) – possuem eficácia duvidosa e encontram-se sob intensa avaliação, além de apresentarem vários efeitos colaterais pronunciados.¹⁻³ Por todos estes motivos, é necessário que sejam feitas pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novas drogas no combate à doença de Chagas.

1.2 Ciclo de vida do *T. cruzi*

O *T. cruzi* pertence à família *tripanosomatidae*, que inclui desde protozoários que não provocam doenças nos animais vertebrados, até formas altamente patogênicas, como é o caso do *T. brucei*, *T. brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense* (responsáveis pela doença do sono ou tripanosomíase africana), transmitidos pela mosca tsé-tsé, além de outras doenças causadas por *tripanosomatidae* como o próprio *T. cruzi* (responsável pela doença de Chagas) e *Leishmania mexicana* (causador das leishmanioses cutânea e visceral).^{3,9-11} Todos os protozoários desta família são flagelados, isto é, possuem um filamento altamente móvel responsável por sua locomoção, o flagelo.³

Ao longo de seu ciclo evolutivo, os *tripanosomatídeos* sofrem profundas alterações de forma, as quais refletem suas adaptações ao meio em que se

localizam. Essas formas recebem nomes diferentes em função de seu aspecto geral, da maneira como o flagelo emerge do corpo celular e da posição relativa de duas importantes estruturas intracelulares: o núcleo e o cinetoplasto. No caso do *T. cruzi*, são encontradas três formas básicas. A forma *tripomastigota* é a mais alongada, e tem por característica a incapacidade de divisão extracelular. É altamente especializada em infectar as células do hospedeiro vertebrado. A forma *epimastigota* tem grande potencial de divisão no hospedeiro invertebrado (o barbeiro), mas é incapaz de infectar o hospedeiro vertebrado. A terceira forma do *T. cruzi* é arredondada, apresentando um flagelo curto, com pouca mobilidade, sendo chamada de *amastigota*. É a forma característica encontrada no hospedeiro vertebrado, apresentando um alto potencial de divisão celular.³

O ciclo de vida e propagação do *T. cruzi* ocorre da seguinte maneira: o inseto-vetor alimenta-se de sangue contendo o parasita na forma *tripomastigota*, transformando-se em *epimastigota* e multiplicando-se no interior do barbeiro. Passadas 3 a 4 semanas, após inúmeras multiplicações e nova transformação para *tripomastigota* (forma infecciosa do hospedeiro vertebrado), o parasita aloja-se no intestino do vetor, aguardando uma nova refeição do inseto e possível excreção (Figura 1), quando um novo hospedeiro vertebrado poderá ser infectado, através da mucosidade superficial, conjuntiva (olhos), ou por orifícios na pele (arranhões, ou na própria picada do barbeiro). Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, o parasita em sua forma *tripomastigota* pode ser fagocitado por macrófagos ou ainda penetrar diretamente nas células, onde são transformados em *amastigotas*, que após vários ciclos de multiplicação, transformam-se novamente em *tripomastigotas*. A célula hospedeira então rompe-se, liberando o parasita nos tecidos adjacentes e na circulação sangüínea. O ciclo completa-se quando *tripomastigotas* presentes na circulação do hospedeiro vertebrado são ingeridos numa nova refeição sangüínea por outro inseto-vetor e transformados em *epimastigotas* no seu interior.¹²



Figura 1- Vista lateral do barbeiro fazendo uma refeição sanguínea e excretando.

1.3 Planejamento racional de fármacos

O processo de descoberta de novos fármacos 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, os quais, além da biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico, seguro e confortável, incluem ainda a toxicidade e o metabolismo. O planejamento racional de novos fármacos tornou-se uma realidade nos dias de hoje face aos impressionantes avanços científico-técnicos observados em diversas áreas, como a biologia molecular e estrutural, química computacional e química combinatória, as quais atuando juntas estão viabilizando bioensaios robotizados de vastas quimiotecas que, provavelmente, desenharão novos paradigmas para o processo de descoberta de novos agentes terapêuticos.¹³

Em função da multiplicidade de fatores envolvidos na resposta terapêutica de uma substância exógena como o fármaco, necessita-se de uma complexa tríade para o desenvolvimento racional de novos fármacos, a qual inclui: Química Orgânica – Farmacologia – Química Computacional.¹³ Além disso o planejamento racional de fármacos ainda emprega tecnologia de ponta na área de Química Medicinal, como cristalografia de Raio-X de proteínas, biologia molecular, química combinatória, modelagem molecular e ensaios biológicos de alta eficiência.

A técnica de planejamento racional de fármacos, baseado em estruturas tridimensionais de proteínas, tem sido utilizada mundialmente por vários grupos de

pesquisa e também por companhias farmacêuticas, envolvendo vários bilhões de dólares e ocupando milhares de pesquisadores titulados, de diferentes áreas, na busca por substâncias ativas biologicamente.^{5,9-11,13-16} Essa nova metodologia permite o acesso mais rápido e mais eficiente a compostos que são potencialmente aptos ao desenvolvimento, até tornarem-se drogas mais efetivas e seguras. É uma técnica que se baseia na inibição ou estimulação da atividade biológica de macromoléculas (proteínas e ácidos nucleicos), responsáveis por várias doenças.

Em 1977, Opperdoes e Borst descobriram que na corrente sanguínea dos parasitas da família *Trypanosomatidae* existe uma organela, o glicossoma, que é responsável pela glicólise. Estes parasitas não possuem um ciclo de Krebs funcional,¹⁷ sendo portanto, extremamente dependentes da glicólise para a produção de ATP. Esta observação sugere que as enzimas glicolíticas sejam alvos atrativos para o desenho de drogas tripanocidas.

A enzima gliceraldeído-3-fostato desidrogenase glicossomal (gGAPDH) de *T. cruzi* é um homotetrâmero de massa molecular aproximadamente 156 kDa, formada por quatro sub-unidades, cada qual apresentando duas funções: a função NAD⁺ ou N-terminal e a função catalítica ou C-terminal. Esta enzima é responsável pela catálise da fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fostato (GAP) para 1,3-difosfoglicerato (DPG) (Figura 2).¹⁷

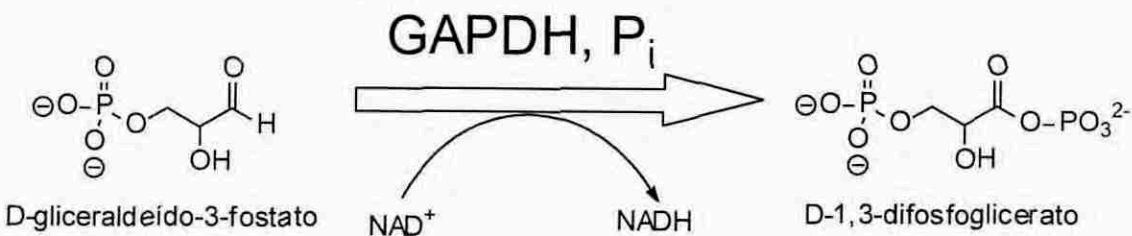


Figura 2 - Fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fostato (GAP) para 1,3-difosfoglicerato (DPG) a partir de fosfato inorgânico e da catálise com GAPDH.

Verlinde *et al.*,^{4,5,9-11,18} vêm sintetizando moléculas como inibidores da enzima gGAPDH de *T. brucei* e *L. mexicana*, em busca de novos fármacos para a doença do sono. Eles elucidaram a estrutura cristalina de gGAPDH de *T. brucei*, e compararam às estruturas tridimensionais das enzimas homólogas humanas.

Apesar da alta similaridade estrutural na região do sítio ativo, a cavidade da adenosina para o co-fator NAD⁺ apresentou diferenças, abrindo perspectivas para a seleção de inibidores seletivos. A principal diferença, é a presença de uma cavidade hidrofóbica de cerca de 9 Å de largura, próxima a hidroxila O2' do fragmento adenosina para a gGAPDH de *T. brucei*, ausente na enzima humana devido a ocupação dessa região por um resíduo de isoleucina 37 (Figura 3a-b). Através da exploração desse estudo, foram criados análogos de adenosina que ocupariam esta cavidade e manteriam a ligação hidrogênio com o carboxilato da aspargina (Asp 37), além de atuarem em interações hidrofóbicas. O derivado 2'-desoxi-2'-(3-metoxibenzamido)adenosina (Figura 3c) apresentou inibição frente a gGAPDH de *T. brucei* 45 vezes maior que a adenosina e não apresentou nenhuma evidência de bloqueio na GAPDH humana. Assim, análogos de adenosina podem se tornar fortes candidatos a sucessores para inibidores seletivos.⁴

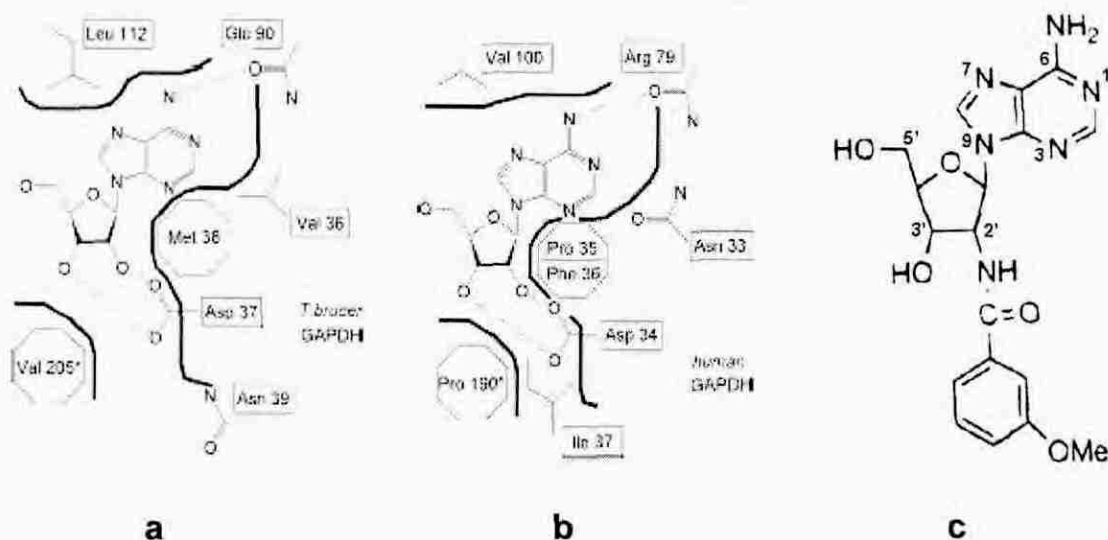


Figura 3: (a) Adenosina ligando-se às cavidades da gGAPDH de *T. brucei* (b) Adenosina ligando-se às cavidades na GAPDH humana (c) 2'-desoxi-2'-(3-metoxibenzamido)adenosina.

Após a síntese de várias moléculas na tentativa de um aumento da inibição, Verlinde *et al* concluíram que derivados da adenosina que contêm um grupo

substituente em N6 formam estruturas que favorecem a afinidade, aprimorando o *design* para novas moléculas. O átomo em N6 é adjacente a duas áreas hidrofóbicas na superfície da proteína, uma formada pelos sítios ligados a leucina (Leu 112), fenilalanina (Phe 113) e arginina (Arg 91), outra por metionina (Met 38) e arginina (Arg 91) (Figura 4).⁴

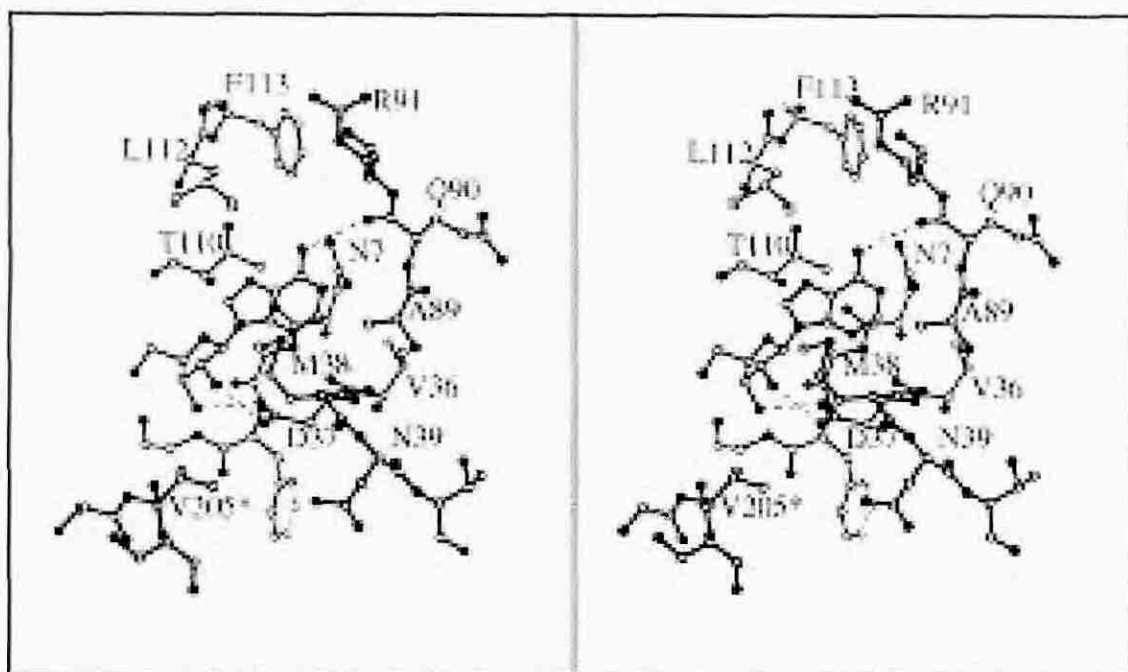


Figura 4: Representação espacial da adenosina ligando-se às cavidades da gGAPDH de *T. brucei*.

A partir destes dados, foram sintetizados e testados vários análogos da adenosina e os que apresentaram resultados de inibição mais expressivos estão expostos na Tabela 1,⁴ confirmando a seletividade proposta.

Tabela 1: Inibição seletiva de GAPDH de parasitas por derivados de 2'-desoxi-2'-(3-metoxibenzamido)adenosina (IC₅₀ em $\mu\text{mol L}^{-1}$).

N6-substituente	<i>L. Mexicana</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	Humano
benzil	16	159	160	>530 ^a
2-metilbenzil	4	40	35	>270 ^a
1-naftalenometil	0,2	2	5	>200 ^a

^a insolúvel acima desta concentração

Devido a grande proximidade entre as estruturas das enzimas gGAPDH de *T. cruzi* e *T. brucei* (90% semelhantes), Oliva *et al* propuseram que a gGAPDH de *T. cruzi* (Figura 5) poderia ser utilizada para a busca computacional de inibidores específicos para a doença de Chagas.¹⁷

No sítio ligante do cofator NAD⁺ (ou N-terminal) das enzimas GAPDH estudadas, duas regiões são consideradas atrativas para o desenho de inibidores específicos. Uma região que merece destaque é onde estão presentes os resíduos leucina e glicina, próximos a N6 no anel purínico, região que se conserva tanto para as gGAPDH de *T. cruzi* como de *T. brucei* e que resulta em diferenças de polaridade e volume, quando comparados com o correspondente resíduo na enzima humana, sendo um bom sítio para o desenho de inibidores específicos.

A outra região do sítio ligante do cofator NAD⁺, também considerada interessante para o estudo computacional de novas drogas inibidoras de gGAPDH, é a interface formada por duas unidades vizinhas na parte ativa do tetrâmero, que também está próxima ao sítio de ligação da porção adenosina do cofator NAD⁺. Nesta região, uma cavidade hidrofóbica de 10 Å de largura é formada na enzima tripanossomial, porém, é ausente na enzima humana, graças a uma diferença na principal porção de aminoácidos causada pela presença do aminoácido prolina.¹⁷ Os resíduos que participam deste sítio na gGAPDH de *T. cruzi* são metionina, valina e ácido aspártico, enquanto na homóloga humana são encontrados fenilalanina, prolina e principalmente isoleucina, a qual representa mudanças estruturais bastante significativas na comparação das enzimas, por atuar como um bloqueador na cavidade da enzima humana.

Estes resultados foram similares aos encontrados na comparação entre gGAPDH de *T. brucei* e a GAPDH humana, levando a crer que derivados homólogos de adenosina poderiam fornecer interessantes resultados de inibição e seletividade.^{17,19,20}

Portanto, compostos que preencham o sítio de ligação NAD⁺, e ainda apresentem substituintes volumosos capazes de explorar a cavidade hidrofóbica adjacente na enzima do parasita, possibilitando interações favoráveis com

gGAPDH de *T. cruzi*, mas reduzida afinidade com GAPDH humana, podem fornecer resultados promissores quanto à seletividade na inibição.



Figura 5 - Representação 3D da estrutura da enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

1.4 Seleção de moléculas como possíveis inibidores da enzima alvo GAPDH

Como foi comentado na seção 1.3, existem diferenças significantes entre as enzimas GAPDH humana e tripanossomial. Estas diferenças estão de acordo com a observação de que a afinidade do NAD^+ pela gGAPDH de *T. cruzi* é 5-10 vezes menor do que pela respectiva enzima encontrada nos seres humanos.¹⁷ Este fato foi de suma importância para o objetivo de sintetizar moléculas baseadas no desenho de inibidores seletivos da enzima gGAPDH.

Desta forma, grupos de compostos foram selecionados pelo método de busca computacional utilizando o programa DOCK 3.5.¹⁹⁻²¹ O programa DOCK é um software computacional em 3D que utiliza parâmetros estéricos e eletrônicos para mapear a topografia do sítio ativo de uma enzima, identificando os aminoácidos envolvidos no reconhecimento molecular de ligantes. A partir de um banco de dados hipotético contendo as propriedades conformacionais de compostos estruturalmente diversos, o programa pontua e classifica cada um

desses possíveis inibidores com base nas forças intermoleculares envolvidas entre a enzima e os grupos farmacofóricos presentes no ligante, como ligações-hidrogênio e interações iônicas, dipolares e hidrofóbicas.

A partir deste estudo, compostos que se destacaram como candidatos a inibidores de gGAPDH de *T. cruzi* foram os derivados dos nucleosídeos inosina **1** e guanosina **2** (Figura 6). Os compostos **1** e **2** são comercialmente disponíveis e foram empregados na preparação de um grupo representativo de nucleosídeos. Todos os derivados sintetizados^{20,22} foram posteriormente submetidos aos testes de inibição enzimática frente à enzima alvo.^{23,24}

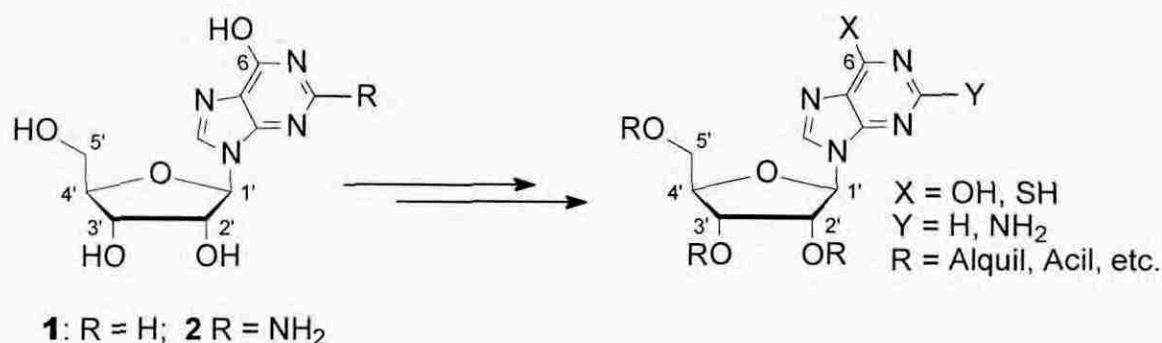


Figura 6 - Derivados de nucleosídeos sintetizados como inibidores da gGAPDH de *T. cruzi*.

Os resultados apresentados por estes nucleosídeos mostraram porcentagens de inibição de gGAPDH significativas. Alguns destes derivados como os triacilinosina (X = OH; Y = H; R = 4'-ClPhCO, 3',5'-di(NO₂)PhCO) exibem resultados de 30-50% de inibição em concentração na faixa de 150-200 μM, indicando que os nucleosídeos contendo grupos aromáticos nas posições 2'- e 3'- do anel tetraidrofurano apresentam-se como bons protótipos de inibidores. Já o derivado tribenzoiltioinosina (X = SH; Y = H; R = PhCO) aumentou a atividade inibitória sensivelmente, destacando-se como o mais ativo (IC₅₀ = 82 μM). Entretanto, o derivado triacetiltioinosina (X = SH; Y = H; R = CH₃CO) não apresentou atividade inibitória, sugerindo que apenas a presença do grupo tiol no anel purina não é suficiente para a atividade observada para tribenzoiltioinosina. De fato, nucleosídeos que não possuem grupos aril nas posições 2'- e 3'- também

não apresentaram inibição frente à gGAPDH. Outras modificações no anel purina também não resultaram em aumento da atividade inibitória.

Em suma, a presença de grupos aril nos derivados de nucleosídeos parece ser necessária para que a atividade inibitória seja observada, sugerindo que estes grupos aromáticos devem possuir uma maior complementaridade estereoeletrônica com o sítio ativo da enzima.²² Além disso, constata-se que a presença de um grupo tiol (-SH) na posição 6- do anel purínico, como na tribenzoiltioinosina, aumenta sensivelmente a atividade inibitória.²⁰

2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas representa um grave problema de saúde pública para o Brasil, sendo responsável por dezenas de milhares de óbitos por ano, apenas em nosso país. Este fato demonstra claramente a importância de se atacar o problema com propostas diferentes e abordagens modernas e efetivas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Como descrito por Verlinde *et al*,^{4,9,10} derivados da adenosina que contêm um grupo substituinte em N6 ou que são seletivamente benzoilados formam estruturas que favorecem a afinidade, aprimorando o *design* para novas moléculas, entretanto, para o desenvolvimento destes derivados são necessárias várias etapas, o que dificulta os métodos de preparação tornando-se muito caro. Devido as proximidades entre as enzimas gGAPDH de *T. cruzi* e *T. brucei*, Oliva *et al* propuseram que a gGAPDH de *T. cruzi* poderia ser utilizada para a busca computacional de inibidores específicos para a doença de chagas.¹⁷ Desta forma, grupos de compostos foram selecionados pelo método de busca computacional utilizando o programa DOCK 3.5¹⁹⁻²¹ que apontou a inosina como um dos candidatos a inibidores de gGAPDH de *T. cruzi*.

O uso de inosina como precursor sintético para derivados de nucleosídeos seletivamente substituídos, merece destaque pelo fato de ser um reagente mais acessível quando comparado com adenosina e tioinosina, além de serem sintetizados a partir de reagentes comercialmente disponíveis, através da proposição de rotas sintéticas e de métodos de proteção e desproteção²⁶ descritos na literatura.²⁷⁻³⁶ Todavia, constata-se que a presença de um grupo tiol (-SH) na posição 6- do anel purínico, aumenta sensivelmente a atividade inibitória.²⁰

A preparação direta de derivados contendo o grupo tiol em N6 e contendo grupos aromáticos seletivamente nas posições 2'-, 3'- e 5'- da porção ribosídeo do nucleosídeo apresenta várias dificuldades, como síntese em várias etapas e reagentes pouco acessíveis. Por isso, foram sintetizados precursores, como os derivados da triacilinosina, com o propósito de se fazer a hidrólise dos grupos protetores, obtendo-se assim a tioinosina, que servirá como o principal precursor

sintético para derivados tribenzoilados de tioinosina através do uso de metodologias simples e baratas.

3 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho envolve a síntese de inibidores seletivos da enzima gGAPDH de *T. cruzi*, planejada a partir dos resultados observados nos testes de inibição enzimática, feitos com moléculas selecionadas a partir do *docking* (seção 1.3). Com isso, serão sintetizados derivados da inosina contendo grupamentos aromáticos seletivamente substituídos nas posições 2'-, 3'- e 5'-, da porção ribosídeo da inosina através da proposição de rotas sintéticas e de métodos descritos na literatura.

Após serem feitos os derivados da inosina seletivamente substituída, será proposta uma rota sintética para a preparação da tioinosina a partir de inosina. Através de métodos de proteção e desproteção efetuando-se a proteção da inosina com diferentes grupos substituintes para posterior tionação dos derivados triacilados.

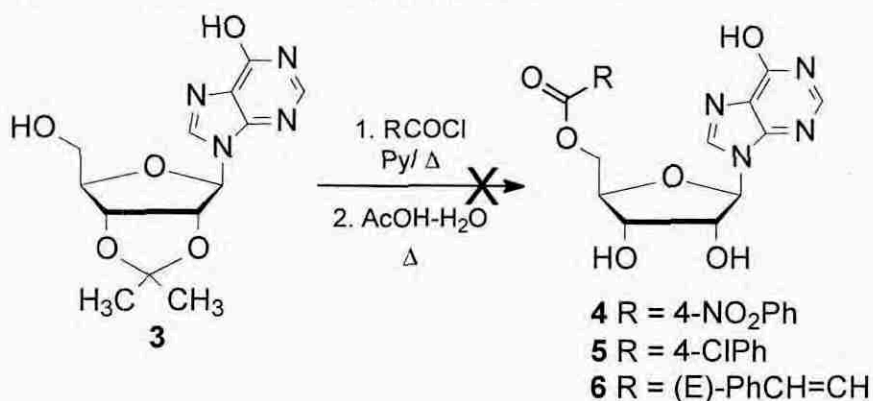
Para a desproteção destes derivados triacilados serão estudados métodos de solvólise descritos na literatura com o intuito de se propor um método de desproteção simples, barato e que requeira condições de reação brandas. Desta forma o custo e o tempo de preparação de derivados de tioinosina seletivamente substituída será menor, assim poderão ser sintetizadas mais facilmente moléculas que poderão ser submetidas a testes de inibição enzimática frente a gGAPDH de *T. cruzi*.

Através da tioinonisa também serão sintetizados derivados de tióis com a finalidade de se obter um banco de moléculas que estarão aptas não somente para a inibição frente a gGAPDH, mais sim biologicamente ativos para outros tratamentos terapêuticos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tentativa de acilação da posição 5'- da inosina

Para efetuar as etapas de benzoilação seletiva da posição 5'-, do anel tetraidrofurano da inosina, foram empregados métodos descritos na literatura,²⁷ onde usava-se como precursor da reação o reagente 2',3'-O-isopropilidenoinosina **3**, já preparado pelo grupo de trabalho,²⁷ empregando como agentes acilantes cloretos de ácido em piridina e subsequente hidrólise ácida do grupo isopropilideno com ácido acético aquoso (Esquema 1).



Esquema 1 – Tentativa de síntese dos derivados 5'- acilados.

Na tentativa de preparação dos compostos **4**, **5** e **6** o precursor isopropilidenoinosina **3** não apresentou boa solubilidade no meio reacional, dificultando o desenvolvimento da reação. Na reação efetuada para uma tentativa de se obter o composto **4** obteve-se um produto que apresentou um espectro de Infra Vermelho (IV) com as bandas pouco definidas para o produto esperado, em vista disto, essa síntese foi descartada.

Para a tentativa de preparação do composto **5**, usando-se como reagente de partida o cloreto de 4-clorobenzoíla, não se observou a formação de produto através das análises dos espectros de IV, obtendo-se no meio reacional, somente

o reagente de partida e o respectivo anidrido 4-clorobenzóico, que foi separado da mistura através de filtração e lavagem com uma solução de H₂O/NaHCO₃ 1:1 e foi confirmado pelo ponto de fusão, P.f. do anidrido obtido no meio reacional, 189 °C, (P.f.²⁸ = 194 °C).

A reação entre isopropilidenoinosina **3** e cloreto de cinamoíla na tentativa de preparação do composto **6**, também não foi efetiva. O resíduo amorfo resultante da reação apresentou coloração escura, não sendo solúvel em solventes orgânicos e apresentando ponto de fusão acima de 270 °C, valor muito elevado para derivados de inosina seletivamente acilados na posição 5'. Cabe ressaltar que devido a seu baixo ponto de fusão e alto ponto de ebulição, o cloreto de cinamoíla foi utilizado sem qualquer purificação, devido a dificuldade encontrada para sua recristalização ou destilação.

4.2 Benzoilação seletiva das posições 2' e 3' da inosina

Como descrito por Kozai *et al.*,²⁹ a acilação seletiva de polióis apresenta algumas dificuldades devido a similaridade na reatividade das hidroxilas. Procurando contornar estas dificuldades, foram efetuados métodos de benzoilação da 6-cloroinosina através de tratamento com agentes acilantes na presença de bases orgânicas como: Bu₃N, Et₃N, (iPr)₂NH e NH₃, ou inorgânicas como: Na₂CO₃ e NaOH em soluções aquosas, resultando em compostos 2',3'-diacilados. Estas reações têm como vantagem a ausência de piridina como solvente e promotor da reação, bem como a não necessidade de aquecimento, tornando este método para reação de benzoilação seletiva mais rápido e mais limpo. O produto da reação resulta numa mistura de compostos mono- e dibenzoilados, os quais têm que ser separados através de coluna cromatográfica, sendo um fator negativo para o método de preparação, já que o mesmo deve ser fácil e rápido. Entretanto, a ausência de piridina e aquecimento na preparação torna o método bastante conveniente.

Para proceder a reação, além de solubilizar, o cloreto de ácido com a solução aquosa de acetonitrila é necessário que se faça uma escolha adequada

da base que será usada, pois os rendimentos de conversão da reação são altamente dependentes da mesma. A remoção do próton de 2'-OH é a etapa inicial da benzoilação, e por isso, é necessário uma base efetiva na sua remoção.²⁹

Seguindo-se a metodologia descrita anteriormente, foi realizada a benzoilação da inosina em solução aquosa de acetonitrila 67% na presença de K_2CO_3 . Para a benzoilação seletiva foram necessários apenas 1:20 h de reação, onde o acompanhamento foi feito por cromatografia de camada delgada que mostrou uma diferença significativa entre o R_f do meio reacional e o R_f do reagente. Após o tratamento da reação, o resíduo foi separado em coluna cromatográfica e as frações resultantes da coluna também foram analisadas através de cromatografia de camada delgada, as quais resultaram em três conjuntos de frações pelas aproximações dos fatores de retenção (R_f). Após a recristalização dos produtos, foram obtidos os pontos de fusão e os respectivos espectros de IV das três frações. Com estes dados, os dois primeiros conjuntos de frações obtidos foram descartados por apresentarem características não desejáveis, como bandas de absorção muito largas na região de 1730 cm^{-1} e pontos de fusão muito baixos, além de pouca massa para uma análise mais adequada.

A fração que apresentou indícios de ser o produto esperado foi o conjunto de frações formado a partir das frações mais polares da coluna (3º conjunto), que após recristalização em AcOEt apresentou P.f. = 208-211 °C, e teve sua estrutura confirmada por IV e RMN-¹H que indicaram que o composto formado é a 2',3'-O-dibenzoilinosina (Figura 7). O espectro de IV apresenta bandas bem resolvidas (Anexo 1), com uma banda em 1732 cm^{-1} , região de bandas carbonílicas de éster, indicando que o produto está acilado. O espectro de RMN-¹H (Anexo 1A) apresentou os seguintes dados: um multiplete em 3,91 ppm relativo ao grupo CH_2 da posição 5'-, sinal que para compostos benzoilados em 5'- aparece em campo mais baixo. Um dubleto em 4,55 ppm relativo ao grupo CH em 4'- no anel tetraidrofurano ($J = 2,2\text{ Hz}$), um duplo dubleto em 5,94 ppm relativo ao grupo CH da posição 3'- ($J = 2,2$ e $5,5\text{ Hz}$) o qual em derivados não substituídos aparece em campo mais alto. Um multiplete em 6,18 ppm relativo ao grupo CH da posição 2'-

do anel tetraidrofurano, aparecendo também a campo mais baixo que para derivados não benzoilados. Um dubleto em 6,49 ppm relativo ao grupo CH em 1', um sinal largo em 7,31-8,00 ppm com uma integração de 11 hidrogênios, sendo 5 hidrogênios pertencentes a cada grupo fenil e 1 hidrogênio relativo a posição 8 na base purínica. Estes dados de RMN-¹H confirmam que a molécula possui dois grupamentos aromáticos em 2'- e 3'- respectivamente, confirmando o composto 7.

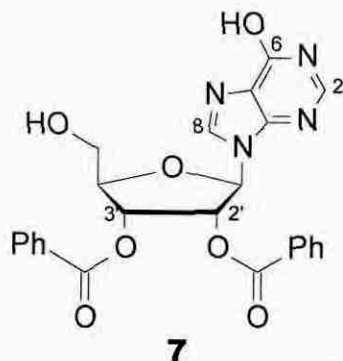


Figura 7 – 2',3'-O-dibenzoilinosina 7.

Mais informações sobre este composto (7) não foram obtidas, sendo que, pelo fato do mesmo ser inédito necessita de alguns estudos adicionais. Algumas caracterizações devem ser feitas, como CHN e RMN-¹³C. No entanto o composto não apresenta a pureza necessária para tais caracterizações, necessitando primeiramente de algumas etapas de purificação.

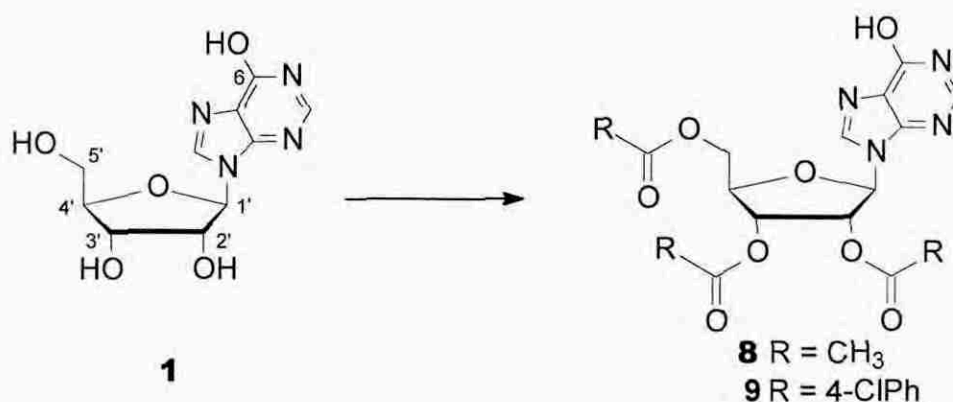
4.3 Acilação das hidroxilas do anel ribosídeo do nucleosídeo

Para que se possa efetuar a etapa de conversão 6-OH → 6-SH partindo-se da inosina é necessário que os grupos hidroxila do anel ribosídeo sejam protegidos, caso contrário, estes grupamentos também serão atacados, não permitindo que modificações com diferentes substituintes na porção ribosídeo do nucleosídeo possam ser feitas.

4.3.1 Acilação das hidroxilas utilizando-se anidrido acético

Um método conveniente para se preparar análogos de 2',3',5'-triacilnucleosídeos é reagir o ribonucleosídeo com anidrido de ácido ou cloreto de ácido, em piridina (Esquema 2).³⁰⁻³²

Para se efetuar a proteção das posições 2', 3'- e 5'- do anel ribosídeo da inosina **1** utilizou-se anidrido acético como agente acilante, tomando os devidos cuidados para se evitar a presença de água no meio reacional. Para isso foram utilizados solventes anidros (piridina, anidrido acético), e tubos secantes de cloreto de cálcio. Em reações onde a piridina e/ou o anidrido acético não estavam muito secos, os rendimentos obtidos para o composto **8** foram baixos, refletindo a qualidade dos reagentes utilizados.



Esquema 2 – Acilação da inosina **1**.

O tempo de reação foi de 3 horas a 95 °C e o reagente de partida apresentou-se com ótima solubilidade no meio reacional, visto que os compostos como inosina e derivados de nucleosídeos, em geral, não apresentam boa solubilidade em solventes orgânicos. Após o término da reação, durante o resfriamento à temperatura ambiente, pode-se observar a precipitação de cloridrato de piridínio abaixo de 70 °C, onde sua solubilidade começa a diminuir.

O produto resultante da acetilação foi um sólido branco **8** com rendimento de 82% (Rend. lit.³⁰ = 90%) e facilmente caracterizado por meio de ponto de fusão e Infra Vermelho. O ponto de fusão obtido para o produto resultante foi de 245 °C, podendo-se dizer que está dentro do esperado, comparando-se com os pontos de fusão da literatura que apresentam valores de 241 °C³⁰ e 236-238 °C.³³ O espectro de IV obtido para o composto 2',3',5'-O-triacetilinosina **8**, apresenta bandas de absorção em 1738 cm⁻¹, características de estiramento C=O de éster. O desaparecimento das bandas em 3432 e 3296 cm⁻¹ referentes aos grupos OH da inosina são um forte indício da formação do produto esperado **8**. O espectro de RMN-¹H não foi obtido pelo fato do produto poder ser caracterizado apenas por P.f. e Infra Vermelho, através de comparações com outras amostras do mesmo produto já obtidas pelo grupo de trabalho.²⁰

4.3.2 Acetilação das hidroxilas utilizando-se cloreto de 4-clorobenzoíla

Na tentativa de acilação das hidroxilas para se efetuar a proteção das posições 2'-, 3'- e 5'- da porção carboidrato da inosina **1** (Esquema 2), estudou-se a metodologia aplicada por Fox *et al*,³² porém substituindo o cloreto de benzoíla por cloreto de 4-clorobenzoíla como agente acilante. Foram tomados os devidos cuidados para se evitar a presença de água no meio reacional. Para isso utilizou-se condição de solventes anidros (piridina), tubos secantes de cloreto de cálcio e atmosfera de N₂.

O tempo de reação foi de 5 horas, nunca excedendo a temperatura de 65 °C, como descrito na literatura. No decorrer da reação, a mesma permaneceu por todo o tempo com sólidos esbranquiçados insolúveis, aderidos às paredes do balão, o que indica que o reagente de partida não foi totalmente solubilizado no meio reacional. Após o fim do aquecimento a solução ainda permaneceu sob agitação e continuou a temperatura ambiente por mais 15 horas, onde parte do sólido ainda ficou insolúvel.

Após o tratamento com água para separar o ácido 4-clorobenzoico e cloreto de ácido 4-clorobenzoico, tentou-se uma cristalização com acetona, porém não se obteve sucesso. O produto apresentou coloração escura, e após algumas

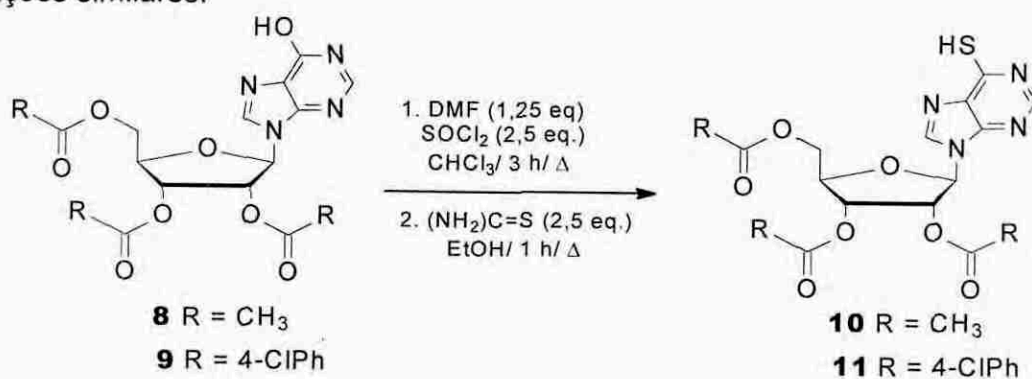
tentativas infrutíferas de recristalização, o resíduo semi-sólido foi filtrado em funil de placa porosa contendo sílica gel, com o intuito de purificá-lo por fracionamento. A partir da eluição com éter de petróleo/AcOEt 3:1, foram obtidas quatro frações, sendo comparadas por cromatografia de camada delgada, com amostras do reagente de partida **1** e do produto esperado **9**. Apenas duas frações apresentaram R_f próximo ao R_f do produto esperado, sendo que as outras duas frações foram correspondentes ao anidrido 4-clorobenzoico, o que foi comprovado através de ponto de fusão, P.f. do produto obtido, 194-196 °C (P.f.²⁸ = 194 °C). No entanto, não foi possível recristalizar as frações de interesse e não foi obtido o produto esperado.

Estes resultados indicam que a qualidade do cloreto de 4-clorobenzoila é duvidosa, pois o composto **9** já havia sido preparado pelo grupo de trabalho. Devido ao insucesso desta reação, foi utilizado o composto **9** que já estava disponível no laboratório para a tentativa de tionação descrita na próxima seção.

4.4 Substituição do grupamento OH por SH na posição 6- do anel purina

4.4.1 Tionação das triacilinosinas **8** e **9**

Para a conversão do grupo 6-OH para 6-SH do anel purínico da inosina triacilada utilizou-se o procedimento descrito por Ikehara *et al.*,²⁷ onde o processo de tionação é feito em duas etapas. Tanto para a triacetilinosina **8** quanto para a tri-4-clorobenzoilinosina **9** o procedimento e as proporções de solventes e reagentes utilizados foram os mesmos (Esquema 3), sendo desta forma as reações similares.



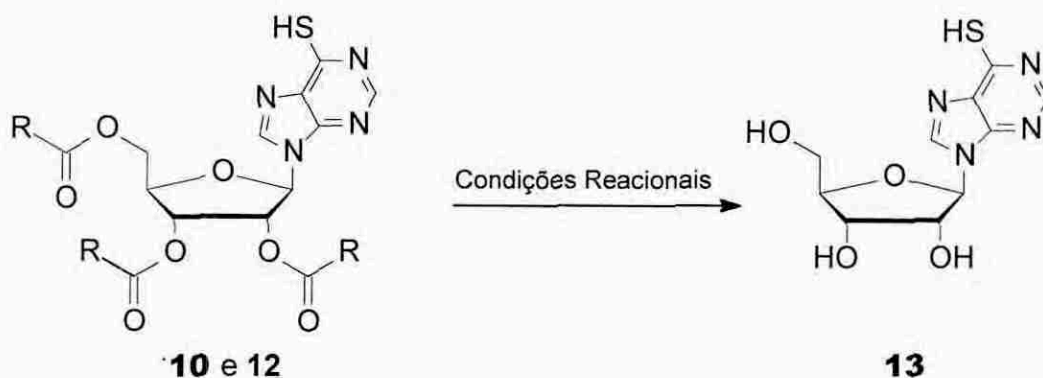
Esquema 3 – Síntese dos derivados da tioinosina.

A primeira etapa da síntese consiste em promover uma substituição nucleofílica aromática do grupo OH por cloro, gerada a partir da reação entre DMF e cloreto de tionila. Foram empregados solventes e reagentes devidamente secos (anidros), tubos secantes de cloreto de cálcio e atmosfera de N₂, deixando-se o composto de partida (**8** ou **9**), reagir com SOCl₂ por 3 horas em 70-75 °C, conforme descrito na literatura.²⁷ Os compostos apresentaram boa solubilidade nos solventes utilizados, facilitando o procedimento da reação.

O composto resultante após a evaporação do solvente é um óleo amarelado, o qual não foi isolado em nosso trabalho. Este óleo, possivelmente o derivado 6-cloroinosina,²⁷ é o precursor da etapa de tionação, onde a conversão para o grupo tiol é efetuada por tiouréia. Na segunda etapa da reação o óleo resultante foi solubilizado em EtOH e adicionou-se tiouréia. Nos primeiros dez minutos da reação já pode ser observada a formação de produto através da precipitação de um sólido claro, o que indica que a reação é rápida e o produto esperado não apresenta boa solubilidade no meio. Após 1 h a 95 °C, o precipitado foi filtrado, lavado com água e MeOH, e a caracterização do produto foi feita através de ponto de fusão. P.f. para o composto **10**: 247-249 °C. (P.f.³¹ = 252-253 °C), que apresentou rendimento de 39%. Ponto de fusão para o composto **11**: 256-260 °C. (P.f.³¹ = 239-240 °C), com rendimento de 51%. Esta diferença de aproximadamente 15 °C no ponto de fusão para o composto **11** pode ser considerada irrelevante, visto que para compostos com ponto de fusão muito altos a precisão do aparelho é comprometida e o composto não foi recristalizado. A conversão do grupo OH pelo grupo SH não irá representar mudanças significativas tanto nos espectros de Infra Vermelho quanto nos espectros de RMN-¹H, por isso, os mesmos não foram úteis na caracterização.

4.5 Desproteção dos derivados da tioinosina

Na desproteção dos grupos acil dos derivados triacilados utilizou-se como substrato o composto **10** (obtido através da acetilação e tionação da inosina, descrito nas seções 4.3.1 e 4.4.1) e o composto **12** (disponível no grupo de trabalho, tendo sido preparado de maneira similar, através das metodologias descritas na literatura).^{27,32} Foram empregados vários métodos de solvólise, geralmente em meio básico usando-se NaHCO₃/MeOH,²⁶ NaOH/EtOH,²⁶ NH₃/MeOH,³³ AcCl,³⁴ KCN/MeOH,³⁵ TEA/EtOH/H₂O.³⁶ As etapas de solvólise estudadas estão resumidas no Esquema 4 e na Tabela 2.



Esquema 4 – Solvólise dos derivados triacilados.

Tabela 2 – Compostos submetidos a reação de solvólise e suas respectivas condições reacionais.

Reação	Composto	R	Condições reacionais
1	10	CH ₃	CH ₃ COCl, EtOH/ t.a./ 72 h
2	10	CH ₃	NaOH, EtOH/ t.a./ 1:50 h
3	10	CH ₃	NaHCO ₃ , MeOH/ t.a./ 1:50 h
4	10	CH ₃	KCN, MeOH/ t.a./ 24 h
5	12	C ₆ H ₅	KCN, MeOH/ t.a./ 73 h
6	10	CH ₃	NH ₃ , MeOH/ t.a./ 24 h
7	12	C ₆ H ₅	NH ₃ , MeOH/ t.a./ 23 h
8	10	CH ₃	Et ₃ N, MeOH/ H ₂ O/ t.a./ 1:40 h
9	12	C ₆ H ₅	Et ₃ N, MeOH/ H ₂ O/ t.a./ 57 h

4.5.1 Solvólise a partir de cloreto de acetila

Na alcoólise de ésteres, o álcool produzido na reação é deslocado por um reagente nucleofílico. Em face disto, um álcool é capaz de deslocar o grupo alcóxido do éster através de transesterificação. No entanto, para deslocar o equilíbrio para a direita torna-se necessário usar o álcool responsável pela alcoólise em grande excesso relativamente à quantidade estequiométrica. Esta transesterificação pode ser tanto catalisada por ácidos como por bases, possuindo mecanismos semelhantes.³⁸

A tentativa de solvólise dos grupos acetila em **10** foi primeiramente realizada através da clivagem do grupo acetil efetuada em uma solução de cloreto de acetila em EtOH (Reação 1 - Tabela 2), seguindo-se a metodologia aplicada por Lee *et al*³⁴ onde é proposta uma solvólise catalisada por HCl que é gerado no meio reacional a partir da esterificação do cloreto de ácido pelo etanol em excesso. Este é um método vantajoso por se ter reagentes e sub produtos voláteis, os quais podem ser retirados facilmente do meio durante o tratamento da reação através de evaporação no rota evaporador. O acompanhamento da reação foi feito por cromatografia de camada delgada usando uma mistura de AcOEt/MeOH 8:2 como eluente. A reação permaneceu sob agitação magnética durante 72 h, no entanto, não foi observado diferença de R_f nas manchas aplicadas. A solução final foi evaporada em evaporador rotativo e o sólido resultante foi recristalizado em EtOH.

O composto resultante apresentou P.f. = 225 °C, o qual condiz com valores da literatura relatados para a tiinosina **13** (P.f.³² = 225-226 °C, P.f.³⁷ = 221-223 °C). O espectro de Infra Vermelho apresenta uma banda de absorção em 3036 cm^{-1} e não apresenta mais a banda correspondente ao éster inicial em 1746 cm^{-1} . Estes fatos indicam que o composto foi desacetilado. No entanto, o espectro de RMN¹H, apresenta somente 4 sinais, centrados em 13,80 ppm, 8,63 ppm, 8,47 ppm e 8,20 ppm, o que corresponde aos hidrogênios da base purínica do nucleosídeo, indicando que ocorreu uma clivagem separando o anel

tetraidrofurano da purina. Portanto, este método não é adequado para a hidrólise dos derivados de tionucleosídeos.

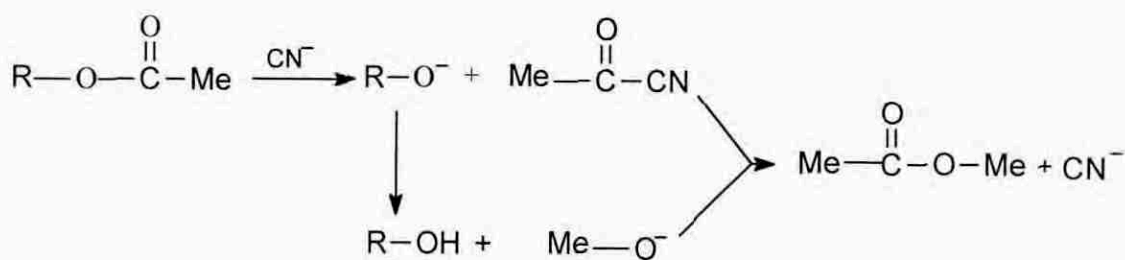
4.5.2. Solvólise a partir de NaOH e NaHCO₃

Como mencionado anteriormente (seção 4.5.1), a reação 1 (Tabela 2) com catálise ácida propiciou uma clivagem do nucleosídeo, separando a base purínica do anel tetraidrofurano. Baseando-se nestes fatos foram realizadas hidrólises com catálise básica, através de transesterificação, com o propósito de se obter a tioinosina **13**.

Como descrito na literatura, uma grande quantidade de álcool (MeOH ou EtOH) foi usada, para que se forme o éster correspondente ao álcool e o nucleosídeo **10** seja desacilado. As bases utilizadas foram, NaOH e NaHCO₃, entretanto, nenhuma das duas reações (Reações 2 e 3 - Tabela 2) funcionou devido a baixa solubilidade dos reagentes nos álcoois correspondentes e a difícil separação dos resíduos inorgânicos e sub produtos formados na reação. Com base nisso, este método de solvólise foi descartado.

4.5.3 Solvólise catalisada por KCN

Segundo Herzig *et al*,³⁵ uma das formas de remover grupos acetato e benzoato, de todas as posições em açúcares, é através de um método catalisado por cianeto. O procedimento para a O-desacilação envolve a adição de uma quantidade catalítica de um cianeto alcalino à uma solução metanólica em excesso. As reações ocorrem a temperatura ambiente, resultando em soluções limpas e produtos desacilados. A remoção do KCN pode ser feita através de filtração, obtendo-se produtos livres de KCN. O curso de reação proposto para a desacilação pode ser visto no Esquema 5.



Esquema 5 – Curso da reação de desacilação utilizando KCN como catalisador.

Foram efetuadas reações de desacilação pelo método descrito por Herzig para os compostos 2',3',5'-O-triacetiltioinosina **10** e 2',3',5'-O-tribenzoiltioinosina **12**. A tentativa de síntese do composto **13** usando como precursor a triacetiltioinosina **10**, (Reação 4 - Tabela 2), foi acompanhada por cromatografia de camada delgada usando uma mistura AcOEt/EtOH 3:1 como eluente. Após as primeiras 3 horas de reação pode-se observar uma pequena mancha na placa cromatográfica, com R_f menor que o R_f do reagente. O acompanhamento por cromatografia de camada delgada foi feito até 3:40 h de reação, e como ainda haviam duas manchas que correspondiam ao reagente e ao produto, com maior intensidade para o reagente, a reação ficou sob agitação magnética de um dia para o outro. No término da reação, após 23 horas, a mesma não apresentava mais a mancha respectiva ao reagente, a solução foi filtrada em funil de placa porosa com sílica gel e lavada com EtOH, com o intuito de se retirar o KCN presente no meio. Foram retiradas duas frações, as quais foram evaporadas no rota evaporador resultando em sólidos. As duas frações foram recristalizadas em EtOH, entretanto a 1ª fração foi desprezada por apresentar pouca massa. A 2ª fração apresentou P.f. = 197-200 °C.

O espectro de Infra Vermelho correspondente a esta fração apresentou bandas em 3428 cm^{-1} , região característica de OH. Porém, também apresentou bandas em 1728 cm^{-1} , região característica de carbonila de éster, apresentando indícios de que poderia ter ocorrido hidrólise seletiva dos grupos OH. Este fato não foi confirmado por não se ter o espectro de RMN- ^1H .

Na reação de solvólise da tribenzoiltioinosina **12**, (Reação 5 - Tabela 2), a reação ficou sob agitação magnética em t.a. por 73 h, e no término da reação o R_f

do meio reacional ainda era igual ao R_f do reagente. A suspensão resultante foi filtrada por gravidade e lavada com EtOH, utilizando-se outro método de eliminação do KCN. Após retirada do solvente, o sólido resultante não apresentou solubilidade em nenhum solvente, eliminando as possibilidades de recristalização, por isso o sólido foi lavado com CH_2Cl_2 , CHCl_3 , acetona e MeOH. Após todas as lavagens obteve-se um sólido com P.f. = 243-245 °C.

O espectro de Infra Vermelho (Anexo 2) apresentou uma banda em 3472 cm^{-1} , que pode ser característica de OH, e ainda apresentou uma banda de carbonila em 1700 cm^{-1} , porém nos espectros anteriores, as bandas de carbonila de éster nunca caíram em valores abaixo de 1728 cm^{-1} . Essa mudança no valor da banda carbonílica poderia indicar uma hidrólise seletiva dos grupos benzoil, o que foi confirmado no espectro de RMN- ^1H (Anexo 2A), que indicou que o produto obtido foi a 5'-O-benzoiltioinosina **14** (Figura 8).

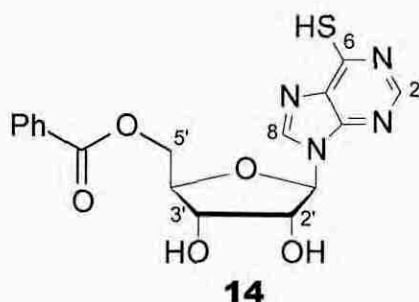
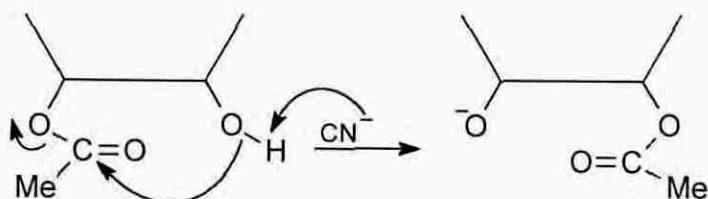


Figura 8 – Estrutura da 5'-O-benzoiltioinosina **14**.

O espectro de RMN- ^1H , usando DMSO-d_6 como solvente, apresenta os seguintes sinais: um multipeto em 4,25-4,63 ppm (5 hidrogênios) relativos aos grupos CH do anel tetraidrofurano em 2'-, 3'- e 4'- e relativo ao grupo CH_2 em 5'-, o qual apareceu em campo mais baixo do que para compostos não acilados em 5'-; um dubleto em 5,47 ppm relativo ao grupo OH da posição 2'- ($J = 5,4\text{ Hz}$); um dubleto em 5,68 ppm relativo ao grupo OH da posição 3'- ($J = 5,5\text{ Hz}$); um dubleto em 5,93 ppm relativo ao grupo CH em 1'- do anel tetraidrofurano ($J = 4,5\text{ Hz}$); um multipeto centrado em 7,60 ppm relativo aos hidrogênios meta e para do anel aromático; um dubleto em 7,80 ppm relativo aos hidrogênios orto do anel

aromático ($J = 7,2$ Hz); um singleto em 8,13 ppm relativo ao grupo CH na posição 8 do anel purínico; um singleto em 8,45 ppm relativo ao grupo CH na posição 2 do anel purínico.

Estes dados confirmam a desacilação seletiva das posições 2'- e 3'- da tribenzoiltioinosina, apesar da diferença de valores de ponto de fusão quando comparado com a literatura (P.f.³² = 225-226 °C). No entanto, essa hidrólise seletiva discorda do estudo feito pelo grupo de Herzig, onde tem-se que nos derivados O-acilados a reatividade depende de sua posição e configuração. Observa-se que a velocidade global de reação é influenciada pelo grupo substituinte vizinho na ordem de $-OH > -OAc \gg -OR$, e é dada pelo Esquema 6, indicando que os grupos acetil em **10** deveriam ter sido mais facilmente clivados.



Esquema 6 – Curso para as hidrólises seletivas.

Estes resultados indicam que, apesar de não levar à tioinosina **13**, a utilização de KCN se mostra promissora na preparação de nucleosídeos seletivamente substituídos, podendo-se fazer variações das condições de reação procurando obter outros derivados seletivamente acilados com diferentes substituintes e em diferentes posições do anel tetraidrofurano.

4.5.4 Solvólise a partir de amônia

A solvólise de ésteres feita pela reação com amônia é chamada de aminólise. Esta reação acontece pelo tratamento do éster, geralmente dissolvido em álcool (MeOH ou EtOH), com amônia, obtendo-se a amida primária e o álcool

correspondentes. A reação se dá por ataque nucleofílico da amônia sobre o carbono carbonílico do éster, e posterior eliminação do álcool.³⁸

Esse procedimento foi efetuado para a solvólise dos nucleosídeos 2',3',5'-O-triacetiltioinosina **10** e 2',3',5'-O-tribenzoiltioinosina **12**, (Reações 6 e 7 - Tabela 2), seguindo-se a metodologia aplicada por Ikehara.³³ Borbulhou-se amônia em uma solução contendo triacetiltioinosina **10** e MeOH, a solução que estava com o reagente de partida insolúvel imediatamente solubilizou e aqueceu. O borbulhamento de amônia com um fluxo contínuo durou apenas 10 minutos, e após isso o balão foi vedado para que o mesmo permanecesse saturado com amônia. A solução ficou em repouso por 23 h, o balão foi então cuidadosamente aberto e a agitação magnética foi acionada para que o excesso de amônia fosse liberado. Após evaporação do solvente em evaporador rotativo, a solução resultou em um sólido branco, o qual foi lavado com AcOEt à quente para que a acetamida formada no meio reacional fosse separada do produto. Após recristalização em MeOH o composto forneceu P.f. = 216-218 °C, o qual está de acordo com os valores de ponto de fusão descritos na literatura para a tioinosina **13** (P.f.²⁷ = 209-211 °C, P.f.³⁷ = 221-223 °C).

O espectro de IV (Anexo 3) apresentou uma banda larga em 3356 cm⁻¹, região característica dos grupos OH, e não apresentou banda de éster na região de 1700 cm⁻¹, indicando que a desacilação foi realizada com sucesso. O espectro de RMN-¹H (Anexo 3A-B) para o composto apresenta os seguintes sinais: um multiplete em 3,67 ppm atribuído ao grupo CH₂ da posição 5'- do anel tetraidrofurano que para derivados acilados aparece em campo mais baixo; um dubleto em 4,00 ppm referente ao grupo CH na posição 4'- do anel tetraidrofurano (J = 3,3 Hz), um multiplete em 4,18 ppm referente ao grupo CH da posição 3'- do anel tetraidrofurano, um multiplete em 4,46 ppm referente ao grupo CH da posição 2'- do anel tetraidrofurano, todos estes sinais apareceriam em campo 0,8-1,0 ppm mais baixo se fossem derivados acilados. Um sinal largo em 5,09 ppm referente aos grupos OH das posições 2'- e 3'-, um sinal largo em 5,49 ppm referente ao grupo OH da posição 5'-, um dubleto em 5,93 ppm referente ao grupo CH na posição 1'- do anel tetraidrofurano (J = 5,3 Hz), um singleto em 8,18 ppm relativo

ao grupo CH na posição 8 da base purínica, um singleto em 8,52 ppm referente ao grupo CH da posição 2 da base purínica. O que confirma que o composto da solvólise é a tiinosina **13**, o qual apresentou um rendimento de 30%.

A hidrólise da tribenzoiltiinosina **12** foi efetuada nas mesmas condições da reação anterior e forneceu um sólido branco com P.f. = 209-212 °C. O espectro de Infra Vermelho apresenta bandas semelhantes ao espectro obtido na reação com triacetiltiinosina **10**, observando-se uma banda em 3404 cm⁻¹ referente aos grupos OH e o desaparecimento da banda na região de 1700 cm⁻¹ referente a carbonila do grupamento éster, indicando que o composto é o esperado, tiinosina **13**. Entretanto, essa reação não se mostrou eficiente devido ao baixo rendimento obtido, além da dificuldade de separar a benzamida formada como sub-produto.

4.5.5 Solvólise através de trietilamina (TEA)

O objetivo da solvólise utilizando TEA é promover a reação de clivagem dos grupos acilantes, obtendo-se como sub produto da reação o éster correspondente ao álcool utilizado além da TEA que está no meio reacional. As reações usando-se trietilamina como agente de solvólise foram usadas para solvolisar os compostos 2',3',5'-triacetiltiinosina **10** e 2',3',5'-tribenzoiltiinosina **12** (Reações 8 e 9 - Tabela 2). Para proceder a reação foi preparada uma solução com Et₃N/MeOH/H₂O 1:5:1 conforme descrito por Tsuzuki *et al.*,³⁶ e sobre esta foi adicionado a triacetiltiinosina **10**, que rapidamente solubilizou no meio reacional. O acompanhamento da reação foi feito por cromatografia de camada delgada usando uma solução de AcOEt/MeOH 1:1 como eluente. A reação ficou agitando magneticamente a t.a. por 1:40 h e após isso foi evaporada no rota evaporador. O sólido foi recristalizado em MeOH e o espectro de Infra Vermelho apresentou as bandas características para a tiinosina **13** como nos casos anteriores, confirmando o sucesso da reação, obtendo-se um rendimento de 45%.

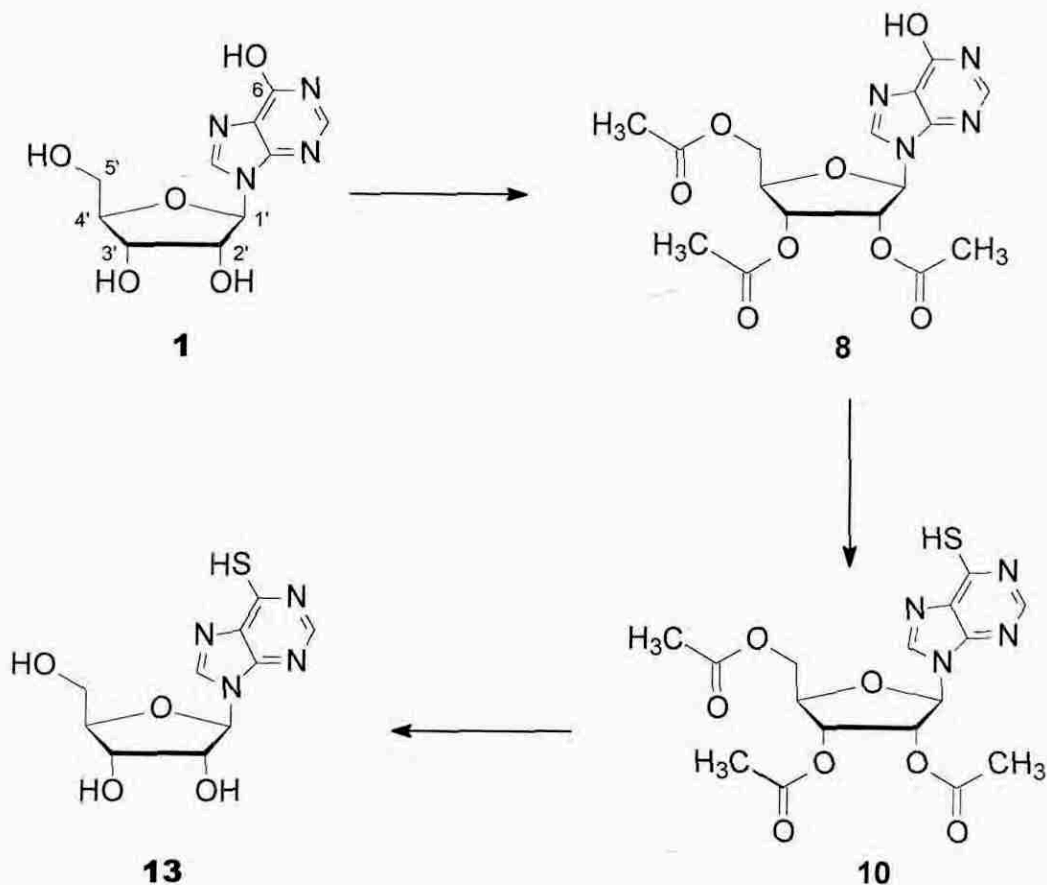
Ao repetir a reação nas mesmas condições para a tribenzoiltiinosina **12**, não foi observado uma boa solubilidade no meio reacional. O acompanhamento da reação foi feito por cromatografia de camada delgada, sendo que em 57 horas

de reação não houve diferença nos valores de R_f para o reagente e para o meio reacional, indicando que a reação não ocorreu, o que foi confirmado através de espectro de Infra Vermelho, que apresentava-se igual ao do reagente de partida.

4.6 Considerações sobre a preparação de tioinosina 13 a partir da inosina 1

Como descrito nas seções anteriores (4.3, 4.4 e 4.5), foram efetuados vários métodos para a preparação da tioinosina **13**. Sendo que o método que se destacou para a proteção da inosina foi onde utilizou-se anidrido acético como agente acilante (seção 4.3.1), por utilizar reagentes baratos e de fácil acesso, além de apresentar um rendimento alto, com 82%. Para as etapas de tionação observa-se que o derivado tri-4-clorobenzoiltioinosina **11** apresentou maior rendimento com 51%, entretanto o composto **9**, precursor da reação de preparação de **11**, não foi efetivo na etapa de acilação refletindo a má qualidade do cloreto de 4-clorobenzoila e indicando que o composto mais conveniente para a etapa de tionação é o composto **8**.

Nas etapas de solvólise, dentre os métodos estudados, aqueles que apresentam melhores resultados são os que se usou NH_3/MeOH e $\text{TEA}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ para a desacilação da tioinosina **13**, sendo que a reação de solvólise do composto **10** com TEA, é mais efetiva por apresentar maior rendimento com 45% e por gerar menos dificuldades no preparo da reação, sendo a mais indicada para a desacilação da tracilinosina. Com isto pode-se apresentar uma rota para a preparação de tioinosina **13** a partir da inosina **1**, conforme Esquema 7.



Esquema 7 – Rota proposta para a preparação da tioinosina 13.

A partir desta rota, prepara-se a tioinosina **13** em três etapas, através de reações empregando condições simples e baratas, e apresentando um rendimento global de 15%. Apesar de ser considerado baixo, os rendimentos podem ser largamente melhorados através de otimizações das reações, podendo-se chegar a rendimentos globais de mais de 60% se os valores descritos na literatura forem atingidos.

Com estes resultados pode-se fazer reações em larga escala partindo-se da inosina **1** para se chegar a tioinosina **13**, que servirá como precursor de vários derivados a partir de uma única etapa, diminuindo as etapas e os tempos de reação para a preparação de derivados de **13** seletivamente acilados.

5 PARTE EXPERIMENTAL

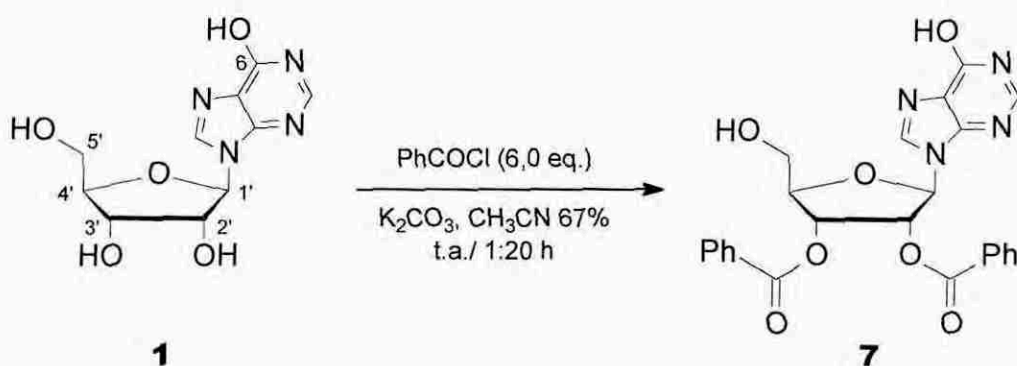
5.1 REAGENTES E INSTRUMENTAÇÃO

Os espectros de infra-vermelho foram obtidos em pastilha de KBr ou filme, em espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR 1600 com sistema de registro computadorizado, na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Os espectros de RMN- ^1H foram obtidos em aparelho BRUCKER modelo AC-200F em 200 MHz usando TMS como padrão interno e DMSO- d_6 como solvente. A determinação do ponto de fusão das substâncias sólidas foi realizada em um aparelho Microquímica MQAPF301.

Todos os solventes e reagentes empregados nas sínteses e caracterizações foram adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Merck, Fluka, Mallinckrodt, Nuclear, Synth) e utilizados sem prévia purificação, com exceção dos cloretos de ácido, cloreto de benzoíla e cloreto de 4-clorobenzoíla, e da piridina, que foram tratados de acordo com procedimentos descritos na literatura.³⁹

5.2 PROCEDIMENTO PARA AS REAÇÕES

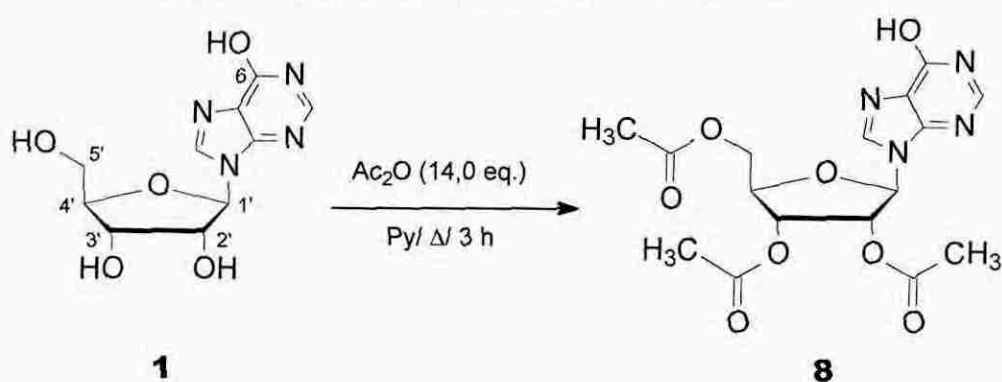
5.2.1 Preparação da 2',3'- O-dibenzoilinosina 7:



A uma solução contendo 0,13 g (0,50 mmol) de inosina **1**, 0,83 g (6,0 mmol) de K_2CO_3 e 15 mL de acetonitrila aquosa 67%, foi adicionado 0,35 mL (3,0 mmol)

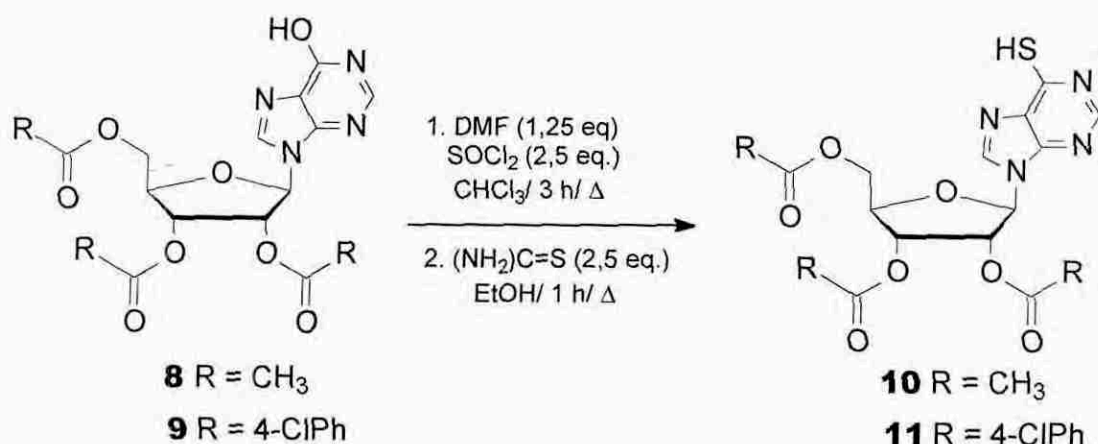
de cloreto de benzoila, deixando sob agitação, a temperatura ambiente, durante 1:20 h. A solução foi tratada com HCl 13% até atingir pH 7. Em seguida, foi extraída com AcOEt, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio, filtrada e o solvente retirado em evaporador rotativo. O sólido obtido foi separado por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente acetato de etila. O produto obtido das frações mais polares foi recristalizado em AcOEt, obtendo-se o composto 2',3'-O-dibenzoilinosina **7**: Rend. 27%. P.f. = 208-211 °C. IV: 3434, 3254 (OH), 1732 (C=O-éster), 1678 (C=O), 1270 cm^{-1} . RMN- ^1H : δ 3,91 (m, 2H), 4,55 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz), 5,94 (dd, 1H, $J = 2,2$ e 5,5 Hz), 6,18 (m, 1H), 6,49 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 7,31-7,67 (m, 6H), 7,81 (s, 1H), 7,99 (m, 4H), 8,37 (s, 1H).

5.2.2 Preparação da 2',3',5'-O-triacetilinosina **8**:



A uma solução formada por 2,00 g (7,45 mmol) de inosina **1** e 10 mL (0,10 mol) de anidrido acético protegida, por um tubo secante de CaCl_2 , foram adicionados 5 mL de piridina anidra. Esta solução foi deixada sob agitação magnética a 90 °C por 3 horas. Após esfriar, a reação foi extraída com CH_2Cl_2 , a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , e o solvente evaporado em evaporador rotativo. Coevaporação do resíduo formado por duas vezes com etanol, forneceu o composto 2',3',5'-O-triacetilinosina **8** como sólido amorfo branco. Rend. 82%. P.f. = 245 °C. (P.f.³⁰ = 241 °C, P.f.³³ = 236-238 °C). IV: 1738 (C=O-éster), 1706 (CON), 1202 cm^{-1} (COC).

5.2.3 Preparação dos derivados de tióis triacilados:



5.2.3.1 Preparação da 2',3',5'-O-triacetilthioinosina 10:

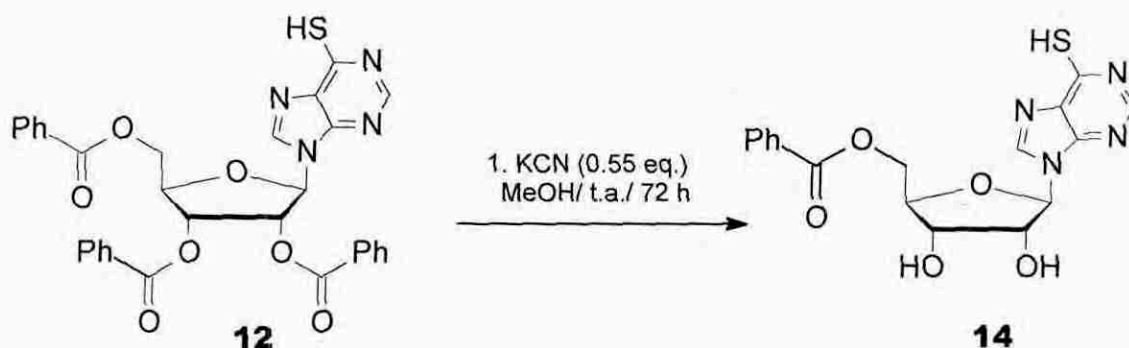
Foram adicionados a um balão, 43 mL de CHCl₃ seguidos de 1,1 mL (15 mmol) de SOCl₂ e 0,58 mL (7,5 mmol) de DMF. Esta solução ficou sob agitação a temperatura ambiente e atmosfera de N₂ por 12 minutos, então adicionou-se 2,36 g (5,98 mmol) de 2',3',5'-triacetilinosina **8** e a reação foi levada a refluxo brando por 3 horas. O solvente orgânico foi evaporado em evaporador rotativo, e o resíduo coevaporado por duas vezes com etanol. O resíduo oleoso resultante foi solubilizado em 35 mL de EtOH, foram adicionados 1,14 g (15,0 mmol) de tiouréia e a solução foi levada a 95 °C por 1 hora. Após atingir a temperatura ambiente, o sólido precipitado foi filtrado e lavado com H₂O e MeOH, resultando no composto 2',3',5'-O-triacetilthioinosina **10**: Rend. 39%. P.f. = 247-249 °C. (P.f.³¹ = 252-253 °C). IV: 2730 (-SH), 1746 (C=O-éster), 1592 cm⁻¹ (C=N).

5.2.3.2 Preparação da 2',3',5'-O-tri-4-clorobenzoiltioinosina 11:

Preparou-se uma solução com 4,18 mL de CHCl₃, 0,11 mL (1,45 mmol) de SOCl₂ e 0,05 mL (0,72 mmol) de DMF. Esta solução permaneceu a temperatura ambiente e sob atmosfera de N₂ por 10 minutos. Então adicionou-se 0,365 g (0,53

mmol) de 2',3',5'-O-tri-4-clorobenzoilinosina **9** e a reação foi elevada a 75 °C por 3 horas. O solvente orgânico foi evaporado em evaporador rotativo, e o resíduo coevaporado por duas vezes com etanol. O resíduo oleoso resultante foi solubilizado em 3,35 mL de EtOH, foram adicionados 0,11 g (0,58 mmol) de tiouréia e a temperatura elevada a 95 °C por 1 hora. Após atingir a temperatura ambiente, o sólido resultante foi filtrado e lavado com EtOH e CH₂Cl₂, resultando no composto 2',3',5'-O-tri-4-clorobenzoiltioinosina **11**: Rend. 51%. P.f. = 256-260 °C. (P.f.³¹ = 239-240 °C). IV: 1729 (C=O-éster), 1594 (C=N), 1092 cm⁻¹ (=CH).

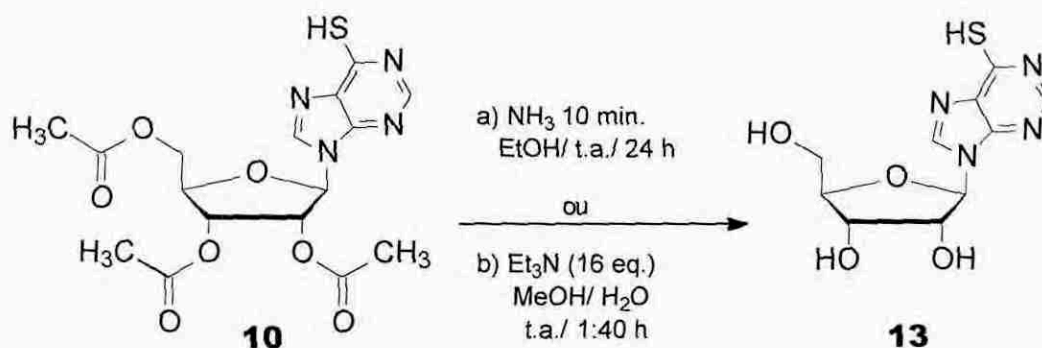
5.2.4 preparação da 5'-O-benzoiltioinosina **14**:



Foram adicionados 0,01 g (0,18 mmol) de KCN a um balão contendo 3,1 mL de MeOH. A esta suspensão, adicionou-se sob agitação, 0,20 g (0,33 mmol) de 2',3',5'-O-tribenzoiltioinosina **12** a qual ficou agitando a temperatura ambiente por 72 h. A suspensão resultante foi filtrada em funil por gravidade e lavada com EtOH.

O filtrado foi evaporado em evaporador rotativo e o sólido obtido lavado com EtOH, acetona, CH₂Cl₂ e CHCl₃. Após as lavagens, o sólido foi seco a temperatura ambiente, obtendo-se o composto 5'-O-benzoiltioinosina **14**: Rend. 33%. P.f. = 243-245 °C. (P.f.³² = 225-226 °C). IV: 3472 (-OH); 1700 (C=O); 1208 cm⁻¹ (C=S). RMN-¹H: δ 4,25-4,63 (m, 5H), 5,47 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 5,68 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 5,93 (d, 1H, J = 4,5 Hz), 7,60 (m, 3H), 7,80 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 8,10 (s, 1H), 8,40 (s, 1H).

5.2.5 Preparação da tiinosina 13:



5.2.5.1 Solvólise utilizando NH_3/MeOH :

A um balão contendo uma suspensão formada por 0,114 g (0,28 mmol) de 2',3',5'-O-triacetiltiinosina **10** e 5 mL de MeOH, mantido em banho de gelo, borbulhou-se amônia por aproximadamente 10 minutos com um fluxo contínuo. A solução final permaneceu em repouso, com o balão fechado e a temperatura ambiente, por 24 horas. Após este tempo, o frasco foi cuidadosamente aberto, ficando alguns minutos sob agitação para que houvesse a liberação do excesso de NH_3 . O líquido resultante foi evaporado em evaporador rotativo, o sólido obtido foi triturado em AcOEt à quente e posteriormente decantado. O sólido resultante foi recristalizado em MeOH obtendo-se tiinosina **13**: Rend. 30%. P.f. = 216-218 °C. (P.f.²⁷ = 209-211 °C, P.f.³⁷ = 221-223 °C). IV: 3356 (-OH); 1604 (C=N); 1196 cm^{-1} (C=S). RMN¹H: δ 3,67 (m, 2H), 4,00 (d, 1H, J = 3,3 Hz), 4,18 (m, 1H), 4,46 (m, 1H), 5,09 (sinal largo, 2H), 5,49 (sinal largo, 1H), 5,93 (d, 1H, J = 5,3 Hz), 8,18 (s, 1H), 8,52 (s, 1H).

5.2.5.2 Solvólise utilizando TEA/EtOH/H₂O:

Foram adicionados a um balão 0,5 mL (3,93 mmol) de Et₃N, 2,5 mL de MeOH e 0,5 mL de H₂O. A esta solução, sob agitação, foram adicionados 0,10 g (0,24 mmol) de 2',3',5'-O-triacetiltioinosina **10**. A solução ficou sob agitação à temperatura ambiente por 1:40 h a mistura resultante foi evaporada em evaporador rotativo e o resíduo obtido foi coevaporado por duas vezes com EtOH. O sólido foi recristalizado em MeOH, obtendo-se tioinosina **3**: Rend. 45%. P.f. = 200-208 °C. (P.f.²⁷ = 209-211 °C, P.f.³⁷ = 221-23 °C). IV: 3328 (-OH); 1610 (C=N); 1208 cm⁻¹(C=S).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram preparados derivados de inosina **1** dissubstituídos, mostrando-se que as acilações seletivas da inosina podem ser feitas através de métodos brandos, sem aquecimento e sem o uso de piridina.

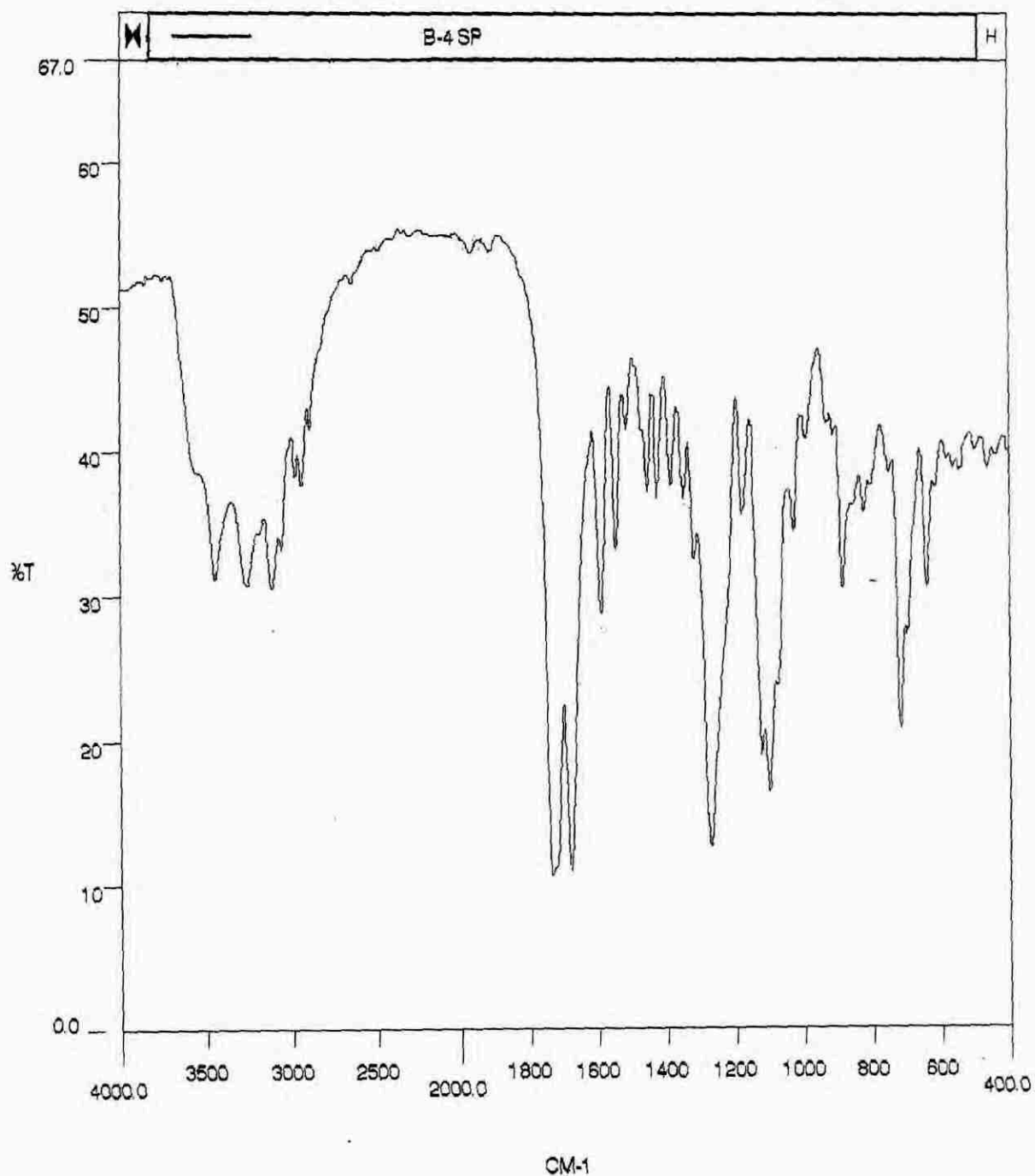
As acilações da inosina **1** efetuadas, demonstram que o método mais conveniente para se proteger a inosina é através de acetilação usando-se anidrido acético, o qual é um reagente barato e apresenta melhores rendimentos na etapa de proteção.

As reações de solvólise dos derivados de triaciltioinosina (**10** e **12**) estudadas, demonstram que a solvólise catalisada por KCN apresenta resultados bastante promissores, conseguindo-se derivados da tioinosina **13** seletivamente substituídos através de condições reacionais simples. Podendo este método de solvólise, ser bastante explorado no futuro.

As solvólises feitas através de métodos clássicos, descritos na literatura, apresentam bons resultados apenas para os métodos em que se empregou amônia ou TEA para a clivagem dos grupos acil, indicando que a solvólise é mais eficiente para os derivados que possuem o grupo acetil como grupo protetor **10**, confirmando a rota proposta para a preparação da tioinosina **13** descrita no Esquema 7.

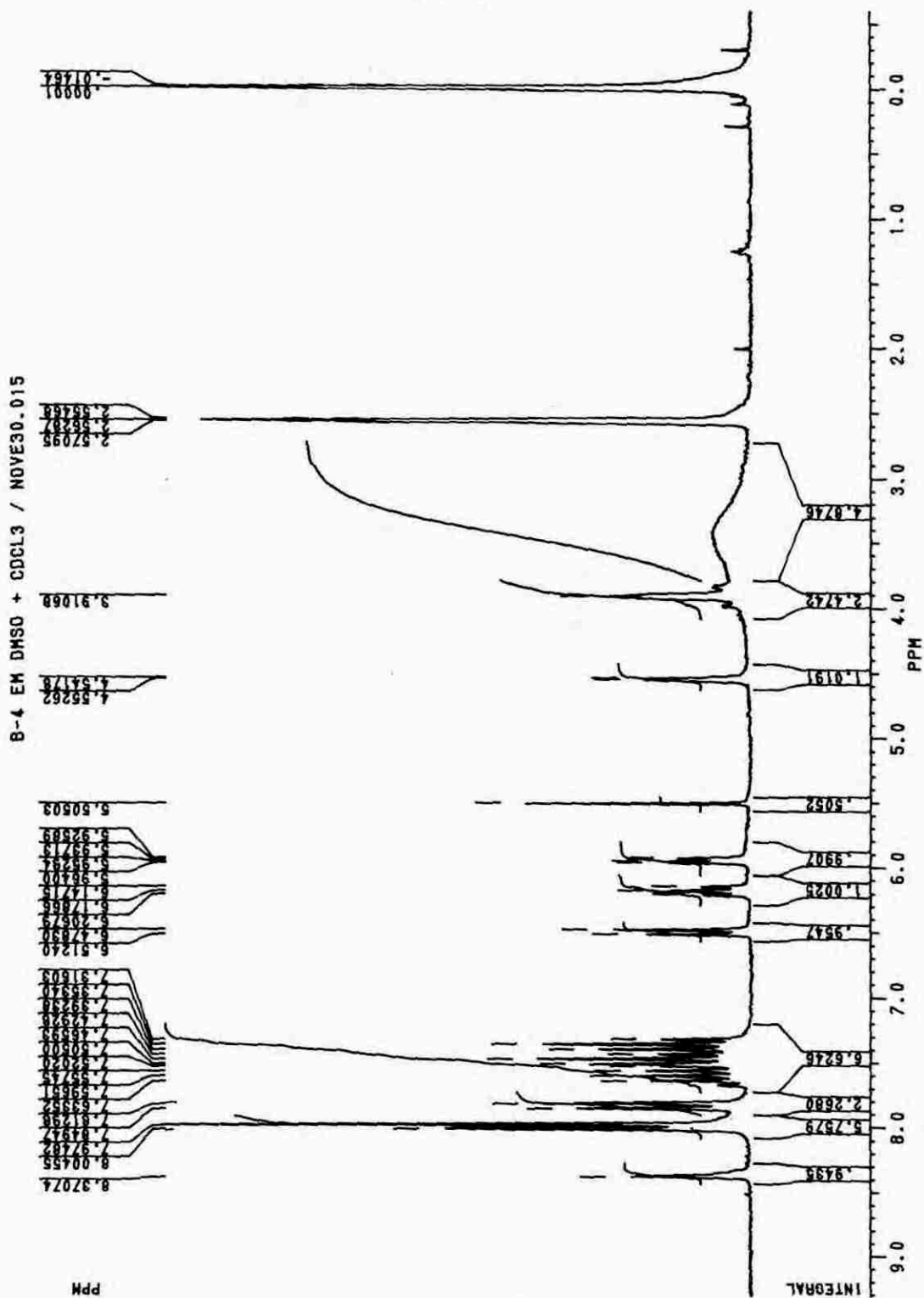
Em suma, foram desenvolvidas metodologias simples e baratas para a preparação de (**13**) através de apenas três etapas, facilitando a produção de novos derivados de tionucleosídeos. Visando um aumento da atividade inibitória frente a gGAPDH de *T.cruzi*. Através de (**13**) também poderão ser criadas quimiotecas de tionucleosídeos, que podem tornar-se aptos para testes de inibição frente a outras enzimas. Podendo assim, contribuir para o desenvolvimento de fármacos com outras finalidades além da inibição frente a gGAPDH.

ANEXO 1



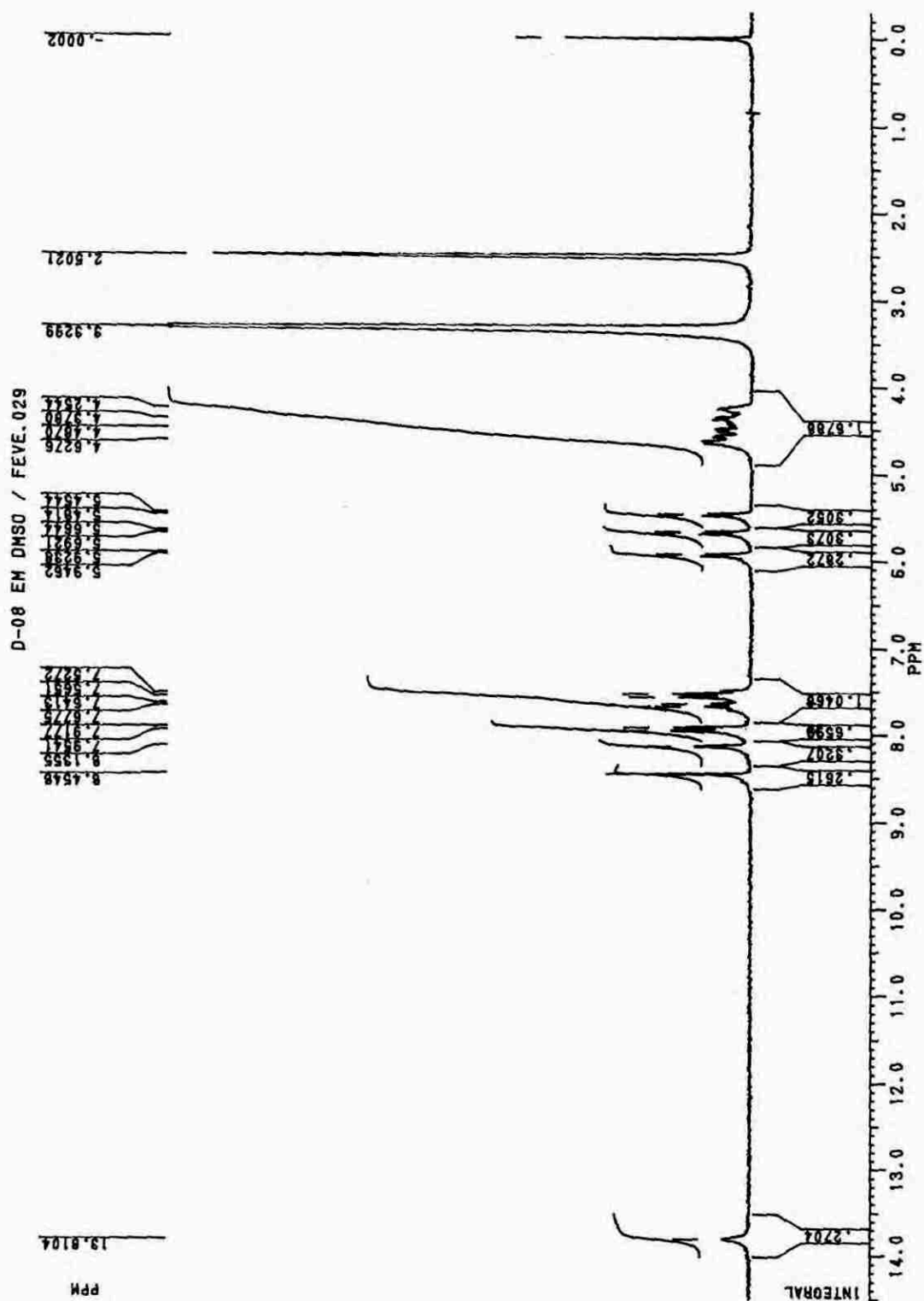
Espectro de Infra Vermelho da 2',3'-O-dibenzoilinosina 7.

ANEXO 1A



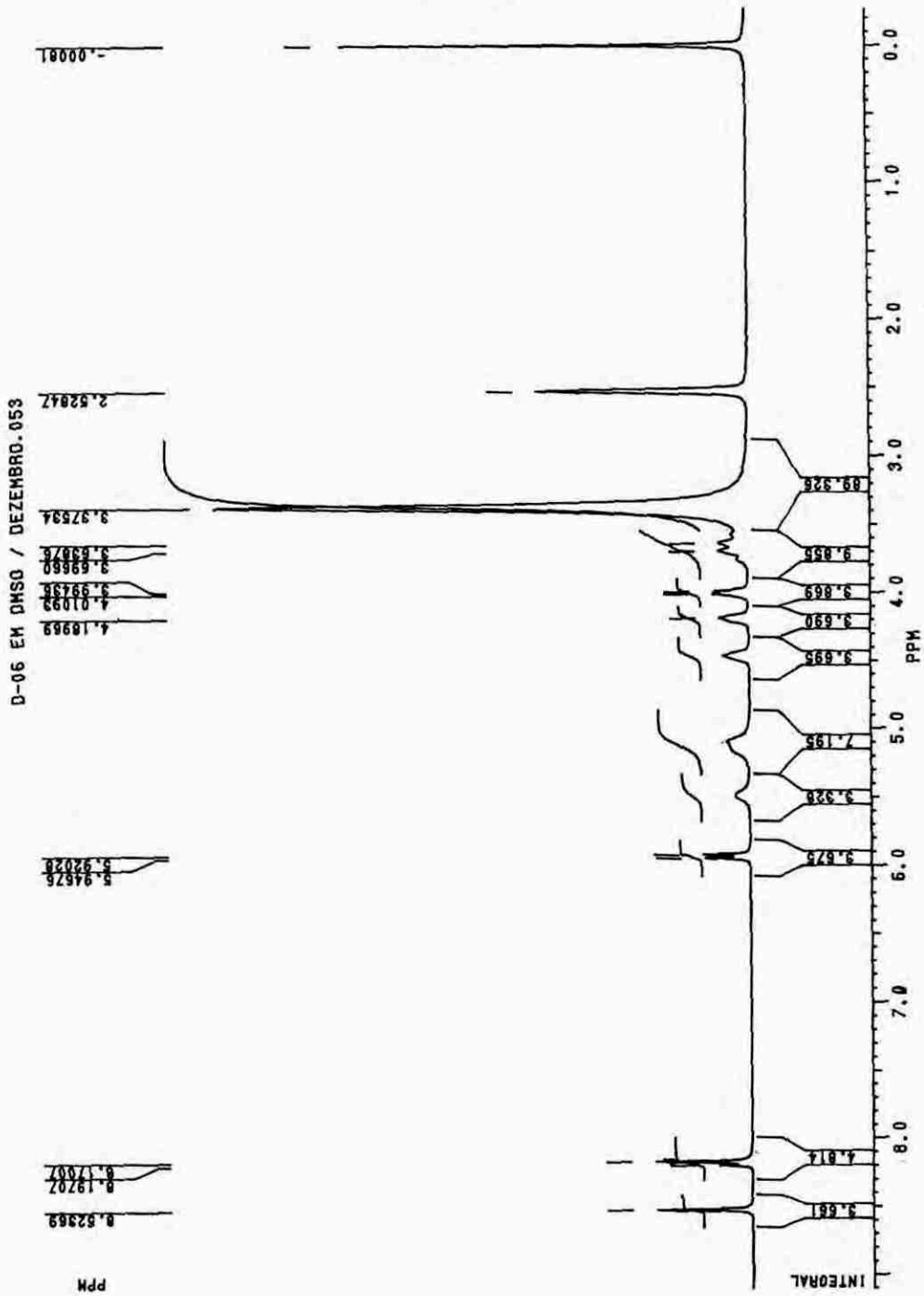
Espectro de RMN-¹H da 2',3'-O-dibenzoilinosina 7.

ANEXO 2A



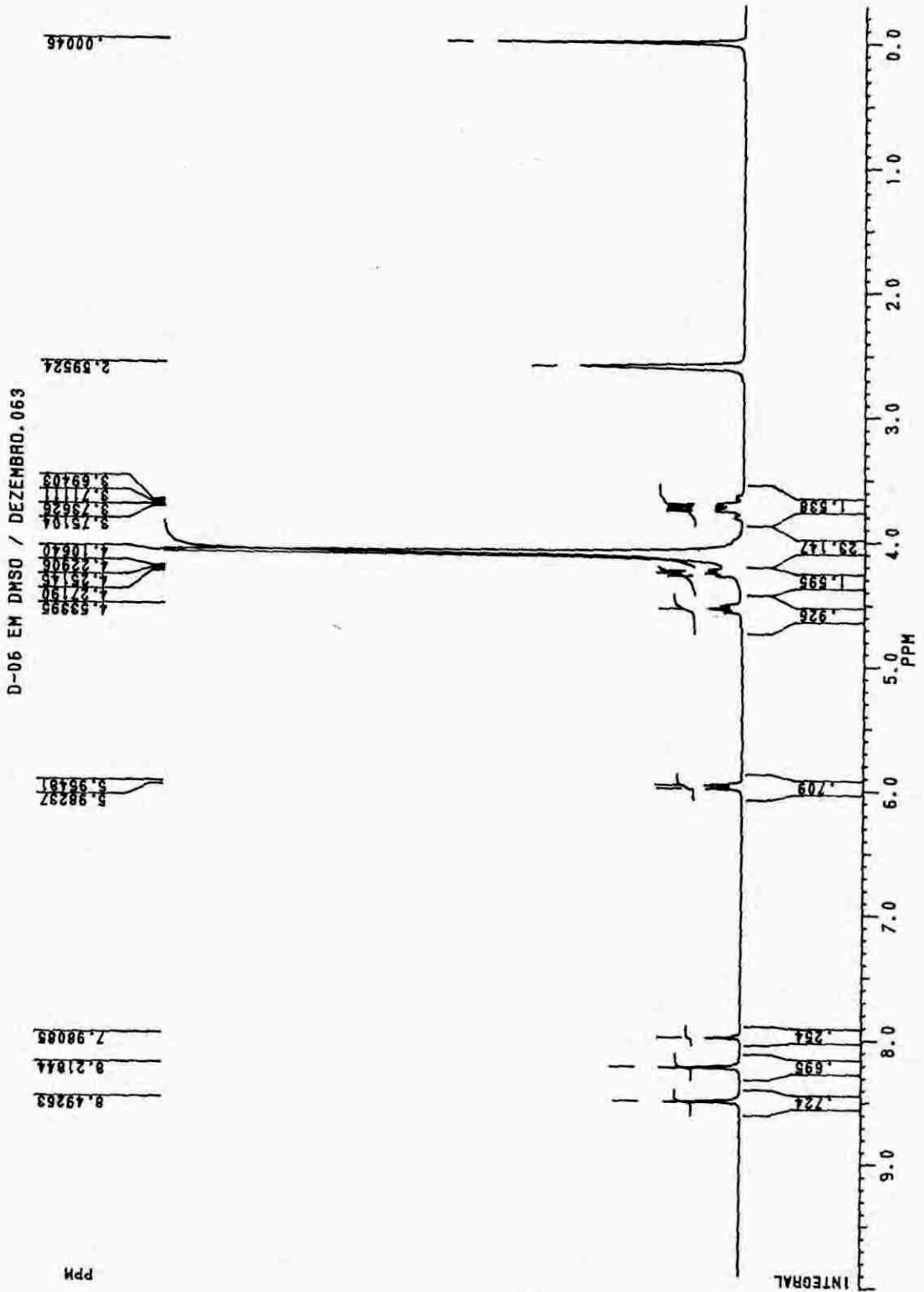
Especto de RMN-¹H da 5'-O-benzoiltiouridina 14.

ANEXO 3A



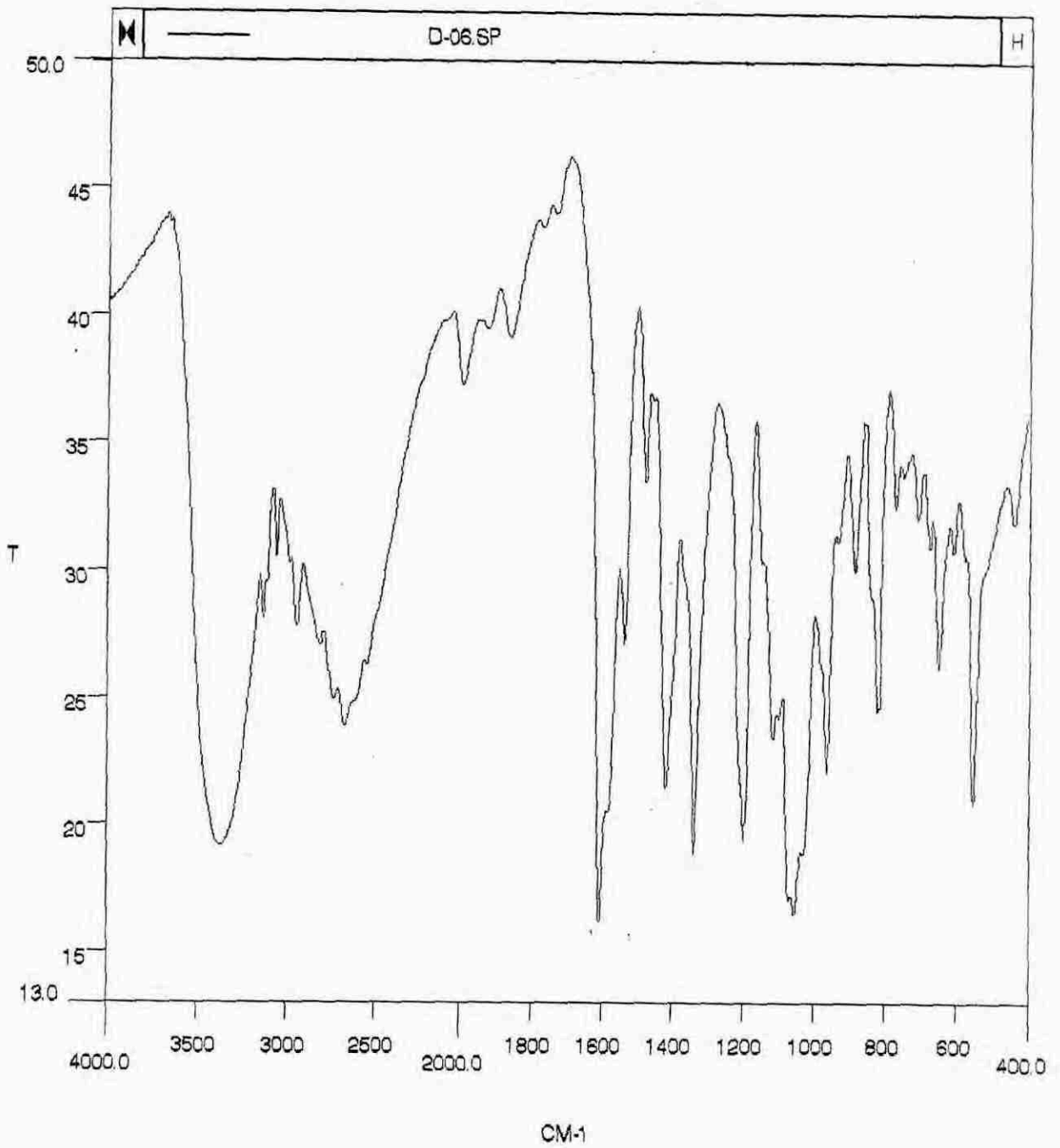
Espectro de RMN-¹H (DMSO) da tioinosina 13.

ANEXO 3B



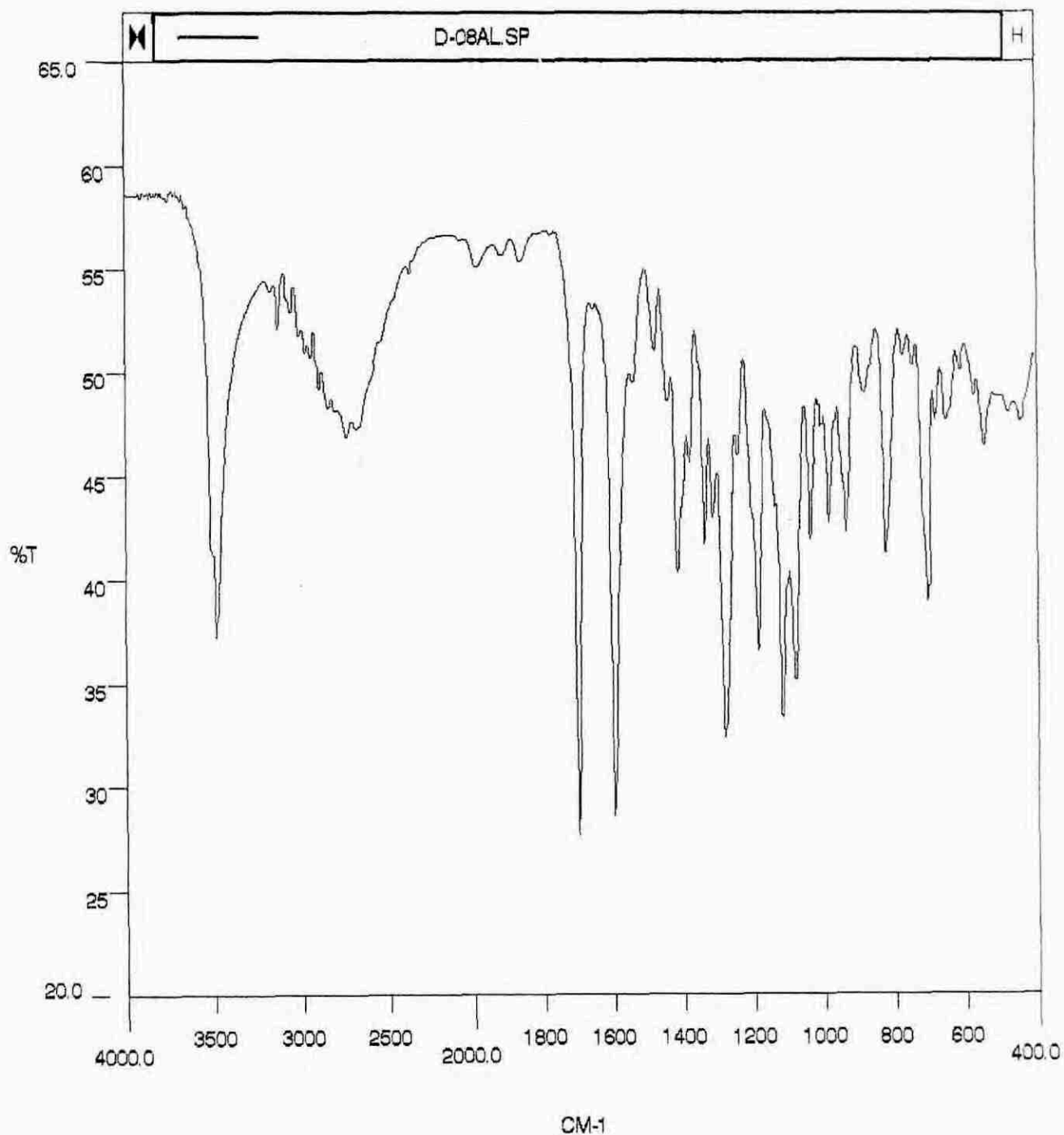
Espectro de RMN-¹H (DMSO + D₂O) da tioinosina 13.

ANEXO 3



Espectro de Infra Vermelho da tioinosina 13.

ANEXO 2



Espectro de Infra Vermelho da 5'-O-benzoiltiouridina 14.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Veronesi, R. *Doenças Infeciosas e Parasitárias*; 8^a ed.: Rio de Janeiro, **1991**.
- (2) Mengel, J. O.; Rossi, M. A. *Amm. Heart J* **1992**, *124*, 1052.
- (3) Tanowitz, H. B.; Kirchhoff, L. V.; Simon, D.; Morris, S. A.; Weiss, L. W.; Wittner, M. *Clin. Microb. Rev.* **1992**, *5*, 400-419.
- (4) Verlinde, C. L. M. J.; Bressi, J. C.; Choe, J.; Suresh, S.; Voorhis, W. C. V.; Buckner, F. S.; Michels, P. A. M.; Gelb, M. H.; Hol, W. G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *6*, 843-848.
- (5) Verlinde, C. L. M. J.; Merrit, E. A.; Van Den Akker, F.; Kim, H.; Feil, I.; Delboni, L. F.; Mande, S. C.; Sarfaty, S.; Petra, P. H.; Hol, W. G. *J. Protein Science* **1994**, *3*, 1670.
- (6) www.who.ch/whosis/whosis.htm visitado em 02/2003.
- (7) Weekly Epidemiological Record, Geneva, **2000**; p 10-12.
- (8) <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm> visitado em 02/2003.
- (9) Aronov, A. M.; Suresh, S.; Buckner, F. S.; Voorhis, W. C. V.; Verlinde, C. L. M. J.; Oppendoes, F. R.; Hol, W. G. J.; Gelb, M. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4273-4278.
- (10) Aronov, A. M.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J.; Gelb, M. H. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4790-4799.
- (11) Van Calenbergh, S.; Verlinde, C. L. M. J.; Soenens, J.; de Bruyn, A.; Callens, M.; Blaton, N. M.; Peeters, O. M.; Rozenski, J.; Hol, W. G. J.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3838-3849.
- (12) Souza, W.; Padrón, T. S. *Ciência Hoje*. **1983**, Vol. 4, 42-49.
- (13) Barreiro, E. J. *Química Nova* **2002**, *6B*, 1172-1180.
- (14) Barreiro, E. J.; Rodrigues, C. R.; Albuquerque, M. G.; de Sant'Anna, C. M. R.; de Alencastro, R. B. *Química Nova* **1997**, *20*, 300-310.
- (15) Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. *Química Nova* **2001**, *24*, 105-111.
- (16) Kennedy, K. J.; Bressi, J. C.; Gelb, M. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 95-98.
- (17) Souza, D. H. F.; Garrat, R. C.; Araújo, A. P. U.; Guimarães, B. G.; Jesus, W. D. P.; Michels, P. A. M.; Hannaert, V.; Oliva, G. *FEBS Letters* **1998**, *424*, 131-135.
- (18) Verlinde, C. L. M. J.; Callens, M.; Van Calenbergh, S.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P.; Hannaert, V.; Michels, P. A. M.; Oppendoes, F. R.; Hol, W. G. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3605-3613.

- (19) Sá, M. M.; Dias, R. L. A.; Crisóstomo, F. R. P.; Corrêa, A. G.; Yonashiro, M.; Oliva, G. 22^o Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Poços de Caldas, MG, **1999**; p QO-125.
- (20) Sá, M. M.; Dias, R. L. A.; Vieira, P. C.; Oliva, G. 22^o Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Poços de Caldas, MG, **1999**; p MD-040.
- (21) Pavão, F. M. *Sc. Dissertação*, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil, **1996**.
- (22) Sá, M. M.; Silveira, G. P.; Castilho, M. S.; Pavão, F.; Oliva, G. *Arkivoc* **2002**, 8, 112-124.
- (23) Vieira, P. C.; Mafezoli, J.; Pupo, M. T.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Albuquerque, S.; Oliva, G.; Pavão, F. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 617-622.
- (24) A obtenção da enzima gGAPDH em quantidades suficientes para os testes de inibição é realizada a partir da sua expressão recombinante em uma cepa de *Escherichia coli*. Esse plasmídeo foi desenvolvido no Instituto Internacional de Patologia Molecular e Celular da Bélgica²⁵ e gentilmente cedido ao Laboratório de Cristalografia de Proteínas da Universidade de São Paulo em São Carlos (IFSC-USP), o qual tem realizado o processo de expressão da enzima de forma rotineira, com algumas modificações experimentais visando maior rendimento e pureza.
- (25) Hannaert, V.; Opperdoes, F. R.; Michels, P. A. M. *Prot. Exp. Purif.* **1995**, 6, 244.
- (26) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 2nd ed., New York, **1991**.
- (27) Ikehara, M.; Uno, H.; Ishikawa, F. *Chem. Pharm. Bull.* **1964**, 12, 267-271.
- (28) Summerbell, R. K.; Lunk, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 60, 604-606.
- (29) Kozai, S.; Takamatsu, S.; Izawa, K.; Maruyama, T. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 4355-4358.
- (30) Brederick, H. *Chem. Ber.* **1947**, 5, 401-405.
- (31) Lewis, L. R.; Robins, R.; Cheng, C. C. *J. Med. Chem.* **1964**, 7, 200-204.
- (32) Fox, J. J.; Wempen, I.; Hampton, A.; Doerr, I. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 1669-1675.
- (33) Ikehara, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1960**, 8, 367-368.
- (34) Lee, Y. S.; Kang, D. W.; Lee, S. J.; Park, H. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7149-7152.
- (35) Herzig, J.; Nudelman, A.; Gottlieb, H. E.; Fischer, B. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 727-730.

- (36) Tsuzuki, T.; Nakajima, Y.; Watanabe, T.; Yanagiya, M.; Matsumoto, T. *Tetrahedron Letters* **1978**, 11, 989-982.
- (37) Catálogo Sigma-Aldrich Química Brasil Ltda: São Paulo, 2001-2.
- (38) Morrison, R. T.; Boyd, R. N. *Química Orgânica* 8^a ed.: Fundação C. Gulbenkian: Lisboa, **1986**.
- (39) Perrin, D. D. Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*; third ed.; Pergamon Press: New York, **1998**.