

SÍNTESE, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E MODELAGEM MOLECULAR DE ARILFURANOS COMO INIBIDORES DA ENZIMA TRIPANOTIONA REDUTASE

Renata B. de Oliveira^{*#}, Carlos L. Zani, Rafaela S. Ferreira, Rodrigo S. Leite e Tânia M. A. Alves

Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte – MG, Brasil

Thaís H. A. da Silva

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

Alvaro J. Romanha

Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte – MG, Brasil

Recebido em 4/1/07; aceito em 13/7/07; publicado na web em 19/12/07

SYNTHESIS, BIOLOGICAL EVALUATION AND MOLECULAR MODELING OF ARYLFURANS AS POTENTIAL TRYPANOTHIONE REDUCTASE INHIBITORS. *Trypanosoma cruzi* is a protozoan parasite that causes a severe disease (Chagas' disease) in Central and South America. The currently available chemotherapeutic agents against this disease are still inadequate. The enzyme tripanothione reductase (TR) is considered a validated molecular target for the development of new drugs against this parasite. In this regard, a series of arylfurans based on 2,5-bis-(4-acetamidophenyl)furan was synthesized and tested for their *in vitro* inhibitory activity against TR. Molecular modeling studies of putative enzyme-inhibitor complexes revealed a possible mechanism of interaction. From synthesized compounds, a benzylaminofuran derivative was found to be more active than the lead compound.

Keywords: tripanothione reductase; molecular modeling; arylfurans.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença tropical causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Segundo a Organização Mundial de Saúde, esta endemia atinge entre 16 a 18 milhões de pessoas distribuídas entre México, América Central e América do Sul. Estima-se que 13.000 pessoas morrem por ano vítimas dessa doença¹.

Atualmente, o único fármaco disponível para o tratamento da Doença de Chagas é o benzonidazol, o qual é eficaz apenas na fase aguda da doença, sendo praticamente inócuo para o parasita na fase crônica, estágio em que se encontra a maioria dos chagásicos². Além disso, esse fármaco causa reações adversas muitas vezes graves, entre as quais se destacam: dermatite por hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica³. Portanto, existe uma necessidade urgente de novos agentes quimioterápicos para esta doença, que sejam mais eficazes e com menos efeitos colaterais.

Neste sentido, a descoberta de alvos que possam ser explorados no desenvolvimento de novos fármacos tripanosomicidas é de extrema importância. A enzima tripanotiona reductase (TR) foi descoberta em 1985⁴ e atualmente é considerada um alvo molecular validado para o planejamento de inibidores a serem utilizados no tratamento da doença de Chagas^{5,6}. Esta enzima é dependente de NADPH e catalisa a redução da tripanotiona disulfeto [T(S)₂] em tripanotiona ditiol [T(SH)₂], desencadeando, assim, uma cascata de eventos responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio (Figura 1). Desta forma, a TR mantém um ambiente redutor no interior do

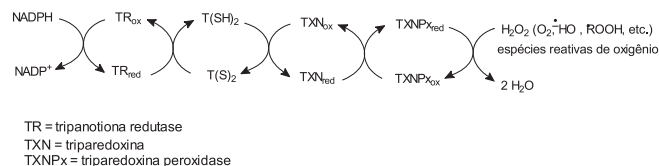


Figura 1. Cascata de eventos, dependentes da TR, responsáveis pela neutralização das espécies reativas de oxigênio

parasita, protegendo-o contra o estresse oxidativo⁵.

Além de exercer uma função fundamental para o parasita, uma outra característica que faz com que a TR seja um alvo interessante para o planejamento de fármacos antiparasitários é a sua significativa diferença estrutural em relação a glutatona reductase (GR), enzima com função correspondente no homem. As principais diferenças entre a TR e a GR estão relacionadas ao tamanho, carga e distribuição dos bolsões hidrofílicos/hidrofóbicos. Estas diferenças fazem com que o sítio ativo da TR, em comparação com o da GR, seja capaz de acomodar facilmente substratos apresentando grupos mais volumosos⁷. Além disso, a TR apresenta resíduos carregados negativamente e regiões hidrofóbicas em seu sítio ativo que são capazes de interagir, *via* interações eletrostáticas e de van der Waals, respectivamente, com seu substrato. Ao contrário, a GR apresenta resíduos de arginina, carregados positivamente, que interagem por ligação eletrostática com seu substrato⁸ (Figura 2). Estas diferenças podem ser aproveitadas no planejamento de inibidores seletivos para a TR.

Recentemente demonstramos que o 2,5-bis-(4-acetilaminofenil)furano (1) é capaz de inibir, na concentração de 48 μM, 50% da atividade da TR⁹. Apesar de apresentar uma atividade considerável como inibidor da TR, a diacetamida (1) não foi ativa nos

*e-mail: renatabo@farmacia.ufmg.br

#Endereço atual: Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

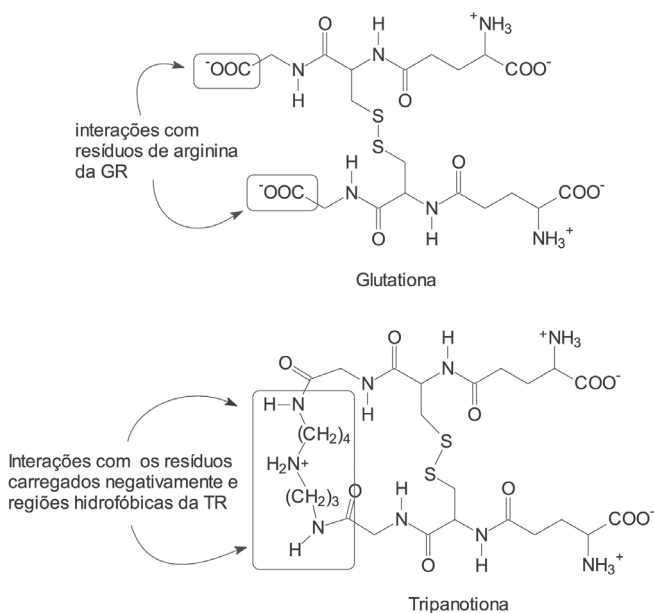
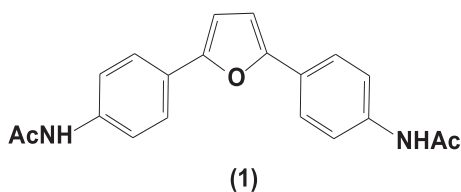


Figura 2. Comparação entre as estruturas da glutathiona e tripanotona, substratos da GR e TR, respectivamente

ensaios *in vitro* utilizando as formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*. Uma explicação para este fato pode estar relacionada com a baixa solubilidade de (1) ($\text{LogP} = 0,39$, calculado usando o programa HyperChem 6.02), o que dificulta sua penetração no parasita e, conseqüentemente, a impede de alcançar concentrações suficientes para a inibição persistente da TR⁹.



Visando a obtenção de inibidores mais ativos e que apresentem melhores características físico-químicas, uma série de aminas e amidas análogas a (1) foi planejada e sintetizada. Esperava-se que a associação de grupos capazes de formar de ligação de hidrogênio (-NH, -CHO, C=S, C=O, -NHCO) e grupos hidrofóbicos, pudesse aumentar a afinidade substrato-enzima. Sabendo-se que substâncias contendo grupos passíveis de sofrerem biorredução e gerarem radicais livres podem atuar como substratos subversivos para a TR^{6,10-13}, planejou-se, também, a síntese de alguns análogos contendo grupo nitro em sua estrutura. As estruturas dos arilfuranos sintetizados neste trabalho são mostradas na Figura 3. Paralelamente, os compostos sintetizados foram submetidos a estudos de super-posição molecular utilizando o programa AutoDock 3.0¹⁴, para dar subsídios ao entendimento sobre o modo de interação destes compostos com a enzima e, conseqüentemente, tornar possível o planejamento de novos inibidores.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos gerais

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho Electrothermal IA9000 e não foram corrigidas. Os espectros de

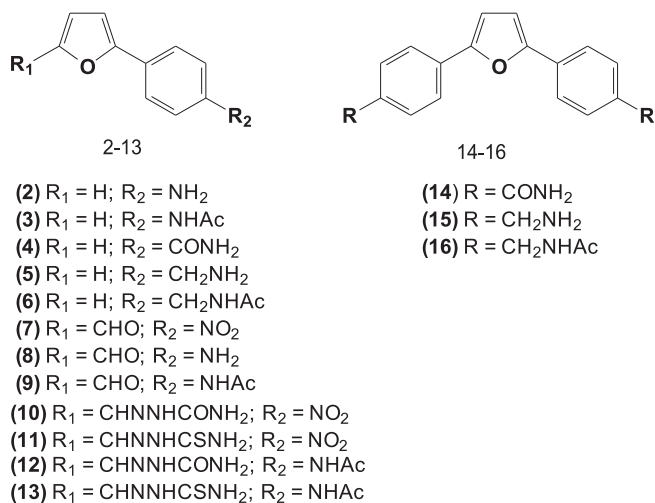


Figura 3. Estruturas dos arilfuranos sintetizados

RMN de ¹H e de ¹³C foram registrados no espectrômetro Bruker Avance DPX200, utilizando-se CDCl₃ ou DMSO-d₆ como solventes e TMS como referência interna. Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas modelo LCQ Advantage com armadilha de íon (Thermo Electron, San Jose, CA) equipado com fonte IES e operado no modo positivo. Os dados espectrais representam a média de 50 varreduras (0,2 s/varredura). As amostras foram inseridas por infusão utilizando seringa e bomba em um fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. As condições de IES foram: temperatura do capilar de 150 °C; gás de arraste N₂ com fluxo de 20 unidades; a voltagem do capilar foi de 4,5 kV.

Os reagentes, todos de grau analítico, foram utilizados sem purificação prévia. As cromatografias em coluna foram realizadas com sílica gel 60, 70-230 mesh. (Merck). A síntese e caracterização estrutural dos arilfuranos 17-19 já foram previamente descritas⁹.

Sínteses

5-(4-nitrofenil)furan-2-carbaldeído (7)¹⁵

Em um balão de fundo redondo, imerso em um banho de gelo e sal, foram adicionados 0,7 g (5,1 mmol) da 4-nitroanilina, 3 mL de ácido clorídrico P.A. e 10 mL de água. Em seguida, adicionou-se, gota a gota, uma solução de 0,350 g (5,1 mmol) NaNO₂ em 10 mL de água gelada. Após 5 min sob agitação magnética à temperatura de 5 °C, adicionaram-se 0,5 mL (0,58 g; 6,0 mmol) do furfural, 20 mL de acetona e 0,13 g de CuCl₂·2H₂O (0,76 mmol). A reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 24 h. Após o término da reação, adicionou-se água destilada e filtrou-se o precipitado formado, lavando-se com água destilada. O sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica e o produto foi eluído com hexano/acetato de etila. Foi obtido 0,83 g (3,8 mmol) de 7, o que corresponde a 75% de rendimento. Ponto de fusão: 203,3-203,9 °C (lit¹⁵, 203 °C). RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ : 9,7 (s, 1H, CHO), 8,35 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz, H-aromáticos), 8,13 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz, H-aromáticos), 7,72 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, H-furano), 7,59 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, H-furano).

Metodologia geral: reação de redução do grupo nitro

Em um balão de fundo redondo adicionaram-se o derivado nitrado 7 ou 17, metanol anidro e, lentamente, aproximadamente 10 mg de carvão contendo 10% de Pd. O balão foi fechado com uma rolha de saia e eliminou-se o oxigênio do sistema com fluxo

de nitrogênio. Em seguida, manteve-se a mistura reagindo sob atmosfera de hidrogênio durante 20 h. Filtrou-se e evaporou-se o filtrado sob pressão reduzida. O produto obtido foi utilizado na próxima etapa de síntese, sem purificação prévia.

5-(4-aminofenil)furano (2)¹⁶

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para redução do grupo nitro, descrita acima. Foi obtido 0,93 g (5,8 mmol) de **2**, o que corresponde a 100% de rendimento. Ponto de fusão: 50,7-53,5 °C. RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ: 7,56 (1H, dd, *J*_{5,4} = 1,8 Hz, H-5, furano); 7,40 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-aromáticos); 6,69 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-aromáticos); 6,56 (1H, dd, *J*_{3,4} = 3,3, H-3, furano); 6,47 (1H, dd, *J*_{4,5} = 1,8 Hz, *J*_{4,3} = 3,3 Hz H-4, furano); 3,54 (2H, sl, NH₂).

5-(4-aminofenil)furano-2-carbaldeído (8)¹⁷

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para redução do grupo nitro, descrita acima. Foi obtido 0,06 g (0,3 mmol) de **8**, o que corresponde a 72% de rendimento. O produto obtido foi utilizado na próxima etapa de síntese, sem purificação prévia e não foi caracterizado.

Metodologia geral: reação de redução da nitrila¹⁸

Em um balão de fundo redondo contendo hidreto de lítio e alumínio, acoplou-se um funil de adição e adicionou-se, gota a gota, tetraidrofurano (THF) anidro, sob banho de gelo e fluxo contínuo de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se, gota a gota, uma solução da nitrila em THF anidro. Deixou-se a mistura sob agitação magnética à temperatura ambiente e fluxo de nitrogênio durante 24 h. Posteriormente, adicionaram-se à mistura, lentamente, 0,5 mL de água e 0,5 mL de solução de NaOH a 20%. Filtrou-se e extraiu-se com 3 x 40 mL de éter etílico. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio, filtrou-se e evaporou-se o filtrado sob pressão reduzida. O produto obtido foi utilizado na próxima etapa de síntese, sem purificação prévia.

2-(4-aminobenzil)furano (5)

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para redução de nitrila, descrita acima. Foi obtido 0,14 g (0,81 mmol) de **5**, o que corresponde a 69% de rendimento. P.F.: 98,3-99,9 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ: 7,72-7,62 (4H, m, 4xH-aromáticos); 7,39 (1H, d, *J*_{5,4} = 1,8, H-5 furano); 6,90 (1H, d, *J*_{3,4} = 3,3, H-3 furano); 6,58 (1H, dd, *J*_{4,5} = 1,8 Hz, *J*_{4,3} = 3,3 Hz, H-4 furano); 3,75-3,50 (4H, m, 2xH-benzílicos e NH₂). IES-EM: [M+H]⁺ 174.

2,5-bis-(4-aminobenzil)furano (15)¹⁹

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para redução de nitrila, descrita acima. Foi obtido 0,38 g (1,37 mmol) de **15**, o que corresponde a 76% de rendimento. P.F.: 108,4-110,3 °C. RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ: 7,73 (4H, d, *J* = 7,9 Hz, 4xH-aromáticos); 7,40 (4H, d, *J* = 7,9 Hz, 4xH-aromáticos); 6,99 (2H, s, H-3 e H-4 furano); 3,74-3,69 (8H, m, 4xH-benzílicos e 2xNH₂).

Metodologia geral: reação de acetilação do grupo amina²⁰

Em um balão de fundo redondo contendo o derivado amina, adicionaram-se anidrido acético e uma solução de acetato de sódio a 5%. Deixou-se a mistura sob agitação magnética e banho de gelo por cerca de 30 min. Adicionou-se, então, água destilada e transferiu-se a mistura para um funil de separação. Extraiu-se com 3 x 40 mL de acetato de etila. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio, filtrou-se e evaporou-se o filtrado sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando hexano/acetato de etila como eluentes.

2-(4-acetilaminofenil)furano (3)²¹

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para acetilação de grupo amina, descrita acima. Foi obtido 0,44 g (2,19 mmol) de **3**, o que corresponde a 50% de rendimento. Ponto de fusão: 185,4-187,7 °C. RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ: 10,04 (1H, sl, NH); 7,68 (1H, d, *J*_{5,4} = 1,8 Hz, H-5 furano); 7,63 (4H, m, H-aromáticos); 6,81 (1H, d, *J*_{3,4} = 3,2 Hz, H-3 furano); 6,55 (1H, dd, *J*_{4,5} = 1,8 Hz; *J*_{4,3} = 3,2 Hz, H-4 furano).

5-(4-acetilaminofenil)furano-2-carbaldeído (9)¹⁷

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para acetilação de grupo amina, descrita acima. Foi obtido 0,014 g (0,06 mmol) de **9**, o que corresponde a 23% de rendimento. P.F.: 181,7-185,4 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ: 10,19 (1H, s, CHO); 9,57 (1H, s, NH), 7,82 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-aromáticos), 7,72 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-aromáticos), 7,64 (1H, d, *J*_{3,4} = 3,8 Hz, H-3 furano); 7,17 (1H, d, *J*_{4,3} = 3,8 Hz, H-4 furano), 2,08 (3H, s, CH₃CO).

2-(4-acetilaminobenzil)furano (6)

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para acetilação de grupo amina, descrita acima. Foi obtido 0,063 g (0,29 mmol) de **6**, o que corresponde a 51% de rendimento. P.F. = 145,3-147,4 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ: 8,38 (1H, t, *J* = 5,9 Hz, NH), 7,73 (1H, d, *J*_{5,4} = 1,4 Hz, H-5 furano), 7,65 (2H, d, *J* = 8,2 Hz, 2xH-aromáticos), 7,30 (2H, d, *J* = 8,2 Hz, 2xH-aromáticos); 6,91 (1H, d, *J*_{3,4} = 3,3 Hz, H-3 furano), 6,58 (1H, dd, *J*_{4,5} = 1,4 Hz, *J*_{4,3} = 3,3 Hz, H-4 furano), 4,27 (2H, d, *J* = 5,9 Hz, 2xH-benzílicos), 1,89 (3H, s, CH₃CO); IES-EM: [M+H]⁺ 216, [M+Na]⁺ 238, [2M+H]⁺ 431, [2M+Na]⁺ 453.

2,5-bis-(4-acetilaminobenzil)furano (16)

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para acetilação de grupo amina, descrita acima. Foi obtido 0,23 g (0,64 mmol) de **16**, o que corresponde a 58% de rendimento. P.F.: 263,4-266,7 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ: 7,71 (2H, t, *J* = 5,8 Hz, 2xNH), 7,08 (4H, d, *J* = 8,1 Hz, 4xH-aromáticos), 6,65 (4H, d, *J* = 8,1 Hz, 4xH-aromáticos), 6,36 (2H, s, H-3 e H-4 furano); 3,59 (4H, d, *J* = 5,8 Hz, 4xH-benzílicos), 1,22 (6H, s, 2xCH₃CO); IES-EM: [M+Na]⁺ 385, [2M+Na]⁺ 747.

2-(4-benzamida)furano (4)

Em um balão de fundo redondo adicionaram-se 352 mg de **18** (2,1 mmol), 10 mL de etanol e 10 mL de dioxano. Em seguida, adicionaram-se uma solução de 2,5 g de hidróxido de sódio (62,5 mmol) em 10 mL de água e 15 mL de H₂O₂ 20%. A mistura foi aquecida a 60 °C durante 2 h. A mistura foi extraída com 3 x 50 mL de acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas, adicionou-se sulfato de sódio anidro e filtrou-se. O filtrado foi, então, evaporado sob pressão reduzida e o sólido obtido foi purificado por recristalização em etanol²². Foi obtido 0,140 g (0,75 mmol) de **4**, o que corresponde a 36% de rendimento. P.F.: 232,7-235,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ 8,02 (1H, sl, NH); 7,94 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-aromáticos); 7,80 (1H, d, *J*_{5,4} = 1,8 Hz, H-5 furano); 7,78 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-aromáticos); 7,40 (1H, sl, NH); 7,10 (1H, d, *J*_{3,4} = 3,4 Hz, H-3 furano); 6,64 (1H, dd, *J*_{4,5} = 1,8 Hz, *J*_{4,3} = 3,4 Hz, H-4 furano); IES-EM: [M+H]⁺ 188.

2,5-bis-(4-benzamida)furano (14)

Aqueceu-se a 85 °C, 157 mg de **19** (0,58 mmol) em 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, sob agitação magnética, durante 5 min. A solução foi, então, resfriada e lentamente vertida sobre 5 mL de água gelada, resultando na formação de um precipitado. O precipitado foi separado por filtração a vácuo, agitado com 5 mL de solução de hidróxido

de sódio 5% e filtrado novamente²⁰. Foi obtido 0,08 g (0,26 mmol) de **14**, o que corresponde a 44% de rendimento. RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ 8,09 (2H, sl, 2xN-H); 7,96 (8H, m, 8xH-aromáticos); 7,44 (2H, sl, 2xN-H); 7,27 (2H, s, H-4 e H-3 furano).

Metodologia geral: síntese das semicarbazonas

Em um balão de fundo redondo contendo uma solução do aldeído (1 equivalente) em etanol, adicionaram-se uma solução do cloridrato de semicarbazida (1 equivalente) e acetato de sódio (1 equivalente) em água. A mistura foi aquecida a 40 °C durante 20 h. Adicionou-se água destilada e a mistura foi transferida para um funil de separação e extraiu-se com 3 x 30 mL de acetato de etila. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio, filtrou-se e evaporou-se o filtrado sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por CCS utilizando hexano/acetato de etila como eluentes.

5-(4-nitrofenil)-2-furfurilideno semicarbazona (**10**)²³

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para síntese de semicarbazona, descrita acima. Foi obtido 0,025 g (0,09 mmol) de **10**, o que corresponde a 38% de rendimento. P.F.: 210,8-212,8 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ 10,46 (1H, s, CHO); 8,26 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-aromáticos); 8,02 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-aromáticos); 7,80 (1H, s, NH); 7,40 (1H, d, *J*_{3,4} = 3,6 Hz, H-3 furano); 7,00 (1H, d, *J*_{4,3} = 3,6 Hz, H-4 furano); 6,52 (2H, s, NH₂).

5-(4-acetilaminofenil)-2-furfurilideno semicarbazona (**12**)

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para síntese de semicarbazona, descrita acima. Foi obtido 0,050 g (0,17 mmol) de **12**, o que corresponde a 79% de rendimento. P.F.: 244,1-247,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ 10,29 (1H, s, CHO ou NH), 10,07 (1H, s, NH ou CHO), 7,72 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, 2xH-aromáticos); 7,64 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, 2xH-aromáticos), 6,93 (1H, d, *J*_{3,4} = 3,4 Hz, H-3 furano), 6,87 (1H, d, *J*_{4,3} = 3,4 Hz, H-4 furano), 6,42 (2H, s, NH₂), 2,05 (3H, s, CH₃CO). IES-EM: [M+H]⁺ 287.

Metodologia geral: síntese das tiossemicarbazonas

Em um balão de fundo redondo contendo uma solução do aldeído (1 equivalente) em etanol e ácido acético, adicionou-se uma solução da tiossemicarbazida (1 equivalente) em etanol. A mistura foi aquecida a 40 °C durante 20 h. Adicionou-se água destilada e a mistura foi transferida para um funil de separação e extraiu-se com 3 x 30 mL de acetato de etila. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio, filtrou-se e evaporou-se o filtrado sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por CCS utilizando hexano/acetato de etila como eluentes.

5-(4-nitrofenil)-2-furfurilideno tiossemicarbazona (**11**)²⁴

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para síntese de tiossemicarbazona, descrita acima. Foi obtido 0,042 g (0,14 mmol) de **11**, o que corresponde a 38% de rendimento. P.F.: 211,2-213,6 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ 11,62 (1H, s, CHO); 8,39 (1H, s, NH); 8,24 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, 2xH-aromáticos); 8,06-7,99 (3H, m, 2xH-aromáticos, NH); 7,87 (1H, s, NH); 7,41 (1H, d, *J*_{3,4} = 3,6 Hz, H-3 furano); 7,14 (1H, d, *J*_{4,3} = 3,6 Hz, H-4 furano).

5-(4-acetilaminofenil)-2-furfurilideno tiossemicarbazona (**13**)

A reação foi realizada conforme a metodologia geral para síntese de tiossemicarbazona, descrita acima. Foi obtido 0,026 g (0,09 mmol) de **13**, o que corresponde a 39% de rendimento. P.F.: 191,6-193,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆): δ 11,47 (1H, s, CHO), 10,08 (1H, s, NH), 7,96 (2H, s, NH₂), 7,76 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, 2xH-

aromáticos); 7,65 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, 2xH-aromáticos), 7,03 (1H, d, *J*_{3,4} = 3,5 Hz, H-3 furano), 6,97 (1H, d, *J*_{4,3} = 3,5 Hz, H-4 furano), 2,02 (3H, s, CH₃CO); IES-EM: [M+H]⁺ 303.

Ensaio biológicos

Ensaio com a enzima tripanotona redutase⁹

O ensaio colorimétrico foi conduzido em placas de 96 poços sendo que cada poço (250 μL) continha: 40 mM de HEPES (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 5,12 mUI da enzima (TR), 0,8 μM do substrato (T(S)₂), 0,12 mM de NADPH, 100 μM da substância a ser testada (solução aquosa contendo 0,1% de DMSO). Controles com 6,5 μM de clomipramina (controle positivo) e sem amostra (controle negativo) foram conduzidos em paralelo. A mistura foi pré-encubada a 30 °C durante 30 min e a leitura iniciada após a adição de 25 μM de DTNB (reagente de Ellman) em λ₄₁₀ nm, medindo-se a inclinação da curva (δAbs/δt). Este valor foi comparado com o controle sem amostra para fornecer o percentual de inibição da enzima. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos por, no mínimo, duas vezes. Foram consideradas ativas as amostras capazes de inibir em pelo menos 50% a atividade da enzima.

Ensaio in vitro com *T. cruzi*⁹

Sangue de camundongos infectados com as formas tripomastigotas de cepas Y de *T. cruzi* foi utilizado nos experimentos. As substâncias foram testadas em placas de 96 poços, sendo que cada poço continha: 195 μL de sangue infectado (2,4 x 10⁶ parasitas/mL) e 5 μL da solução da substância a ser testada em DMSO. As placas foram mantidas a 4 °C. Após 24 h, a concentração do parasita foi avaliada utilizando microscopia ótica. A redução da concentração do parasita (lise do parasita) foi determinada em comparação com os parasitas não tratados. Controle positivo (7,5 μg/mL; 3,0 μM de cristal violeta) e controle do solvente (2,5% de DMSO v/v) foram realizados em todos os experimentos. Os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes.

Estudos de superposição molecular

As coordenadas da tripanotona redutase complexada com a tripanotona foram obtidas do "Brookhaven Protein Data Bank" (código PDB 1BZL). As moléculas de água e as moléculas de tripanotona foram extraídas do complexo. As moléculas de FAD e a proteína foram submetidas separadamente a cálculos de cargas atômicas. As cargas foram determinadas utilizando métodos disponíveis no programa AutoDock 3.0¹⁴. Para a macromolécula foram adicionados os hidrogênios polares (hidrogênios ligados a heteroátomos) e calculadas as cargas Kollman²⁵. Ao resíduo de FAD foram adicionados todos os hidrogênios, calculadas as cargas Gasteiger²⁶ e os hidrogênios não polares foram reunidos aos carbonos aos quais estavam ligados. Os arquivos da proteína e do FAD foram reunidos em um único arquivo para efetuar os cálculos de superposição. O AutoDock requer mapas de grade de afinidade pré-calculados para cada um dos tipos de átomos presentes nos ligantes a serem submetidos à superposição. Os mapas das grades de afinidade consistem de uma rede de pontos, espaçados regularmente, que armazenam a energia potencial de um átomo "prova" em relação a todos os átomos da macromolécula. As grades de afinidade foram então geradas usando o programam auxiliar AutoGrid²⁷. Um dos átomos de enxofre da tripanotona no sítio ativo foi escolhido como centro da grade que foi construída com 71x71x71 pontos com espaçamento de 0,375 Å entre os pontos da grade. Constatou-se que a macromolécula apresenta átomos de fósforo cujos parâmetros Lennard-Jones não esta-

vam incluídos no programa AutoDock. Estes, então, foram definidos ($R_{ij} = 4,2 \text{ \AA}$ e $E_{ij} = 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$) com base na literatura²⁵.

Nos cálculos utilizando o AutoGrid e o AutoDock foram empregados potenciais para ligações de hidrogênio envolvendo os heteroátomos O, N e S, tanto para o ligante quanto para a macromolécula¹⁴. No experimento de superposição molecular foram realizadas 50 corridas de algoritmo genético Lamarckiano (algoritmo genético com busca local) e o número máximo de avaliações de energia de 500.000 e os outros parâmetros de algoritmo genético (GA) e busca local (LS) de acordo com o descrito por Morris e colaboradores¹⁴. A energia livre é utilizada no cálculo da constante de inibição K_i , usando a equação $\Delta G = RT \ln K_i$, onde R é a constante dos gases ($1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta, assumida como temperatura ambiente, 298,15 K. Observe que esta equação perdeu seu sinal negativo porque a constante de inibição é definida para a reação de dissociação, $E \rightleftharpoons E + I$, enquanto ΔG_{obs} refere-se ao processo oposto de ligação $E + I \rightleftharpoons E$, onde E é a enzima e I o inibidor. Para facilitar a análise dos dados, os valores de K_i foram transformados nos seus respectivos pK_i ($pK_i = -\log K_i$).

Após a realização dos cálculos de superposição molecular e da variação de ΔG envolvida na formação do complexo ligante-enzima, analisaram-se as interações químicas e o posicionamento da conformação energeticamente mais estável de cada ligante no sítio ativo da TR. Para tanto se construíram arquivos contendo a conformação mais estável de cada ligante, prevista pelo AutoDock, e todos os resíduos de aminoácidos próximos ao ligante. Foram identificados todos os heteroátomos da macromolécula a uma distância inferior a $3,5 \text{ \AA}$ de um heteroátomo do ligante, como possíveis pontos de formação de ligação de hidrogênio²⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese

Os arilfuranos **7**, **17-19** foram obtidos, utilizando o furano ou furfural e a 4-nitroanilina ou 4-aminobenzonitrila como materiais de partida⁹, de acordo com a metodologia de síntese descrita por Meerwein²⁹.

Os nitroarilfuranos **7** e **17** foram submetidos à reação de hidrogenação catalítica, utilizando H_2 sob Pd/C, resultando na obtenção dos derivados amino **2** e **8**, respectivamente. Acetilação de **2** e **8** levou à formação das monoacetamidas **3** e **9**, respectivamente.

A redução das nitrilas **18** e **19** utilizando $LiAlH_4$ resultou na formação das benzilaminas **5** e **15** que foram, em seguida, submetidas à reação de acetilação, originando as benzilacetamidas **6** e **16**, respectivamente.

A hidrólise das nitrilas **18** e **19** foi realizada, para fins de comparação, utilizando-se duas condições de reação: em meio básico, em um processo catalisado por H_2O_2 e, em meio ácido, por reação com ácido sulfúrico concentrado. No caso da nitrila **18**, a hidrólise em meio ácido resultou na degradação do material de partida com a formação de produtos mais polares, difíceis de serem isolados, purificados e identificados. Entretanto, realizando-se a reação em meio básico, foi possível obter a monobenzamida **4** com 36% de rendimento. Os resultados obtidos na hidrólise da dinitrila **19** foram opostos aos da monotrila **18**. A reação realizada em meio ácido apresentou melhor rendimento (44% de rendimento) que a reação em meio básico (10% de rendimento).

As semicarbazonas **10** e **12** foram obtidas reagindo-se os aldeídos correspondentes **7** e **9**, respectivamente, com cloridrato de semicarbazida. Da mesma forma, as tiossemicarbazonas **11** e **13** foram obtidas por reação do aldeído correspondente com a tiossemicarbazida.

A obtenção de semicarbazonas e tiossemicarbazonas foi baseada no fato de que compostos contendo tais grupos, freqüentemente, apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas em Química Medicinal³⁰. Além disso, recentemente, foi demonstrado que 5-nitrofurfural-2-carboxaldeído semicarbazonas (Figura 4) são potenciais inibidores da TR e apresentam considerável atividade tripanosomicida^{10,31}.

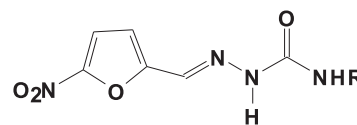


Figura 4. Estrutura geral de 5-nitrofurfural-2-carboxaldeído semicarbazonas

Pode-se observar que a semicarbazona **10** é um análogo da 5-nitrofurfural-2-carboxaldeído semicarbazona (R = H), sendo a única diferença a presença de um anel aromático entre o grupo nitro e o furano.

Ensaio com a enzima tripanotona redutase X estudos de superposição molecular

Todas as substâncias sintetizadas foram testadas, na concentração de $100 \mu\text{M}$, no ensaio *in vitro* com a enzima TR. Controles com $6,5 \mu\text{M}$ de clomipramina (controle positivo) e sem amostra (controle negativo) foram conduzidos em paralelo. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos por, no mínimo, duas vezes.

Com o objetivo de testar a consistência do método computacional descrito na Parte Experimental, foi realizado um experimento de superposição da tripanotona no sítio ativo da TR. A solução de menor energia calculada é muito similar à posição da tripanotona revelada na estrutura cristalográfica do complexo TR-tripanotona depositado no PDB (1BZL). Foram observadas as seguintes interações da tripanotona com a TR: um bolso de ligação com uma superfície hidrofóbica formada pelos resíduos LEU18, TRP22, TYR111, MET114, PHE396' e THR397' voltada para o lado onde se encontra a porção espermidina da tripanotona, e um sítio hidrofílico composto de aminoácidos com distâncias adequadas para formação de ligações de hidrogênio com a porção tripeptídica da tripanotona constituído dos seguintes resíduos: SER15, LEU18, GLU19, SER110, TYR111, PRO336, LEU399', HIS461', THR463', SER464', GLU466' e SER470'.

Confirmada a consistência do método, os experimentos utilizando os arilfuranos **1-16** como substratos para TR foram conduzidos de acordo com as condições estabelecidas anteriormente, originando os resultados mostrados na Tabela 1, onde também estão registrados os resultados dos ensaios de inibição da TR.

O valor de K_i foi calculado diretamente a partir de ΔG , sendo menor para valores de ΔG mais negativos. Em geral, teoricamente, os compostos que apresentaram maior porcentagem de inibição da enzima nos estudos *in vitro* deveriam apresentar os menores valores de ΔG e, portanto, maiores valores de pK_i . A constante de inibição é a medida intrínseca da afinidade do inibidor pela enzima, enquanto outros fatores podem influenciar a medida da porcentagem de inibição³². A partir da análise dos resultados obtidos, verifica-se a ocorrência dessa relação em alguns dos casos. Os compostos com maior porcentagem de inibição (**1** e **15**) apresentaram os maiores valores de pK_i e o de menor porcentagem de inibição (**3**) apresentou o menor valor de pK_i .

Após a realização dos cálculos de energia de interação entre ligante e enzima, analisaram-se as interações químicas dos arilfuranos no sítio ativo da enzima, considerando em cada caso o

Tabela 1. Porcentagem de inibição da enzima tripanotona redutase e constantes de inibição previstas pelo programa AutoDock para os compostos sintetizados

Substrato	Dados Teóricos		Dados Experimentais
	ΔG (kcal mol ⁻¹)	pK _i	% inibição (100 μ M)
Tripanotona	-12,77	9,36	-
1	-8,6	6,3	62,3 \pm 15,1
2	-7,78	5,7	7,0 \pm 3,5
3	-5,85	4,3	5,9 \pm 1,0
4	-6,64	4,9	32,6 \pm 0,7
5	-7,52	5,5	44,9 \pm 13,1
6	-6,24	4,6	24,2 \pm 4,1
7	-7,75	5,7	36,2 \pm 1,1
8	-6,72	4,9	6,6 \pm 0,5
9	-6,58	4,8	48,1 \pm 2,6
10	-7,95	5,8	14,3 \pm 0,5
11	-8,14	6,0	15,7 \pm 0,8
12	-7,8	5,7	19,5 \pm 7,8
13	-7,59	5,6	22,5 \pm 3,5
14	-7,79	5,7	27,4 \pm 4,4
15	-9,07	6,7	63,0 \pm 1,7
16	-8,27	6,1	26,5 \pm 3,5

complexo mais favorável energeticamente. A partir desses estudos foi possível propor uma explicação para a diferença de atividade entre esses compostos.

Os monoarilfuranos **3**, **8** e **9** foram menos ativos tanto em relação aos valores teóricos quanto em relação aos resultados experimentais. A mesma correlação não foi tão evidente em relação aos monoarilfuranos **2**, **4** e **6**, os quais apresentaram uma certa discrepância entre resultados teóricos e experimentais. Dentre os monoarilfuranos, apenas a benzilamina **5** e a acetamida **9** apresentaram atividade considerável (44 e 48% de inibição da enzima, respectivamente). A atividade apresentada por **5** pode ser justificada em função da possibilidade de interações eletrostáticas entre o grupo NH₃⁺ de **5** e os grupos carboxilatos dos resíduos GLU467 e GLU466. Paulino e colaboradores¹² realizaram estudos de superposição molecular de derivados 5-nitrofurano e 5-nitrotiofeno semi-

carbazonas com a TR e GR e enfatizaram a importância da carga positiva para aumentar a especificidade e afinidade dos compostos para a interação com a TR. Em relação à acetamida **9**, observou-se um maior número de interações com a enzima quando comparada com a acetamida **3** e uma dessas interações envolve o grupo carbonila do aldeído de **9** (ligação de hidrogênio com o NH do resíduo de MET400 da TR). Portanto, neste caso, a presença do grupo carbonila teve uma importância efetiva para o aumento da atividade.

A presença da porção semicarbazona e tiosemicarbazona nos compostos **10-13** não ofereceu nenhuma vantagem em relação ao número de interações possíveis com a enzima, quando comparados com a diacetamida **1**, utilizada como protótipo. O derivado nitrado **10** apresentou baixa afinidade pela TR (14,3% de inibição), apesar da sua semelhança estrutural com o 5-nitrofurfural-2-carboxaldeído semicarbazona (Figura 4).

Na maioria dos casos, os diarilfuranos ocuparam uma região no sítio ativo da enzima correspondente à região ocupada pela cadeia peptídica do substrato natural (tripanotona) (Figura 5).

Os diarilfuranos **14** e **16** apresentaram, no sítio da TR, uma posição semelhante à da diacetamida **1**, porém com um menor número de interações, o que refletiu em uma maior energia de encaixe e maior K_i calculado, justificando, assim, sua menor afinidade pela enzima e menor atividade no teste *in vitro*. Em relação à dibenzilamina **15**, observa-se que ocupa uma posição no sítio ativo totalmente diferenciada do restante das moléculas. Foram encontrados três possíveis sítios de interação eletrostática entre a dibenzilamina **15** com os grupos carboxilato dos resíduos GLU19, GLU113 e ASP117. Além disto, foi observada uma interação do tipo π "stacking" do anel furano com o anel indólico do TRP22. Apesar de estar em uma posição diferente no sítio ativo, comparada com a tripanotona, as fortes interações justificam sua afinidade pelo receptor e sua maior atividade, tanto teórica quanto experimental.

A atividade tripanosomicida da dibenzilamina **15** contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* também foi avaliada. *In vitro*, a dibenzilamina **15** foi capaz de eliminar o parasita do sangue murino infectado na dose de 250 μ g/mL, o que representa uma atividade 20 vezes maior que a da diacetamida **1** (Tabela 2). A maior atividade apresentada por **15** pode estar relacionada, além da sua maior força de interação com a TR, à sua melhor solubilidade e facilidade de penetração no parasita.

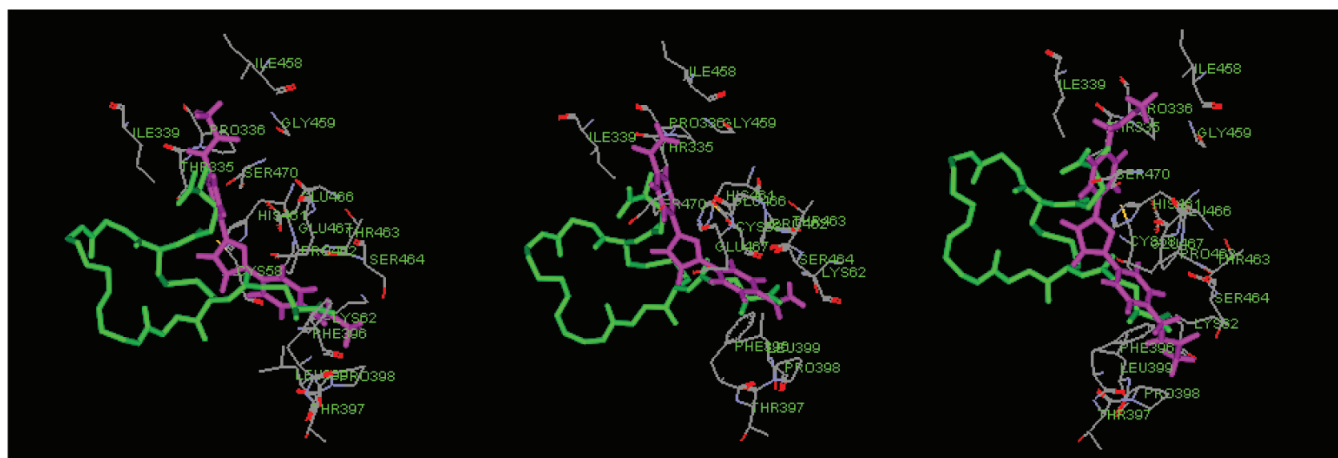


Figura 5. Solução de menor energia encontrada no experimento de superposição molecular da: diacetamida **1** (esquerda); dibenzilamina **14** (centro) e dibenzilacetamida **16** (direita) (rosa) com a TR. Em verde, para fins de comparação, a tripanotona na conformação da estrutura cristalina

Tabela 2. Comparação entre a atividade tripanosomicida apresentada pela diacetamida **1** e dibenzilamina **15**

Arilfurano	Atividade tripanosomicida (% de lise)*			
	Concentração 250 µg/mL	Concentração 125 µg/mL	Concentração 62,5 µg/mL	Concentração 31,25 µg/mL
1	5	-	-	-
15	100	97	49	3,2

*Violeta de genciana foi utilizada como controle positivo na concentração de 3,0 µM (IC₅₀).

CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizados 15 derivados de mono- e diarilfuranos, sendo 7 inéditos (compostos **4-6**, **12-14** e **16**). Todas as substâncias sintetizadas foram avaliadas *in vitro* como potenciais inibidores da TR. Dentre as substâncias testadas, os arilfuranos **5**, **9** e **15** foram os que apresentaram maior capacidade de inibição da enzima (45, 48 e 63% de inibição, respectivamente). Estudos de superposição molecular utilizando o programa AutoDock 3.0 foram realizados em paralelo, o que nos permitiu propor um modo de interação destas substâncias com a TR. Somente a dibenzilamina **15** apresentou melhor atividade em relação ao protótipo **1** (62% de inibição), o que está em concordância com os resultados dos estudos de superposição molecular. A atividade tripanosomicida da dibenzilamina **15** contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* também foi avaliada, sendo 20 vezes mais ativa que o protótipo. A melhor atividade apresentada por **15** pode estar relacionada tanto a fatores farmacocinéticos (melhor solubilidade) quanto a fatores farmacodinâmicos (maior afinidade pela enzima). Dando prosseguimento a estes estudos, quantidades adicionais da dibenzilamina **15** serão preparadas, visando avaliação de sua atividade *in vivo*. Nenhuma outra substância apresentou atividade considerável, porém, os resultados obtidos neste trabalho serão de fundamental importância para planejamento de novos inibidores e estudos posteriores.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os esquemas de síntese e algumas figuras ilustrando as interações entre os mono- e diarilfuranos e a enzima tripanotona redutase, obtidas a partir dos experimentos de superposição molecular, encontram-se disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo pdf, com acesso gratuito.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos financiadores CNPq, FAPEMIG e Fiocruz.

REFERÊNCIAS

- World Health Organization; <http://www.who.int/tdr/diseases>, acessada em Agosto 2006.
- Castro, S. L.; *Acta Tropica* **1993**, *53*, 83.
- Brener, Z.; Andrade, Z. A.; Barral-Netto, M.; *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.
- Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T.; Cerami, A.; *Science* **1985**, *227*, 1485.
- Schmidt, A.; Krauth-Siegel, R. L.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1239.
- Chibale, K.; Musonda, C. C.; *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1863.
- Girault, S.; Davioud-Charvet, T. E.; Maes, L.; Dubremets, J. F.; Debreu, M. A.; Landry, V.; Sergheraert, C.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 837.
- Bond, C. S.; Zhang, Y.; Berriman, M.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, F. H.; Hunter, W. N.; *Structure* **1999**, *7*, 81.
- Oliveira, R. B.; Vaz, A. B. M.; Alves, R. O.; Liarte, D. B.; Donnici, C. L.; Romanha, A. J.; Zani, C. L.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 169.
- Aguirre, G.; Cabrera, E.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Seoane, G.; Duffaut, A.; Denicola, A.; Gil, M. J.; Martínez-Merino, V.; *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 421.
- Maya, J. D.; Bollo, S.; Nunez-Vergara, L. J.; Squella, J. A.; Repetto, Y.; Morello, A.; Périé, J.; Chauvière, G.; *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 999.
- Paulino, M.; Iribarne, F.; Hansz, M.; Vega, M.; Seoane, G.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; Caracelli, I.; Zukerman-Schpector, J.; Olea, C.; Stoppani, A. O. M.; Berriman, M.; Fairlamb, A. H.; Tapia, O.; *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2002**, *584*, 95.
- Jockers-Scherübl, M. C.; Schirmer, R. H.; Krauth-Siegel, R. L.; *Eur. J. Biochem.* **1989**, *180*, 267.
- Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J.; *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639.
- Paizs, C.; Tahtinen, P.; Lundell, K.; Poppe, L.; Irimie, F. D.; Kanerva, L. T.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1895.
- King, F. D.; Walton, D. R. M.; *Synthesis* **1976**, *1*, 40.
- Wiesner, J.; Mitsch, A.; Jomaa, H.; Schlitzer, M.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2159.
- Costa, P.; Pili, R.; Pinheiro, S.; Vasconcelos, M.; *Substâncias carboniladas e derivados*, Artmed Ed. S.A.: Porto Alegre, 2003.
- Wilson, W. D.; Ratmeyer, L.; Zhao, M.; Streckowski, L.; Boykin, D.; *Biochemistry* **1993**, *32*, 4098.
- Vogel, A. I.; *Análise orgânica qualitativa*, 3ª ed., Ed. Ao Livro Técnico: Rio de Janeiro, 1971, vol. 2.
- Hashmi, A. S. K.; Choi, J. H.; Bats, J. W.; *J. Prakt. Chem.* **1999**, *341*, 342.
- Mitsch, A.; Wibner, P.; Silber, K.; Haebel, P.; Sattler, I.; Klebe, G.; Schlitzer, M.; *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4585.
- White, R. L.; Schwan, T. J.; *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 135.
- Holla, B. S.; Malini, K. V.; Rao, B. S.; Sarojini, B. K.; Kumari, N. S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 313.
- Weiner, S. J.; Kollman, K. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, S. Jr.; Weiner, P. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 765; Weiner, P.; Kollman, P.; *J. Comput. Chem.* **1981**, *2*, 287.
- Gasteiger, J.; Marsili, M.; *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219.
- Goodford, P. J.; *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 849.
- Höltje, H. D.; Folkers, G.; *Molecular modeling basing principles and applications*, VCH: Weinheim, 1996.
- Rondevedt, C. S.; *Org. React.* **1976**, *24*, 225.
- Beraldo, H.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 461.
- Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Risso, M.; Sagrera, G.; Seoane, G.; Denicola, A.; Peluffo, G.; Quijano, C.; Stoppani, A. O. M.; Paulino, M.; Olea-Azar, C.; Basombrio, M. A.; *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 343.
- Holloway, M. K. Em *3D QSAR in Drug Design – Ligand-Protein Interactions and Molecular Similarity*; Kubiny, H.; Folkers, G.; Martin, Y., eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1998, vol. 2, p. 63-84.