

Artigo

Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 α -desmetilase Contra *Trypanosoma cruzi*

França, R. R. F.; Carvalho, A. S.; Branco, F. S. C; Pinto, A. C.; Boechat, N.*

Rev. Virtual Quim., 2014, 6 (5), 1483-1516. Data de publicação na Web: 25 de julho de 2014

<http://www.uff.br/rvq>**Potent Inhibitors of the Enzyme Sterol 14 α -demethylase Against *Trypanosoma cruzi***

Abstract: Chagas disease is a neglected tropical disease that affects more than 10 million people worldwide and threatens other 25 million who live in areas of risk. In this work, it is described how inhibitors of the enzyme 14 α -demethylase (CYP51) were explored based in the piggyback approach, which is a strategy used to find new applications for known drugs or leads, in this case, against *Trypanosoma cruzi*. It is shown how the azole class acts in the inhibition of this target, which is a key in the process of ergosterol biosynthesis, a major sterol of the parasite. Their synthetic routes are described in detail and the relationship between the chemical structure of these molecules and the biological activity are correlated.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; sterol biosynthesis inhibitors; azoles; 14 α -demethylase; medicinal chemistry.

Resumo

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada que afeta mais de 10 milhões de pessoas em todo mundo e ameaça outras 25 milhões que vivem em áreas de risco. Este trabalho descreve como os inibidores da enzima 14 α -desmetilase (CYP51) foram explorados com base na estratégia “piggyback approach”, termo em inglês que descreve a estratégia de uma nova aplicação para um fármaco ou protótipo originalmente desenvolvido para outra patologia, onde, neste caso, foram investigados contra o *Trypanosoma cruzi*. Desta forma, é mostrado como a classe dos azóis atua na inibição deste alvo, que é chave no processo da biossíntese do ergosterol, um esteroide fundamental para a sobrevivência do parasita. Suas rotas sintéticas são descritas em detalhes e as relações entre a estrutura química dessas moléculas e a atividade biológica são correlacionadas.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; inibidores da biossíntese de ergosterol; azóis; 14 α -desmetilase; química medicinal.

* Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Departamento de Síntese Orgânica, Rua Sizenando Nabuco, 100, Manguinhos, CEP 21041-250, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ boechat@far.fiocruz.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20140096](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140096)

Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 α -desmetilase Contra *Trypanosoma cruzi*

Rodolfo Rodrigo F. França,^{a,b} Alcione S. de Carvalho,^a Frederico S. C. Branco,^{a,b} Angelo C. Pinto,^b Núbia Boechat^{a,*}

^a Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Departamento de Síntese Orgânica, Rua Sizenando Nabuco, 100, Manguinhos, CEP 21041-250, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^b Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza, Instituto de Química, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149, Cidade Universitária, CEP 21941-909 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* boechat@far.fiocruz.br

Recebido em 10 de julho de 2014. Aceito para publicação em 17 de julho de 2014

1. Introdução

1.1. Biossíntese do ergosterol

1.2. Azóis: inibidores da enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51)

2. Inibidores da enzima CYP51: classe de imidazóis

3. Inibidores da enzima CYP51: classe da primeira geração de triazóis

4. Inibidores da enzima CYP51: classe da segunda geração de triazóis

5. Conclusão

1. Introdução

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descoberta em 1909, pelo cientista Carlos Chagas, que identificou o agente etiológico, o vetor, o hospedeiro, as manifestações clínicas e a epidemiologia da doença.¹ Essa patologia tem como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* que é vetorizado por insetos triatomíneos, mais conhecidos no Brasil como “barbeiros”.¹

Existem duas vias de infecção: a endêmica, em que existe a participação

direta do vetor e a não endêmica, em que não há a participação direta do vetor.²

A doença de Chagas possui duas fases patológicas: a aguda e a crônica. A fase aguda ocorre nos primeiros dois meses de infecção e é caracterizada por ter poucos sintomas ou ser assintomática, possuindo tratamento eficaz. A fase crônica ocorre após os dois primeiros meses da infecção e suas manifestações clínicas incluem sintomas mais graves como a inflamação dos diversos tecidos infectados. Não há, ainda, tratamento quimioterápico para a cura da doença na fase crônica.³

A doença de Chagas é endêmica nas

Américas do Sul e Central e no México. As taxas de infecção pelo parasita nestas áreas estão diminuindo, porém, a migração de pessoas, o turismo, o uso de drogas ilícitas e práticas médicas modernas contribuem para a disseminação desta parasitemia para regiões não endêmicas.^{4,5} Estimativas recentes sugerem que mais de 10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* em todo mundo, 25 milhões encontram-se em áreas de risco e que mais de 10 mil mortes

ocorram por ano. Nos EUA, 300 mil pessoas estão infectadas e os bancos de sangue são rotineiramente rastreados na busca pelo parasita (Figura 1, adaptado⁶). Com isso, a situação epidemiológica da doença torna-se mais grave e impactante, com o risco do aumento de portadores do *T. cruzi* no mundo. Sem nenhuma perspectiva imediata para vacinas, a quimioterapia é a única forma de combate ao parasita no paciente.

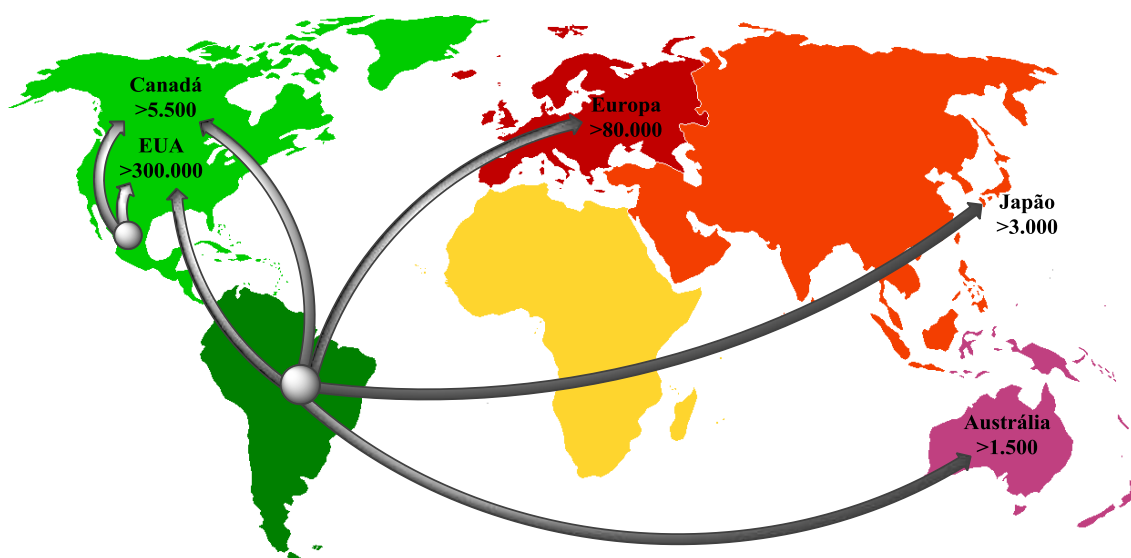


Figura 1. Mapa da distribuição de casos de doença de Chagas no mundo

Atualmente, apenas dois fármacos, introduzidos na década de 1960, são utilizados no tratamento da fase aguda da doença: o nifurtimox (Lampit[®], desenvolvido pela Bayer) (Figura 2) e o benzonidazol (Rochagan[®], Rodanil[®], desenvolvido pela Roche) (Figura 2). Eles têm, porém, diversos e importantes efeitos adversos⁷ como

anorexia, náusea, vômitos, cefaleia, depressão do sistema nervoso central ou sintomas psicóticos, dermatites e parestesia.⁸ Devido a cepas resistentes ao nifurtimox no Brasil, Chile e Uruguai, apenas o benzonidazol é usado no tratamento da doença nesses países.⁹

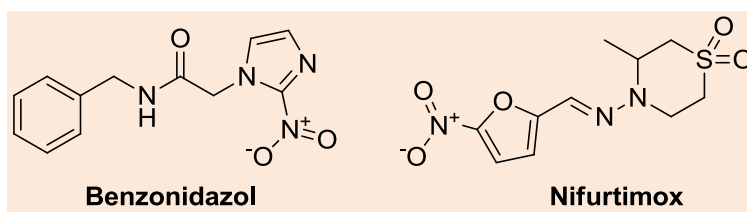


Figura 2. Fármacos usados atualmente no tratamento da fase aguda da doença de Chagas

Outro grande problema relacionado à quimioterapia atual da doença de Chagas é o custo elevado do tratamento. Ele é caro devido às grandes doses dos medicamentos administradas por longo período. Por isso, a quimioterapia para a doença de Chagas necessita o desenvolvimento de novos medicamentos ativos nas fases aguda e crônica, que apresentem baixo custo, bom perfil de segurança e que possam ser administrados, preferencialmente, por via oral. Entretanto, como o custo da introdução de um novo medicamento no mercado é estimado em mais de US\$ 500 milhões de dólares¹⁰ e como a doença de Chagas atinge pacientes com baixo poder aquisitivo, especialmente em países subdesenvolvidos, as indústrias farmacêuticas não se interessam pelo desenvolvimento de novas pesquisas para essa tripanossomose, o que a torna uma "doença negligenciada". Recentemente, para melhorar este quadro, vários medicamentos utilizados em outras doenças estão sendo testados contra *T. cruzi*. Essa abordagem, conhecida como "piggyback approach", tem como vantagens a maior rapidez e o menor custo de desenvolvimento, haja vista que são entidades químicas já aprovadas, cuja

segurança já foi estabelecida.¹¹ Azóis inibidores da biossíntese de ergosterol, desenvolvidos originalmente como antifúngicos, foram testados contra *T. cruzi* seguindo essa abordagem e apresentaram resultados promissores. É o caso do ravuconazol e do posaconazol, que estão em fase clínica contra esta patologia.

1.1. Biossíntese do ergosterol

Os esteróis são biomoléculas derivadas de isoprenos e estão presentes na membrana da maioria das células eucarióticas. Sua característica básica é apresentar um núcleo esteroide com quatro anéis de carbono fusionados, três deles com seis átomos de carbono (A, B e C) e um com cinco átomos de carbono (D) (Figura 3).¹² São importantes reguladores das propriedades físicas da membrana plasmática, como a fluidez e a permeabilidade, e possuem um importante papel no metabolismo aeróbico e na regulação do ciclo celular.¹³ Também são precursores da biossíntese de diversos hormônios e da vitamina D.

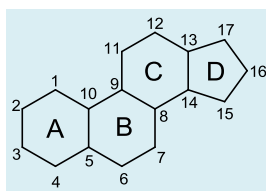


Figura 3. Estrutura do núcleo esteroide

Os produtos finais da via de biossíntese de esteróis podem variar. Mamíferos produzem colesterol e fungos e protozoários produzem 24-alkil-esteróis, como o ergosterol. O ergosterol (Figura 4) é um esteroide responsável por manter a estrutura e a função da membrana plasmática de forma muito semelhante ao papel desempenhado pelo colesterol (Figura 4) nas células animais.¹⁴ Estudos feitos durante as duas

últimas décadas mostraram que o *T. cruzi*, assim como a maioria dos fungos, depende do ergosterol para seu crescimento, desenvolvimento e proliferação em todas as fases do ciclo de vida. Logo, a biossíntese do ergosterol é um alvo potencial para a pesquisa e o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento da Doença de Chagas e de antifúngicos.^{15,16}

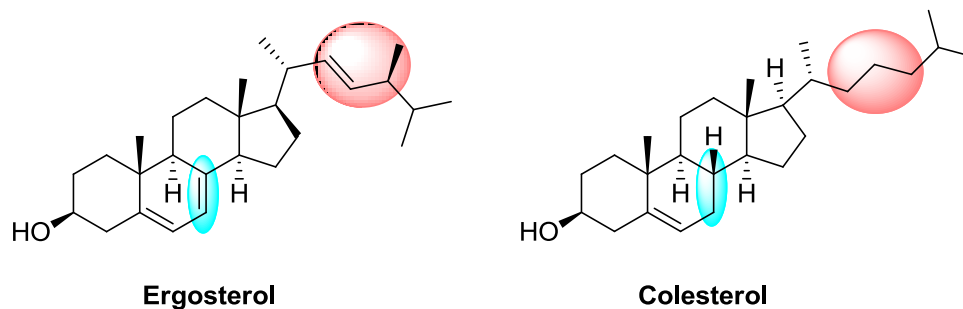


Figura 4. Diferenças nas estruturas químicas do ergosterol e colesterol

Compostos que atuam inibindo diferentes etapas da biossíntese do ergosterol foram estudados no tratamento experimental da doença de Chagas, como estatinas,¹⁷ bifosfonatos,¹⁸ inibidores da esqualeno sintase,¹⁹ alilaminas,²⁰ inibidores da oxidoesqualeno-ciclase,²¹ azóis²² e azasteróis.²³ A biossíntese do ergosterol a partir da acetilcoenzima A até o ergosterol, e alguns exemplos de inibidores de etapas desta via, são apresentados no Esquema 1 (Adaptado).²⁴

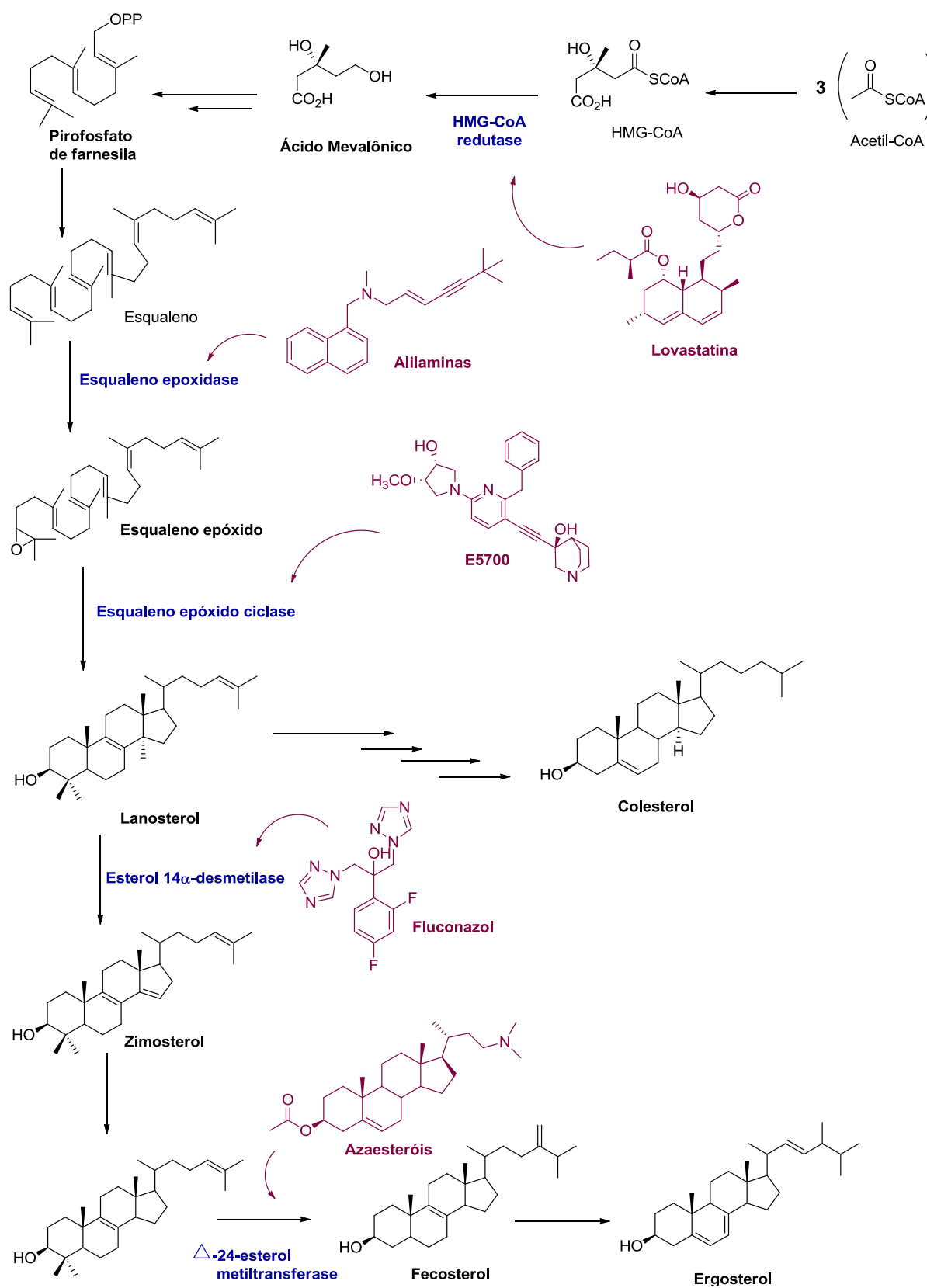
Os azóis inibidores da biossíntese dos esteróis (IBEs) são ativos por via oral, com amplo espectro de atividade antifúngica e baixa toxicidade. Eles agem na enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51), foram testados contra *T. Cruzi* e mostraram alta atividade, sendo alguns, inclusive, ativos na fase crônica da doença. A importância desses inibidores na ação anti-*T. cruzi* pode ser confirmada por esta classe ser a única que alcançou triagens clínicas avançadas como candidatos a fármacos.³

Diante disso, este trabalho tem como o

objetivo a discussão da química envolvida nos inibidores desta enzima, mostrando a relação entre sua estrutura e suas atividades, descrevendo, em detalhes, as metodologias de síntese e destacando os resultados biológicos em testes *in vivo* e *in vitro*. Desta forma, espera-se destacar o potencial desse alvo e estimular, assim, o desenvolvimento de novas pesquisas nessa área.

1.2. Azóis: inibidores da enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51)

Desde os anos 1970, os azóis são utilizados como fármacos antifúngicos de primeira linha. Docampo e colaboradores descreveram pela primeira vez, há 32 anos, a atividade inibitória de azóis sobre a enzima esterol 14 α -desmetilase, também denominada de CYP51 (Figura 5), em *T. cruzi*, demonstrando alterações na estrutura e no crescimento do parasito.²² Ao longo dos anos seguintes, vários estudos foram feitos com a mesma premissa.



Esquema 1. Via da biossíntese do ergosterol. Em azul estão às enzimas e em roxo os seus inibidores respectivos



Figura 5. Enzima estero1 14 α -desmetilase (CYP51) (Código PDB: 3K1O). Ao centro, é representado o grupamento heme

A enzima estero1 14 α -desmetilase, pertencente à superfamília do citocromo P450, está envolvida em uma etapa-chave na biossíntese do ergosterol, responsável pela desmetilação oxidativa de esteróis intermediários através do grupamento heme.²⁵ Os azóis interagem por coordenação de um dos nitrogênios do anel azol com o átomo de ferro do grupamento heme da enzima. Devido a essa interação, o sítio ativo da enzima não está mais disponível para a

ligação com o substrato natural, o que impede sua conversão catalítica.²⁶ Dependendo do tamanho e da natureza do substituinte ligado ao azol, o efeito de inibição pode variar devido às interações com a parte proteica da CYP51.²⁶ Os IBEs apresentados neste trabalho possuem uma similaridade estrutural e o esqueleto destacado em vermelho representa o sítio farmacofórico das moléculas (Figura 6).

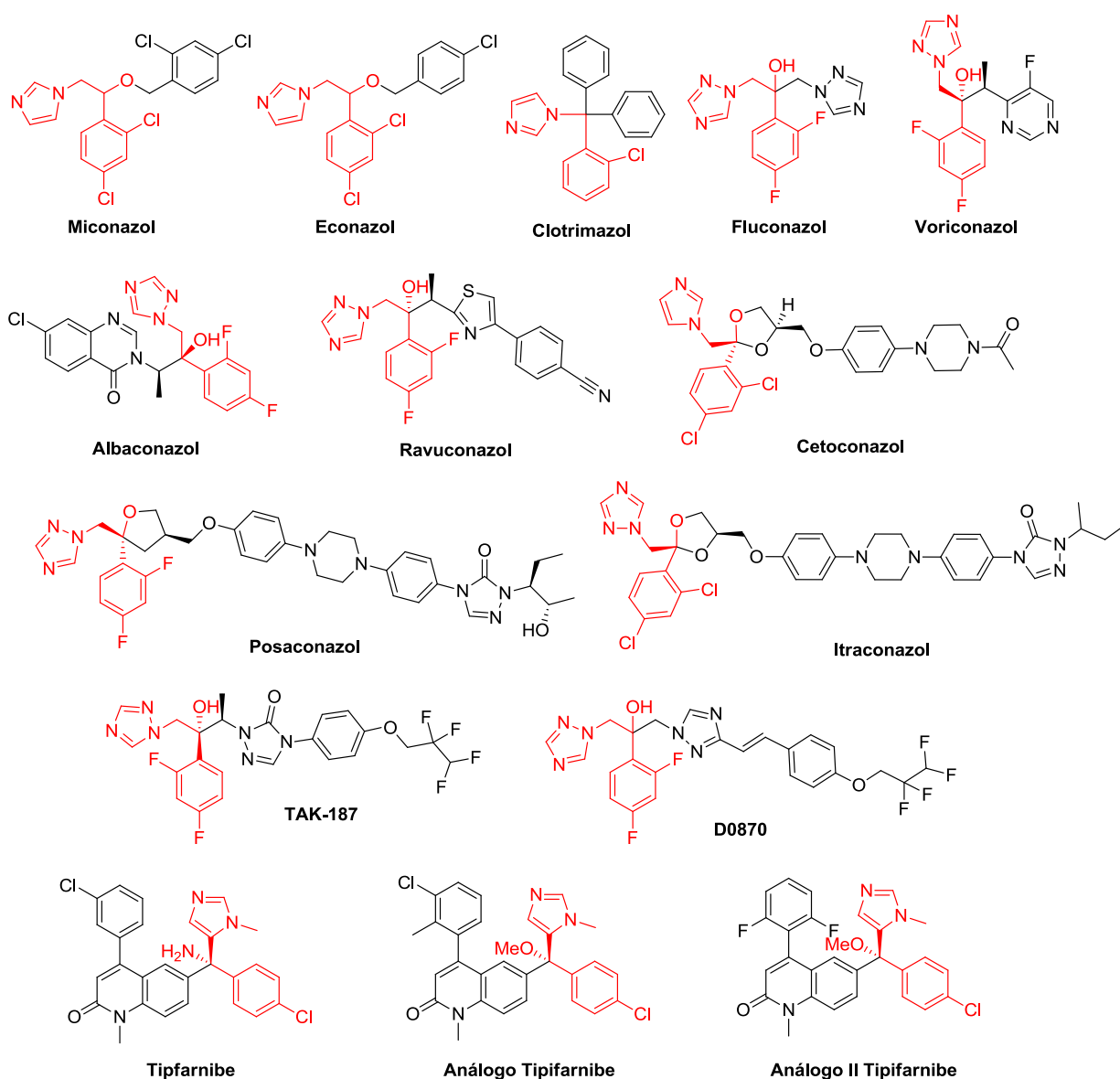


Figura 6. Azóis inibidores da biossíntese de ergosterol. Os compostos com centros estereogênicos não especificados foram desenvolvidos na forma racêmica

2. Inibidores da enzima CYP51: classe de imidazóis

Miconazol e Econazol

O miconazol (Figura 8) é um derivado do imidazol de primeira geração, usado como agente antifúngico, desenvolvido pela Janssen Pharmaceutica. Foi um dos primeiros

antifúngicos a ser descrito com atividade contra o *T. cruzi*. Docampo e colaboradores avaliaram se o miconazol seria capaz de inibir o crescimento de *T. cruzi in vitro*, sendo também capaz de aumentar a concentração de peróxido de hidrogênio em epimastigotas de *T. cruzi*, como acontece em leveduras. O miconazol conseguiu inibir totalmente o crescimento de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) em concentrações de cerca de 20 μM . Entretanto, os resultados foram bem diferentes do esperado; ao contrário dos

efeitos sobre as leveduras, o miconazol não aumentou a concentração de peróxido de hidrogênio, mas diminuiu a concentração de 5,7-dieno-esteróis em epimastigotas, inclusive de ergosterol.²² Assim como o miconazol, o econazol, cuja estrutura se difere do primeiro pela inclusão de um átomo de cloro em um dos anéis aromáticos (Figura 7), também foi capaz de inibir o crescimento

do *T. cruzi* através da atuação na síntese do ergosterol.²¹ Entretanto, a biodisponibilidade oral tanto do miconazol quanto do econazol é baixa. Por isso, em infecções fúngicas, estas substâncias são utilizadas topicamente (dermatofitoses) ou por via intravenosa, o que limita sua aplicação contra o *T. cruzi*. Tanto o miconazol quanto o econazol foram desenvolvidos na forma racêmica.

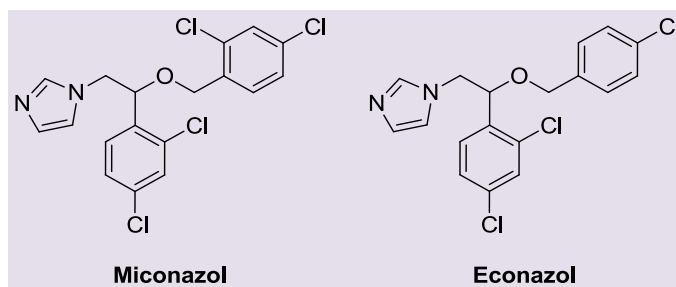


Figura 7. Estruturas químicas do miconazol e econazol

Em relação à estrutura química e a atividade biológica dessas substâncias, pode-se identificar a importância do anel imidazol, o grupo diclorofenila e o grupo éter como farmacofóricos de agentes inibidores da CYP51 (Figura 8). Assim, conseguiu-se mapear o sítio de ligação da enzima CYP51

com os seus respectivos inibidores: o átomo de nitrogênio do anel imidazol complexa com o Fe do grupo heme da enzima, as fenilas interagem na cavidade hidrofóbica e o oxigênio atua como aceptor de ligação de hidrogênio (Figura 8).²⁷

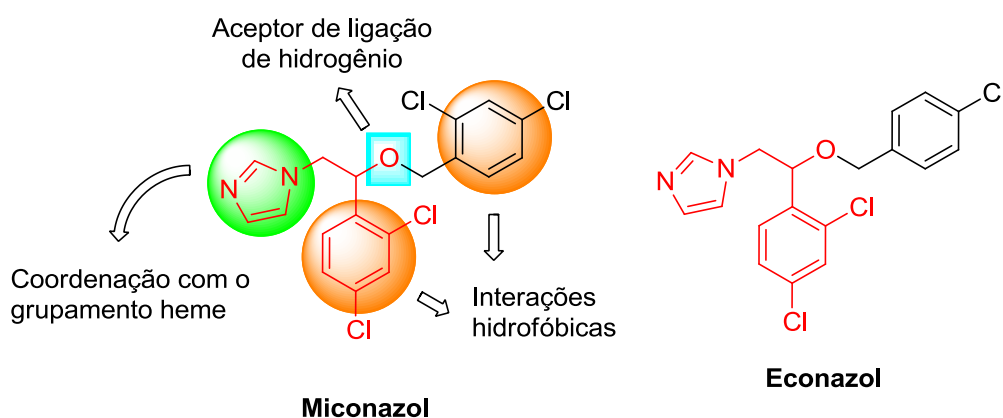


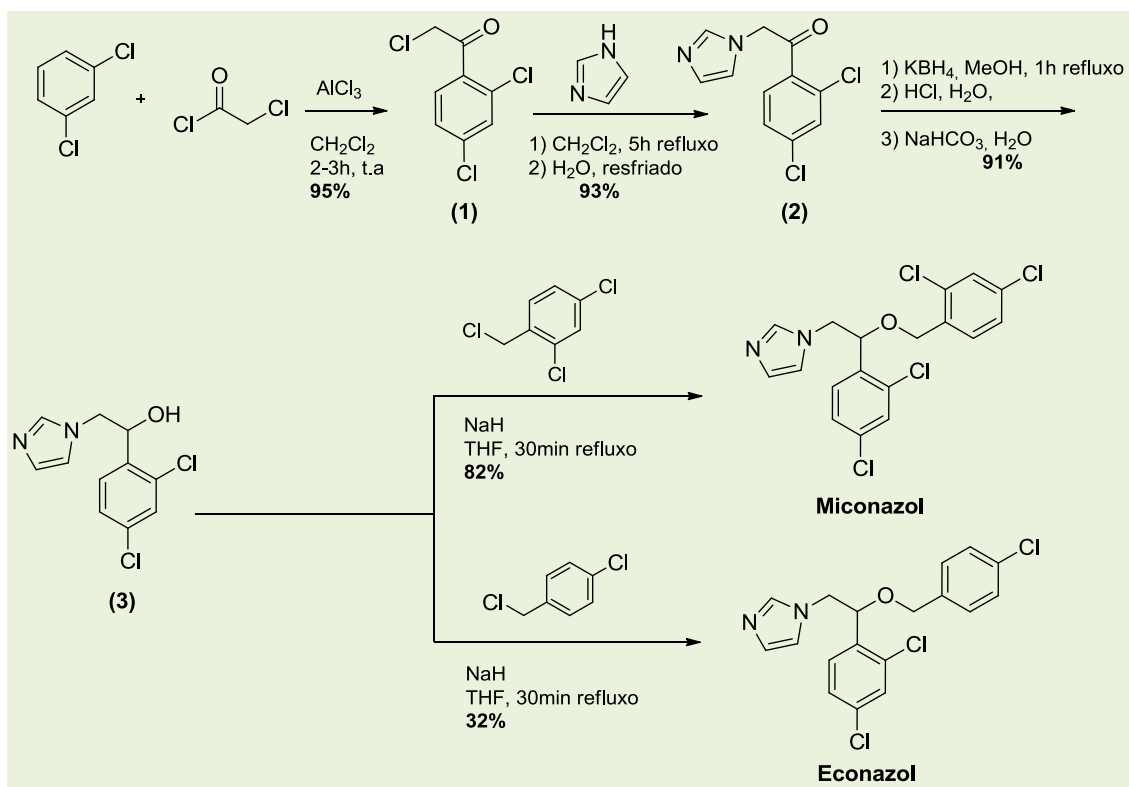
Figura 8. Sítios de interação do miconazol e econazol

As rotas de síntese para a obtenção do miconazol e do econazol diferem apenas na etapa final. A primeira etapa consiste na acilação de Friedel-Crafts do 1,3-diclorobenzeno, com alfa-cloro cloreto de

acetila em diclorometano. A alfa-cloro acetofenona **1** sofre uma substituição nucleofílica do cloro do grupo acetila pelo 1,3-imidazol, dando origem a **2** que, em seguida, é reduzido por hidreto de boro e

potássio. A desprotonação do álcool **3** com hidreto de sódio em THF, em aquecimento sob refluxo, produz o alcóxido correspondente que, no caso do miconazol, reage com 2,4-dicloro-cloreto de benzila e,

no do econazol, com *p*-cloro-cloreto de benzila. O rendimento global do miconazol e do econazol é de 66% e 26%, respectivamente (Esquema 2).²⁸⁻³⁰



Esquema 2. Síntese do miconazol e do econazol

Cetoconazol

O cetoconazol (Figura 9) foi avaliado contra *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* e mostrou uma boa interação com a enzima CYP51. Ele foi ativo *in vitro* no modelo de fase aguda da infecção, porém Brener *et al.* (1993)

mostraram que em seis dos oito pacientes tratados durante 60 dias com o cetoconazol a parasitemia não foi erradicada. Seu perfil de eficácia foi, portanto, comparável aos quimioterápicos atualmente em uso para o tratamento da doença de Chagas na fase crônica.³¹

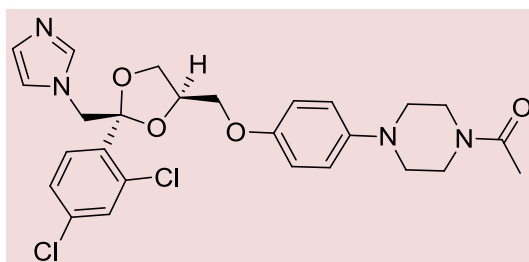


Figura 9. Estrutura química do cetoconazol

A melhor biodisponibilidade do cetoconazol, comparada com a dos outros derivados de imidazol, miconazol e econazol, deveu-se à inclusão do grupo fenilpiperazinetanona como uma segunda

parte hidrofóbica (S4), como mostra a Figura 10.³² Ele foi o primeiro antifúngico utilizado por via oral, porém tem tempo de meia-vida curto devido à degradação metabólica do anel imidazol.

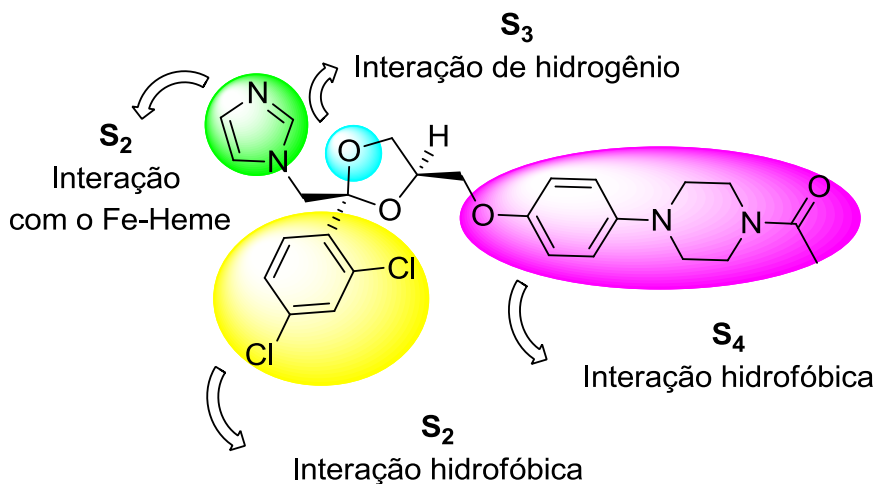
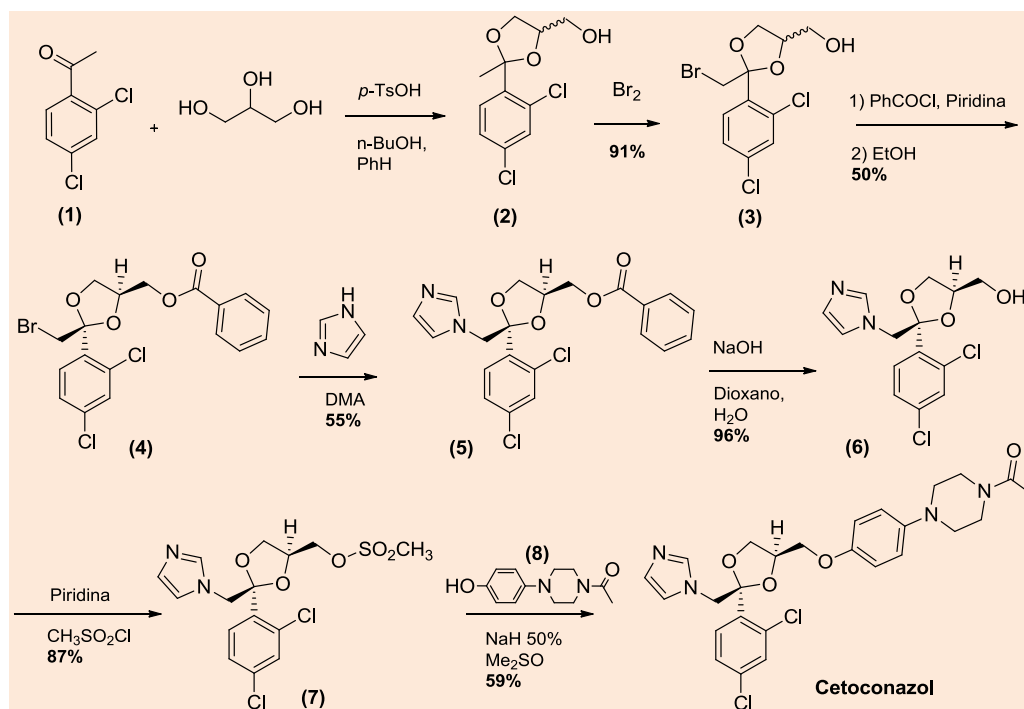


Figura 10. Sítios (S) de interação do cetoconazol

A síntese não assimétrica do cetoconazol inicia-se com a cetalização do 2,4-dicloracetofenona (**1**) com glicerina em benzeno e butanol, na presença de quantidades catalíticas de ácido *p*-toluenossulfônico. O cetal **2**, sem ser isolado, sofre bromação, fornecendo o intermediário **3** que é benzilado dando origem a uma mistura de ésteres *cis/trans*. A forma *cis* de **4** é isolada por cristalização em etanol. O acoplamento do bromo cetal **4** com o 1,3-

imidazol em dimetilacetamida anidra para fornece o derivado de imidazol **5**. A saponificação de **5** com NaOH, em aquecimento sob refluxo, em dioxano/água produz **6**. O álcool **6** é convertido por piridina e cloreto de mesila no metanossulfonato correspondente **7**. A última etapa é o acoplamento do fenóxido de sódio de **8**, em dimetilsulfóxido, fornecendo o cetoconazol com um rendimento global de 12% (Esquema 3).³³



Esquema 3. Síntese do cetoconazol

3. Inibidores da enzima CYP51: classe da primeira geração de triazóis

Fluconazol

A descoberta dos triazóis inibidores da enzima CYP51 de primeira geração foi resultado de um programa de pesquisa dirigido ao desenvolvimento de um agente antifúngico com melhores propriedades farmacocinéticas. A modificação molecular planejada pela substituição do núcleo imidazol por triazol produziu substâncias metabolicamente mais estáveis devido à resistência deste heteroaromático à oxidação. Outro fato importante foi o ganho na propriedade farmacodinâmica. O núcleo triazol, complexa-se mais efetivamente com o Fe heme da enzima, tornando-se mais

específico para a inibição da enzima CYP51 e, conseqüentemente, mais seletivo, exercendo assim menor influência no metabolismo dos esteroides humanos, como, por exemplo, do colesterol.

O fluconazol (Figura 11) é o representante mais importante da primeira geração de triazóis, porque é um fármaco com bom perfil de segurança, boa biodisponibilidade, eficácia, seletividade e hidrossolubilidade. Desenvolvido pela Pfizer, tem alta atividade antifúngica em animais, incluindo humanos, e é muito utilizado como protótipo na busca de novos inibidores ainda mais ativos. Contra *T. cruzi*, o fluconazol mostrou apenas atividade *in vitro*, não sendo ativo em modelos animais.³⁴ A inclusão de dois anéis triazóis idênticos foi feita para gerar um plano de simetria na estrutura que elimina o centro estereogênico e torna a síntese menos custosa.

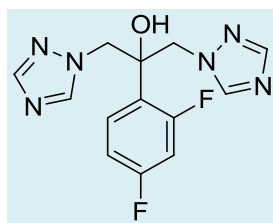


Figura 11. Estrutura química do fluconazol

A atividade farmacocinética e farmacodinâmica superior do fluconazol com relação aos antifúngicos com anel imidazol pode ser atribuída a três importantes modificações em sua estrutura química: a substituição do anel imidazol por triazol, a

substituição no anel aromático de dois átomos de cloro por dois átomos de flúor e a substituição do grupo éter por álcool entre os anéis triazóis e fenila, minimizando um possível impedimento estérico (Figura 12).²⁷

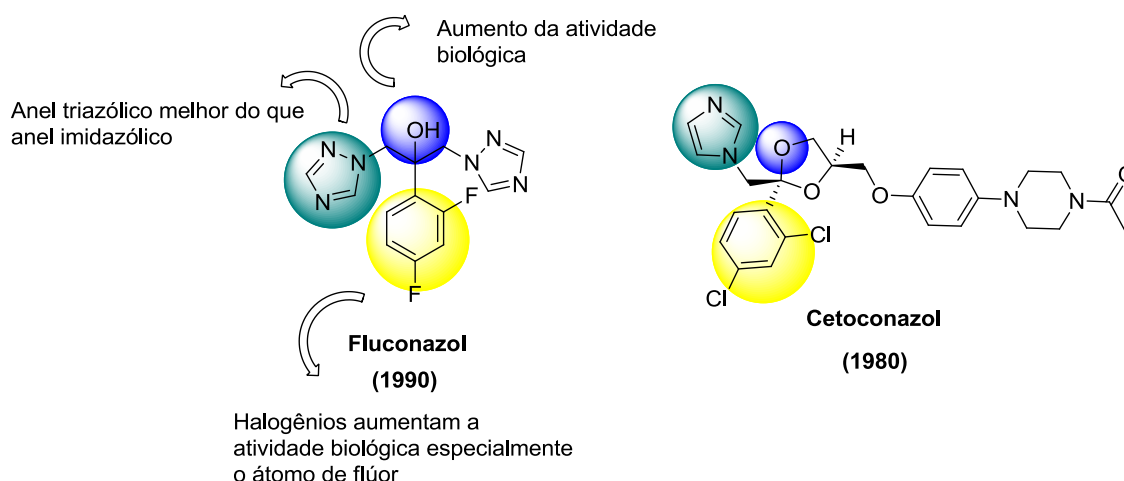
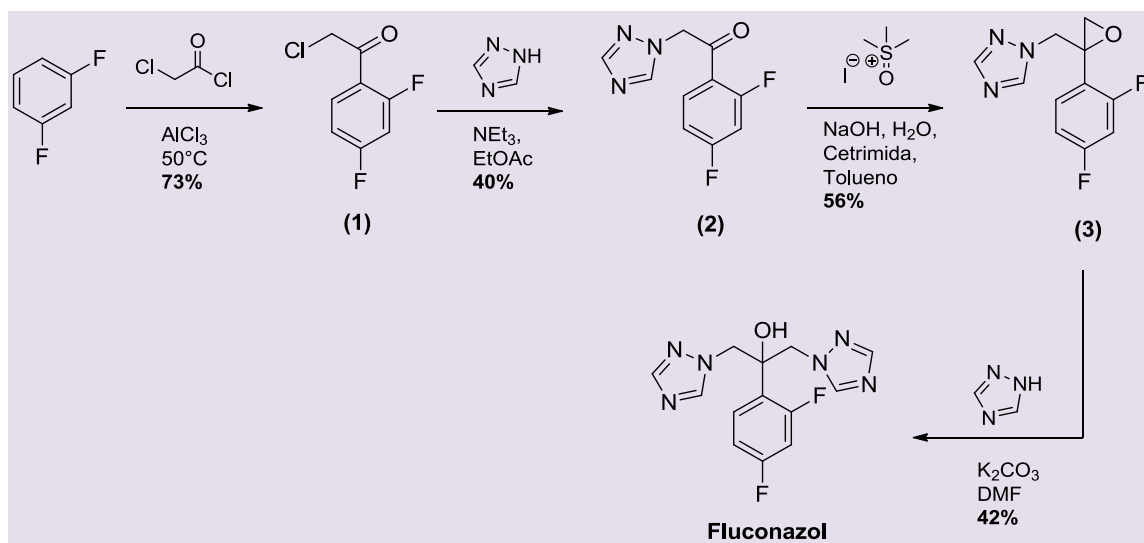


Figura 12. Relação estrutura-atividade do fluconazol

A primeira etapa da síntese do fluconazol consiste na acilação de Friedel-Crafts do 1,3-difluorobenzeno, com cloreto de alfa-cloroacetila, seguido da substituição nucleofílica do cloro do grupo aceto por 1H-1,2,4-triazol, dando origem ao intermediário **2**. A epoxidação de Corey de **2** com iodeto de trimetilsulfoxônio, em presença do catalisador de transferência de fase cetrimida (brometo de cetiltrimetilamônio), produz o

intermediário **3**, que é isolado na forma de mesilato. A etapa final é a abertura do epóxido **3** pelo 1H-1,2,4-triazol, em meio básico, com carbonato de potássio em dimetilformamida. A mistura de isômeros de posição obtida foi purificada por recristalização em 2-propanol, com rendimento total em fluconazol de 7% (Esquema 4).²⁵



Esquema 4. Síntese do fluconazol

Itraconazol

O itraconazol (Figura 13) é utilizado como agente antifúngico para infecções superficiais e em algumas infecções sistêmicas, tendo demonstrado atividade *in vitro* e *in vivo* na

fase aguda da doença de Chagas.³⁵ Em humanos foram descritos dois estudos com pacientes na fase crônica da doença de Chagas e em ambos os estudos não foi comprovado que o itraconazol conseguiu promover a cura parasitológica.³⁶

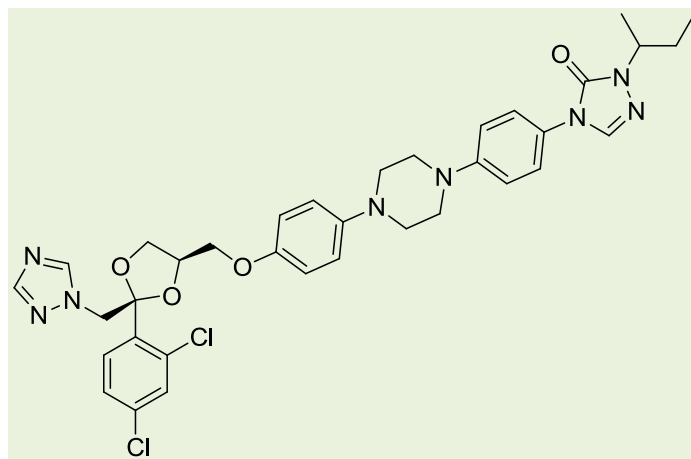


Figura 13. Estrutura química do itraconazol

O itraconazol foi desenvolvido tendo como protótipo o cetoconazol (Figura 14). Como o fluconazol, o itraconazol possui melhor atividade, seletividade e biodisponibilidade devido à substituição do núcleo imidazol por triazol. Com a introdução

do grupo *sec*-butilfeniltriazolona na molécula, obteve-se melhor interação hidrofóbica e aumento da lipofilicidade. Porém, ao ser comparado com o fluconazol, apresentou baixa biodisponibilidade e baixa absorção oral, por causa da sua elevada lipofilicidade,

apesar de ter um espectro de ação maior e ser mais bem tolerado.³⁷

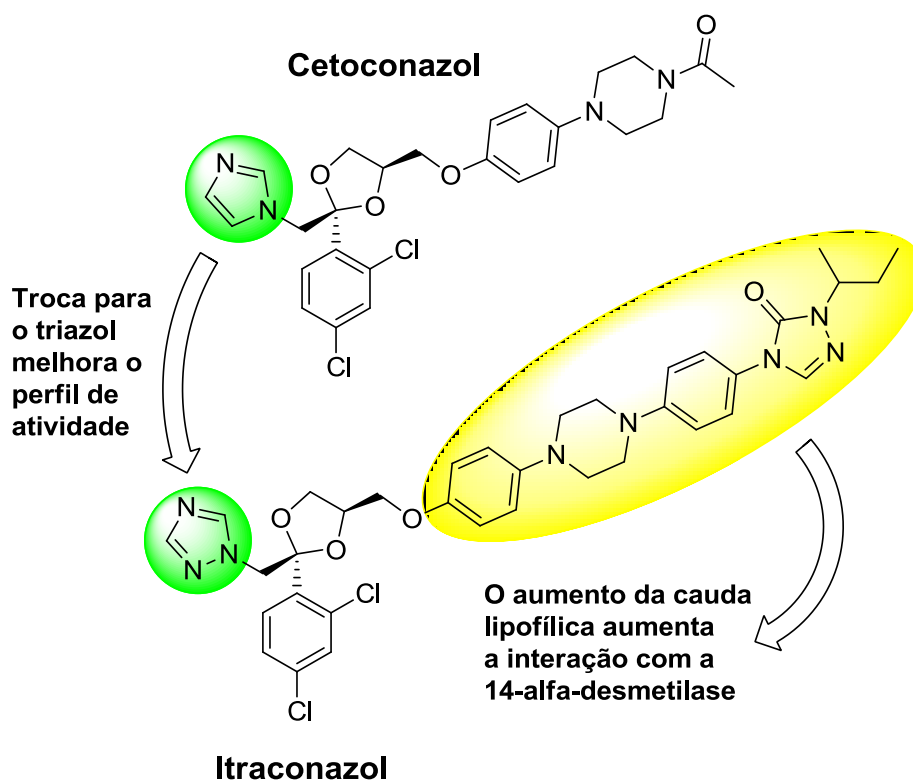
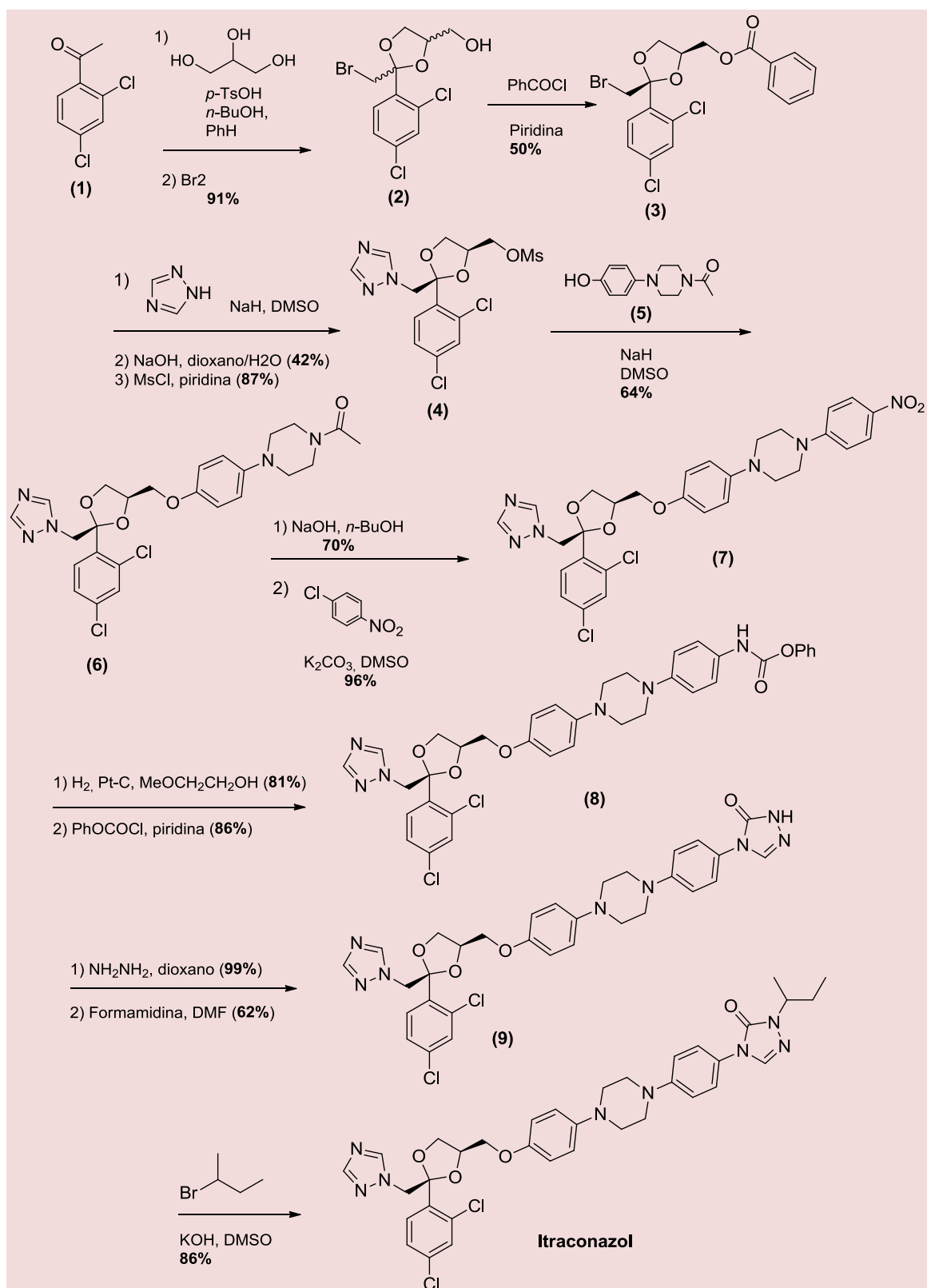


Figura 14. Relação estrutura atividade do itraconazol

A síntese do itraconazol é iniciada pela cetalização da 2,4-dicloracetofenona (**1**) por glicerina em aquecimento sob refluxo com benzeno e quantidades catalíticas de ácido *p*-toluenossulfônico. Em seguida, sem ser isolado, o produto é bromado, fornecendo o intermediário **2**. Este é protegido com benzoato por tratamento com cloreto de benzoila em piridina, gerando o intermediário **3**, que é tratado com o sal do 1*H*-1,2,4-triazol (gerado *in situ* pelo hidreto de sódio com o 1*H*-1,2,4-triazol), dando uma mistura de derivados de triazol regioisoméricos, que são hidrolizados e mesilados e em seguida separados por cromatografia em coluna, sendo isolado o intermediário **4**. Uma segunda substituição nucleofílica com o sal de sódio do 1*H*-1,2,4-triazol fornece o intermediário **6**. A síntese

do itraconazol parte do cetoconazol. A hidrólise da função amida de **6** seguida pela reação nucleofílica em aromáticos com 4-cloronitrobenzeno produz **7**, que sofre hidrogenação catalítica na presença de platina-carbono. A anilina **8** obtida é carbamoilada com clorofornato de fenila em uma mistura de piridina e clorofórmio, com 86% de rendimento. A reação de **8** com hidrazina em dioxano fornece a semicarbazida que ao condensar com formamida, em dimetilformamida em 130 °C, leva à triazolona **9**, com 62% de rendimento. A etapa final consiste na alquilação de **9** com 2-bromobutano, usando hidróxido de potássio em dimetilssulfóxido. O rendimento global da obtenção do itraconazol foi 2,7% (Esquema 5).²⁵



Esquema 5. Síntese do itraconazol

4. Inibidores da CYP51: classe da segunda geração de triazóis

Voriconazol

A segunda geração de triazóis foi desenvolvida mantendo-se o mesmo esqueleto do fluconazol, o principal representante da 1ª geração. As alterações realizadas no esqueleto até a estrutura do voriconazol (Figura 15) foram mudanças no sítio S1 e a inclusão de um grupo metila no metileno ligado a esse sítio (Figura 16). O

voriconazol foi o primeiro fármaco antifúngico preparado e utilizado para tratamento de infecções fúngicas invasivas. As modificações realizadas proporcionaram maior tempo de meia vida e maior biodisponibilidade da substância, bloqueando com maior eficiência a síntese do ergosterol, porém o composto apresentou pior perfil toxicológico. Testes *in vivo* demonstraram que esta substância apresentou baixa atividade contra o *T. cruzi*, provavelmente devido a fatores farmacocinéticos e, por isso, os ensaios clínicos foram descontinuados.³⁴

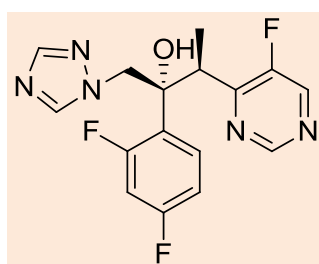


Figura 15. Estrutura química do voriconazol

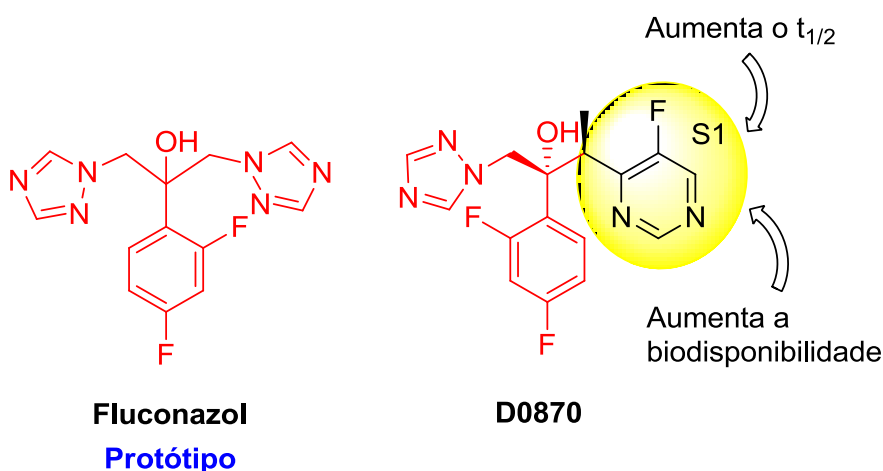
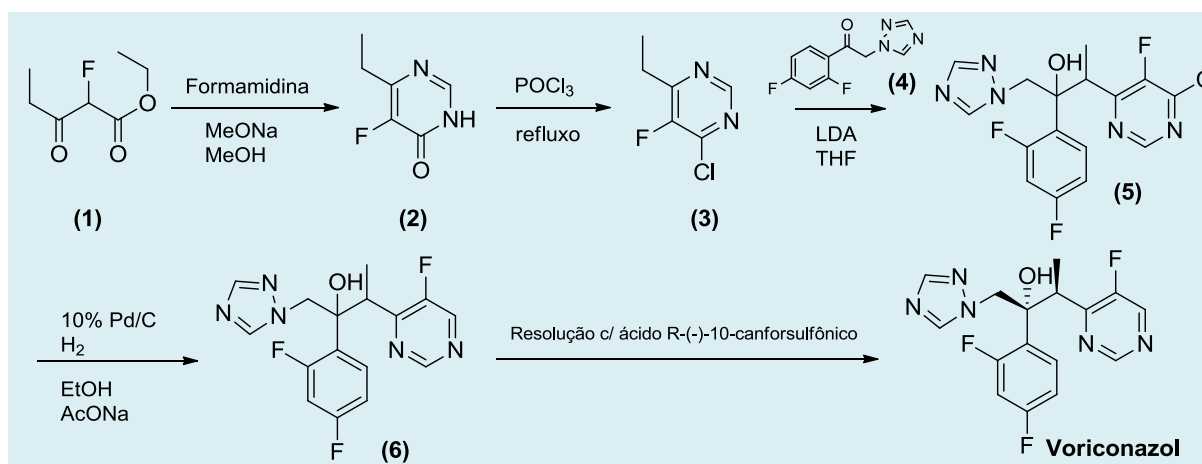


Figura 16. Estudo da relação estrutura atividade do voriconazol

O voriconazol pode ser sintetizado em cinco etapas. Na primeira, o produto de partida **1** é tratado com sal de formamidina (acetato de formamidina) em meio fortemente básico para ciclar e formar **2**. Este é clorado com cloreto de fosforila, produzindo o intermediário **3**. A seguir,

ocorre à condensação de **3** com **4**, em catálise com LDA, para formar **5**, que é hidrogenado cataliticamente. A etapa final é a resolução de **6**, usando ácido R-(-)-10-canforssulfônico (Esquema 6).³⁸



Esquema 6. Síntese do voriconazol

Posaconazol

O posaconazol (Figura 17) foi desenvolvido pela Schering-Plough Research Institute (SPRI). Devido ao seu amplo espectro de atividade e perfil de segurança, em 2006 foi aprovado clinicamente para tratamento de infecções fúngicas invasivas.³⁹⁻

⁴¹ É o único derivado azólico clinicamente aprovado que conseguiu promover a cura substancial na fase crônica do modelo murino da doença de Chagas, tendo também uma potente atividade em cepas de *T. cruzi* resistentes ao benzonidazol e nifurtimox.⁴² É, até o momento, sem dúvida, um dos inibidores da biossíntese do ergosterol mais potentes contra o *T. cruzi*.

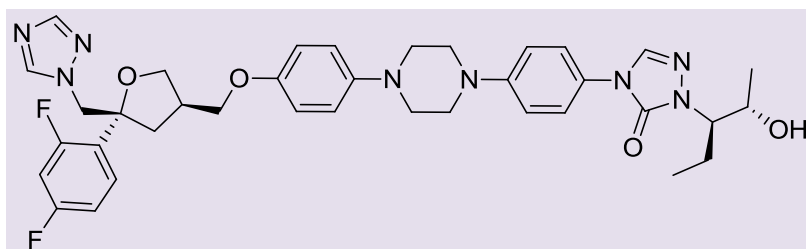


Figura 17. Estrutura química do posaconazol

O posaconazol foi o único da 2ª geração de triazóis que utilizou como protótipo o itraconazol. As modificações realizadas produziram uma substância eficaz com amplo espectro de ação e com boa tolerância, mesmo quando empregado por longa duração (Figura 18). Essas modificações

consistiram na substituição de dois átomos de cloro por flúor, como no fluconazol, a substituição do anel dioxolano por furano e a introdução de uma hidroxila na região final da cadeia de hidrocarboneto. Estas alterações levaram a um número maior de interações hidrofóbicas no sítio S₄.⁴³

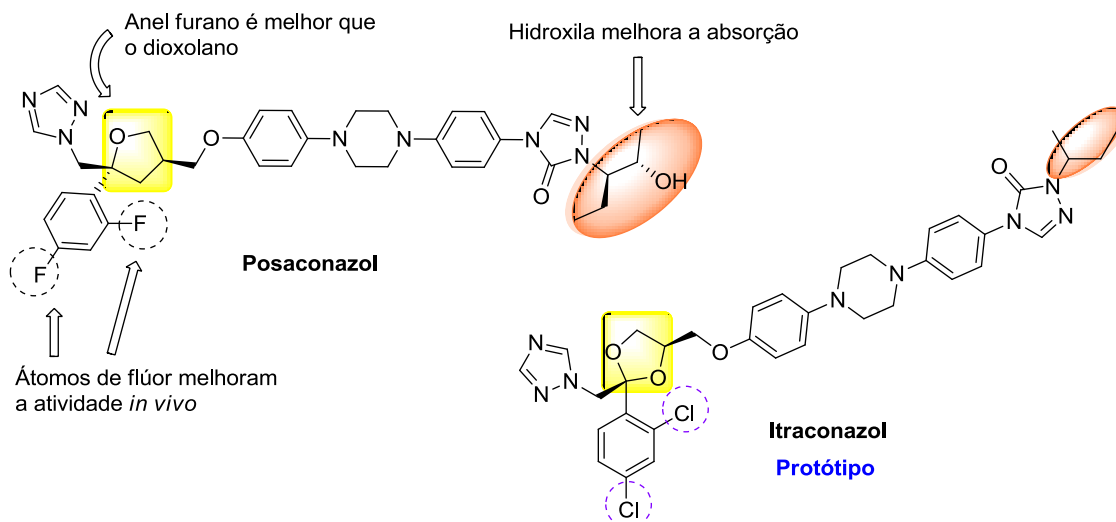
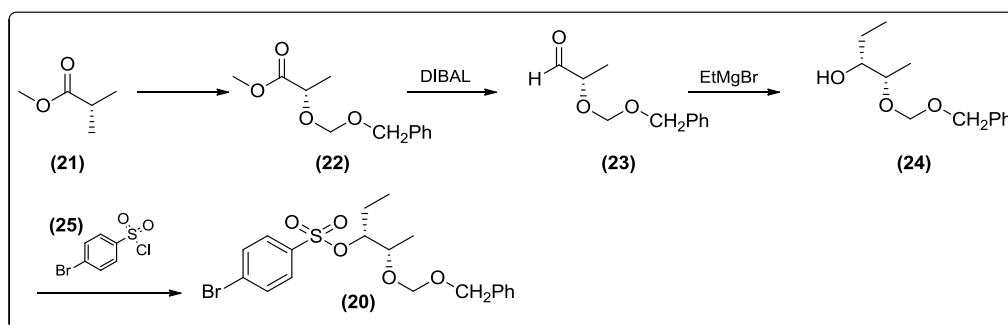


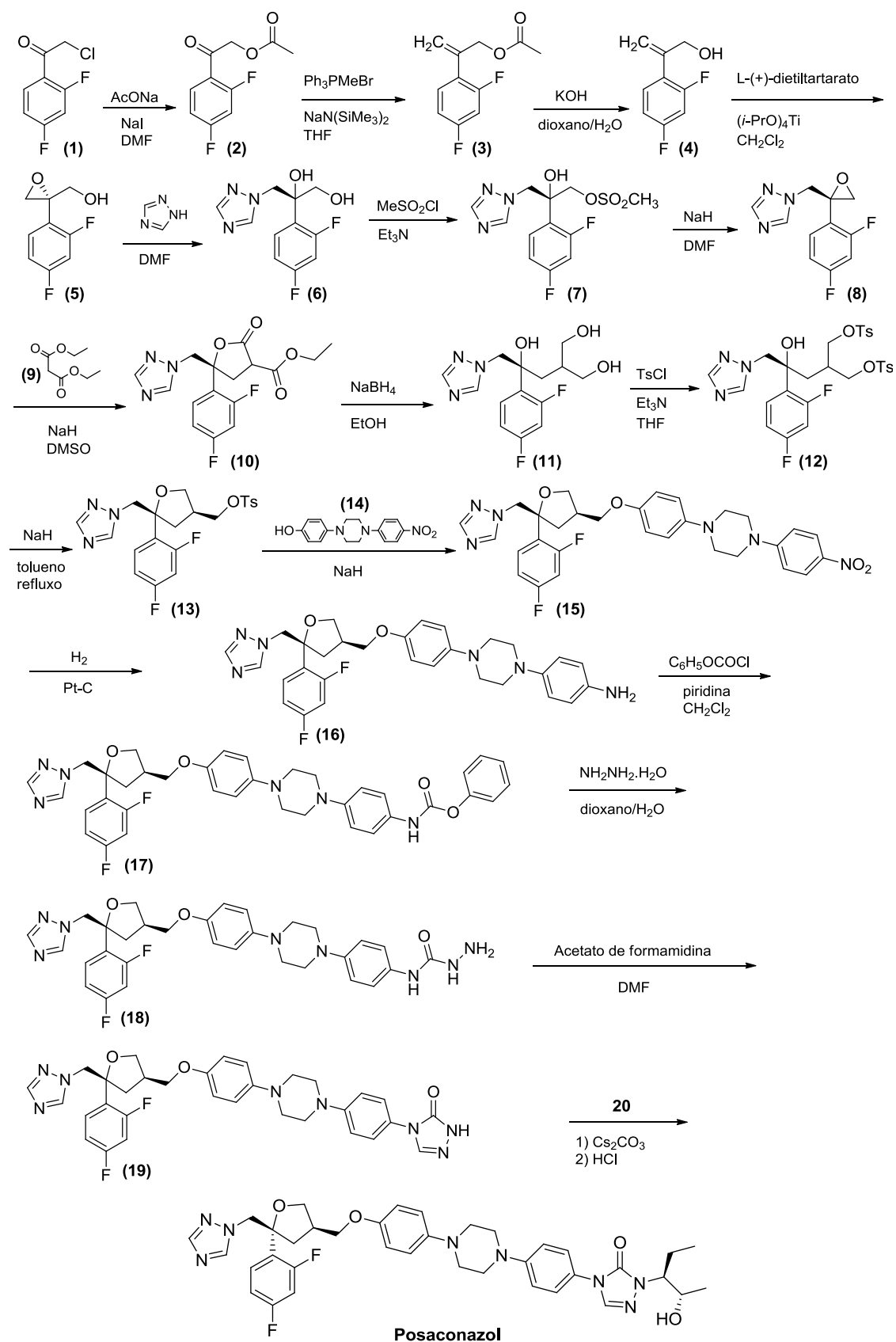
Figura 18. Estudo da relação estrutura atividade do posaconazol

A síntese do posaconazol é complexa e de custo elevado. A primeira etapa é a reação de **1** com acetato de sódio e iodeto de sódio em dimetilformamida. O intermediário **2** obtido sofre metilenação com brometo de metiltrifenilfosfônio e bis-trimetilamina de sódio em tetra-hidrofurano, fornecendo o éster **3**. A hidrólise de **3** com hidróxido de potássio em dioxano/água fornece o álcool **4**, que é epoxidado regioselectivamente com tetraisopropóxido de titânio e L-(+)-tartarato de etila em diclorometano. A reação de **5** com triazol, em dimetilformamida, leva a **6**, que é mesilado seletivamente com cloreto de metanossulfonila, na presença de trietilamina. A ciclização de **7** com hidreto de sódio, em dimetilformamida, leva ao epóxido **8**, que condensa com malonato de etila **9**, na presença de hidreto de sódio em dimetilsulfóxido, fornecendo o intermediário **10**. A redução de **10** com hidreto de sódio e cloreto de lítio em etanol

fornece o intermediário **11**, que sofre tosilização seletiva com cloreto de tosil, utilizando trietilamina como base e tetra-hidrofurano como solvente. A ciclização do *bis*-tosilato **12** com hidreto de sódio, por aquecimento em refluxo em tolueno fornece o intermediário **13**. A próxima etapa é a reação de **13** com **14** (Esquema 7). O intermediário **15** sofre hidrogenação catalítica em presença de platina sobre carvão, dando origem à amina **16**. O tratamento de **16** com clorofornato de fenila, em presença de piridina, produz o uretano **17**, que reage com hidrazina hidratada para formar a semicarbazida **18**. A ciclização de **18** ocorre em presença de acetato de formamida, fornecendo a triazolona **19**. O intermediário **19** condensa com **20** na presença de carbonato de cério em dimetilformamida e o produto é desprotegido com ácido clorídrico 6N para dar o posaconazol (Esquema 8).⁴⁴



Esquema 7. Síntese do intermediário **20** da rota do posaconazol



Esquema 8. Síntese do posaconazol

Ravuconazol

O ravuconazol (Figura 19), desenvolvido como um antimicótico sistêmico, é um promissor agente antichagásico. Ele tem alta atividade *in vitro* contra o *T. cruzi* na fase aguda, mas é apenas supressivo em modelos murino e canino, devido a suas características

farmacocinéticas.⁴⁵ O DNDi (*Drugs for Neglected Diseases initiative*) em parceria com a Eisai Co., iniciou os testes clínicos de fase II com o ravuconazol, na Bolívia, em junho de 2011, baseando-se no fato do tempo de meia-vida ser longo em humanos, combinado ao grande volume de distribuição, e pode levar à cura da doença de Chagas em humanos.⁴⁶

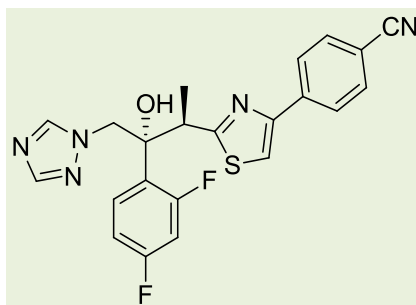


Figura 19. Estrutura química do ravuconazol

De estrutura semelhante ao seu protótipo fluconazol, no ravuconazol substituiu-se o anel triazol pelo grupo 4-tiazolilbenzonitrila (Figura 20). A adição de um grupo metila

adjacente à hidroxila foi feita com objetivo de aumentar o tempo de meia-vida, já que isso foi alcançado com êxito na estrutura do voriconazol.^{47,48}

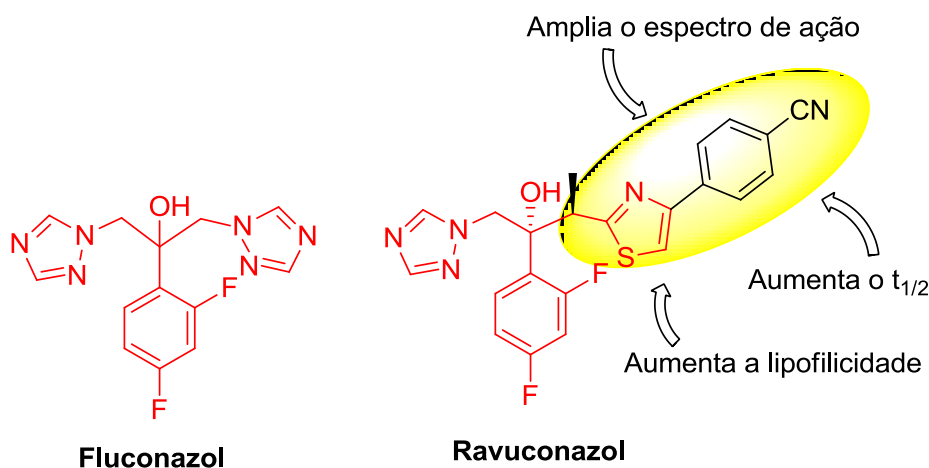


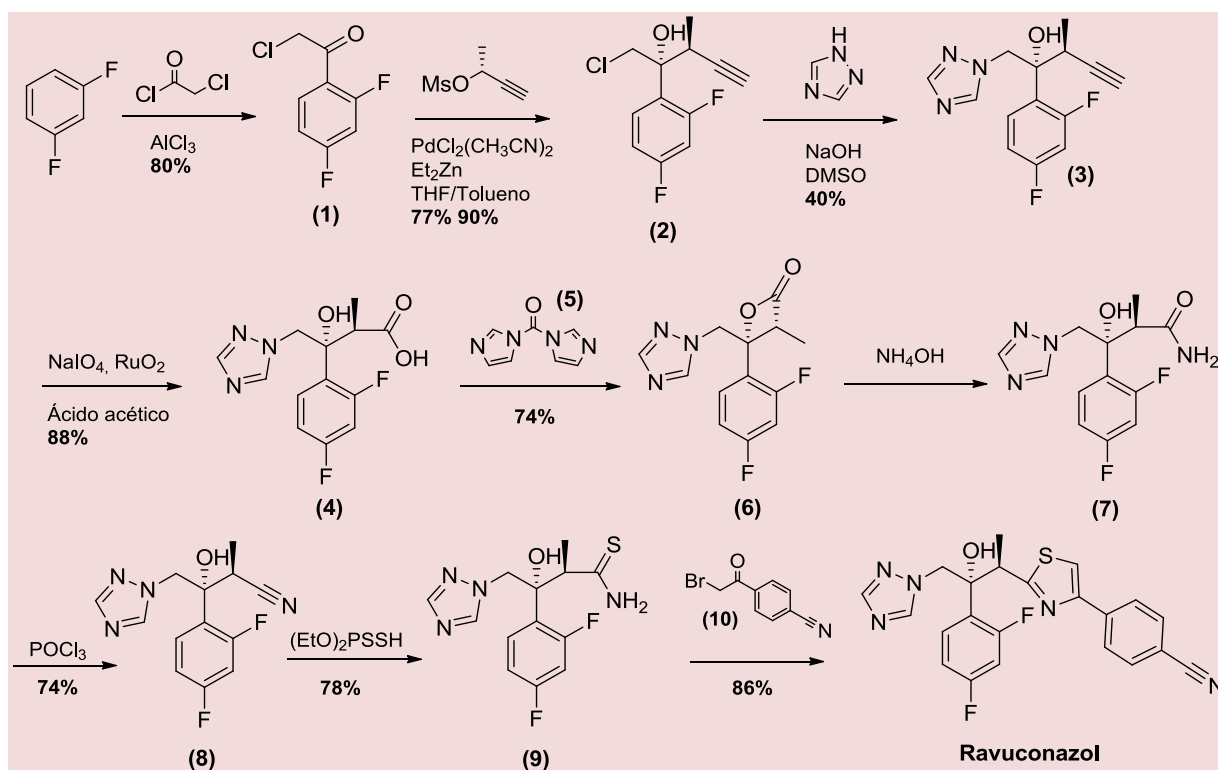
Figura 20. Estudo da relação estrutura atividade do ravuconazol

A primeira etapa da síntese do ravuconazol é a acilação de Friedel-Crafts do 1,3-difluorobenzeno com cloreto de cloracetila, dando origem ao intermediário **1**. Este reage com um aleno obtido pelo tratamento do 1-metil-propa-2-enil éster

metanossulfônico, com dietilzinco na presença de quantidade catalítica de paládio, fornecendo o intermediário **2**. O intermediário **2** sofre substituição nucleofílica do cloro pelo 1*H*-1,2,4-triazol, fornecendo o intermediário **3**, que sofre clivagem oxidativa

na ligação tripla por periodato de sódio em presença do catalisador dióxido de rutênio. O ácido **4** é ativado com carbonildi-imidazol (**5**) dando a α -lactona **6**, seguido pela adição de amônia fornecendo **7**. Este sofre desidratação ao ciano derivado **8**. A tioamida

9 obtida é submetida a uma reação de Hantzsch com bromacetofenona (**10**), fornecendo o ravuconazol com 86% de rendimento nesta etapa, O rendimento global é 7,2% (Esquema 9).⁴⁹



Esquema 9. Síntese do ravuconazol

Albaconazol (UR-9825)

O albaconazol (Figura 21), desenvolvido pela Palau Pharma e anteriormente chamado de UR-9825, tem boa atividade *in vitro* em comparação com outros antimicóticos, além de possuir largo espectro de ação, e já está em testes clínicos de fase II. Ele tem boa biodisponibilidade por via oral, com tempo

de meia-vida longo de 30-70 h. Tem concentração sérica de 15% no LCR, o que é um dado importante para o tratamento de micoses que afetam o Sistema Nervoso Central. É extremamente ativo *in vitro* contra *T. cruzi*, tanto nas formas amastigotas quanto nas epimastigotas, sendo mais eficaz do que o cetoconazol.⁶⁰ Um dado importante foi conseguir suprimir a parasitemia em cães infectados com *T. cruzi*.⁵⁰

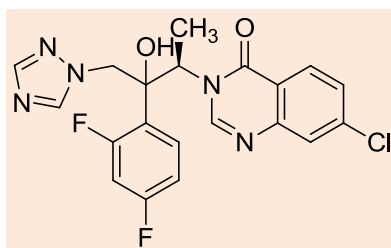
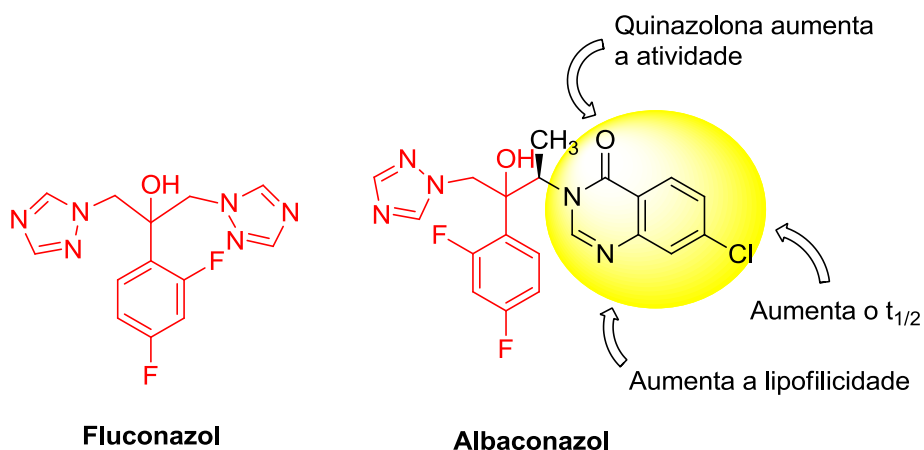


Figura 21. Estrutura química do albaconazol

A estrutura do albaconazol é semelhante à do ravuconazol, diferindo pela substituição do grupamento tiazolilbenzonitrila por uma cloroquinazolona (Figura 22). Esta modificação foi eleita porque grupos que fazem interações hidrofóbicas e têm um átomo de nitrogênio aumentam ainda mais as ligações nesta região. Essas modificações têm o intuito de alcançar interações mais fortes, já que o caminho de entrada do

substrato na enzima pode variar de acordo com o número de ligações no local. Além disso, a introdução deste novo heterociclo no albaconazol produziu uma substância com boa biodisponibilidade por via oral e longo tempo de meia-vida. Já foram realizados diferentes ensaios clínicos e até o momento o ravuconazol mostrou ser um composto seguro e bem tolerado.⁵⁰



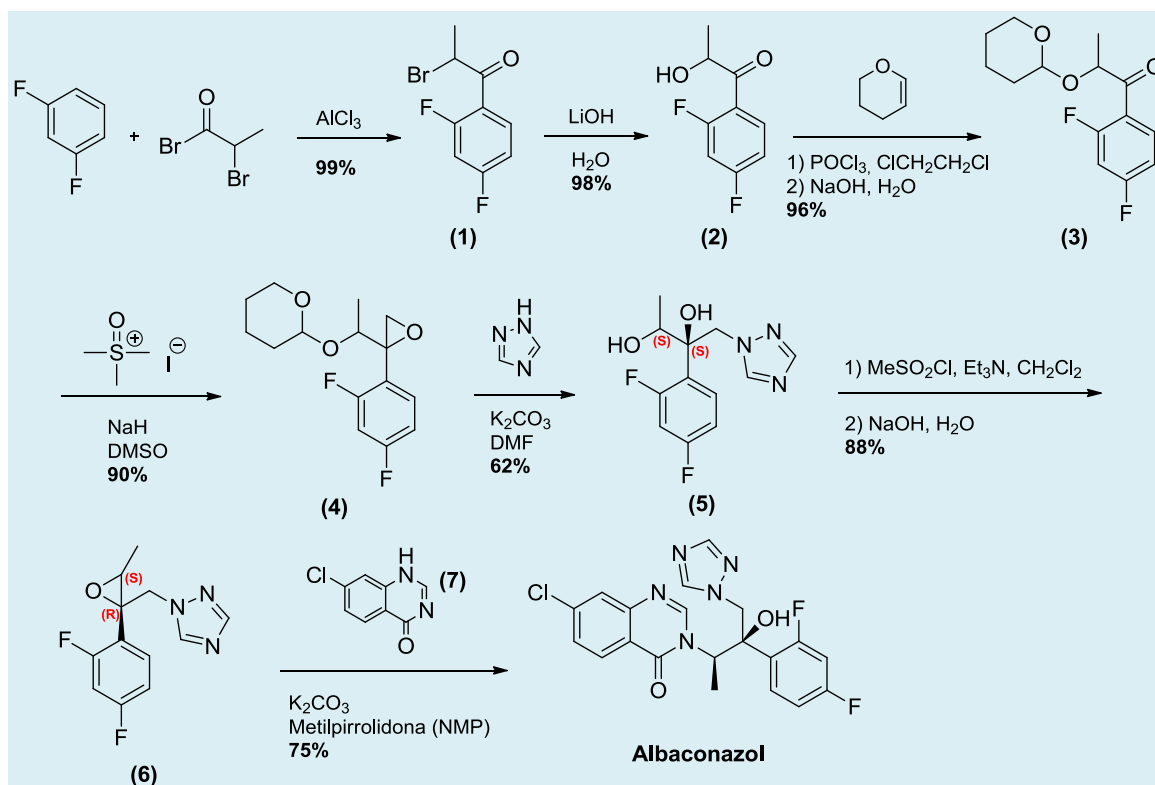
Fluconazol

Albaconazol

Figura 22. Estudo da relação estrutura atividade do albaconazol

A síntese do albaconazol inicia-se pela acilação de Friedel-Crafts do 1,3-difluorobenzeno, utilizando-se brometo de 2-bromopropionila em cloreto de alumínio, para dar o intermediário **1**. Este reage com hidróxido de lítio em água, sofrendo substituição nucleofílica do bromo pela hidroxila, gerando o intermediário **2**, cuja hidroxila é protegida com di-hidropirano para dar **3**. A etapa seguinte é a epoxidação de Corey do intermediário **3** com iodeto de

trimetilsulfoxônio para formar o intermediário **4**. A abertura do epóxido **4** é feita com 1*H*-1,2,4-triazol. Nesta etapa, o intermediário também é desprotegido pela ação da base, fornecendo **5**. A etapa seguinte é uma epoxidação por cloreto de metanossulfonila, para gerar **6**. A etapa final é a abertura de **6** em meio básico, pela 7-cloroquinazolinona (**8**), fornecendo o albaconazol em rendimento global de 34% (Esquema 10).^{51,52}

**D0870**

O D0870 (Figura 23) é outro derivado desta classe com ampla atividade antimicótica, desenvolvido pela Zeneca

Pharmaceuticals. Este composto tem excelente atividade contra *T. cruzi*, promovendo 70-90% de cura parasitológica nas fases aguda e crônica em modelos murinos. Também foi efetivo em cepas resistentes ao benconazol.^{42,53}

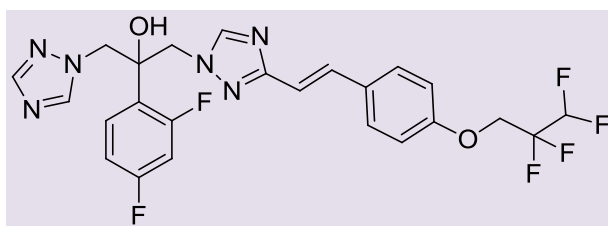


Figura 23. Estrutura química do D0870

O D0870 tem a estrutura do seu protótipo fluconazol, com adição de grupos que fazem interações hidrofóbicas e hidrofílicas (Figura 24). Com isso, o D0870 alcançou um tempo longo de meia-vida, 72 horas, quando comparado ao posaconazol, 24 h, fluconazol,

3 h e cetoconazol, de 6-9 h, mostrando, assim, sua superior atividade intrínseca anti-*T. cruzi* frente aos demais compostos citados. Entretanto, os ensaios clínicos e o desenvolvimento foram descontinuados devido a sua elevada toxicidade.

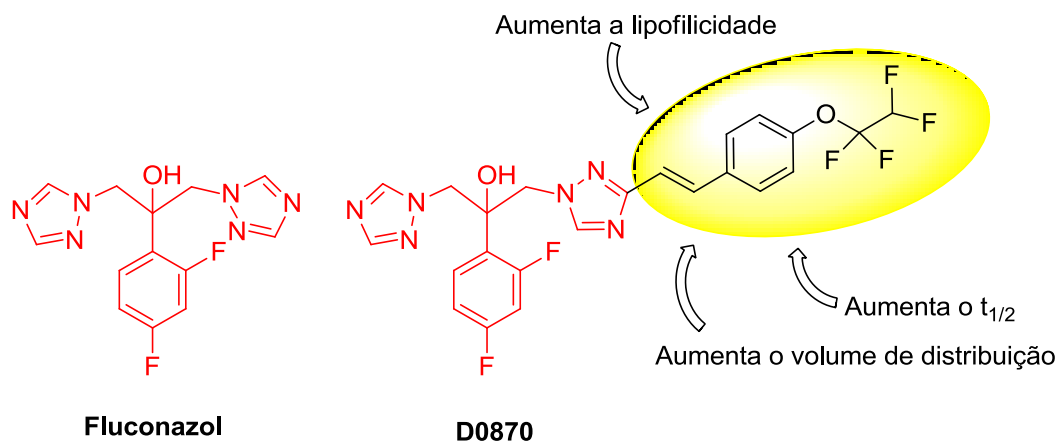
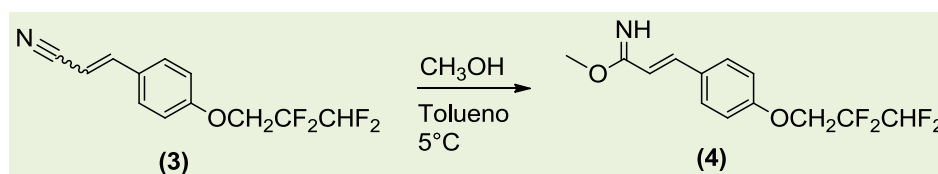


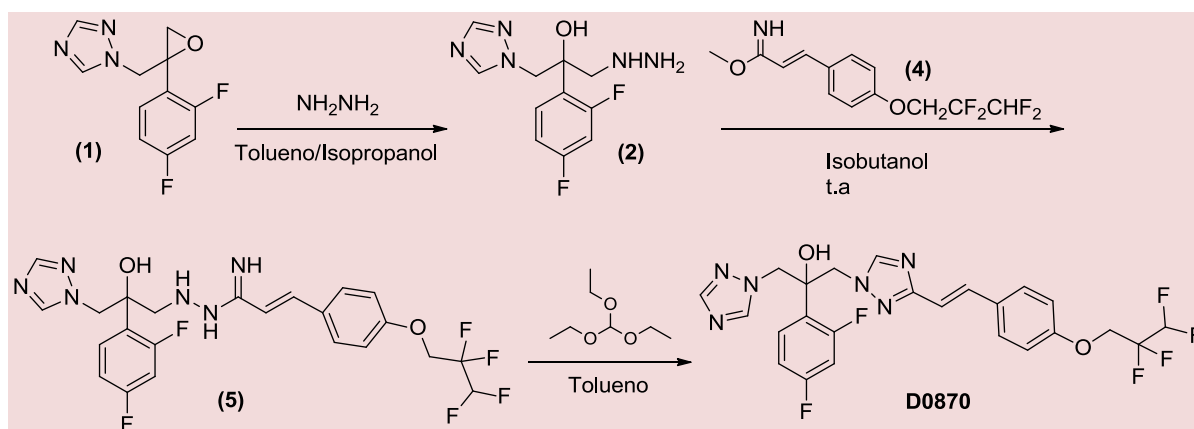
Figura 24. Estudo da relação estrutura atividade do D0870

A primeira etapa da síntese do D0870 consiste na abertura do epóxido **1**, com hidrazina, em tolueno e atmosfera inerte, para dar **2** (Esquema 12). O intermediário **2** reage com o iminoéter **4**, preparado *in situ*

partir da nitrila **3** (Esquema 11), em isobutanol sob atmosfera inerte (N_2), para dar o intermediário **5**. A última etapa é a reação em tolueno entre o intermediário **5** com ortoformato de etila (Esquema 12).⁶¹



Esquema 11. Síntese do intermediário iminoéter **3** da rota do D0870



Esquema 12. Síntese do D0870

TAK-187

Outro derivado com largo espectro de

atividade antifúngica é o TAK-187 (Figura 25), desenvolvido pela empresa japonesa Takeda Chemical Company. Ele também tem alta atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* e foi capaz de

promover a cura em camundongos infectados nas fases aguda e crônica. Foi também efetivo em cepas resistentes ao benzonidazol e ao nifurtimox.⁴⁵

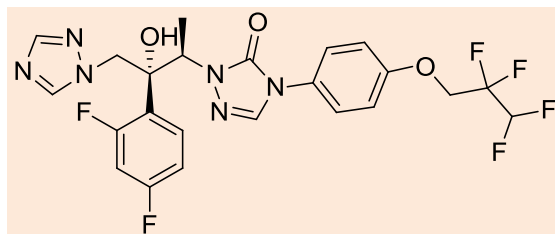


Figura 25. Estrutura química do TAK-187

O TAK-187 é outro análogo estrutural do fluconazol com substituição do anel triazol por triazolona, com a metila adjacente, seguida pela adição dos mesmos fragmentos hidrofóbicos e hidrofílicos do D0870 (Figura 26). O objetivo proposto foi alcançado com êxito, conseguindo uma superior atividade

intrínseca de anti-*T. cruzi*, com tempo de meia-vida longo (35,6 horas), o que permitiu doses em dias alternados e, conseqüentemente, um tempo duas vezes maior de exposição à droga, conservando o mesmo número de doses. Sua toxicidade é muito inferior à do D0870.

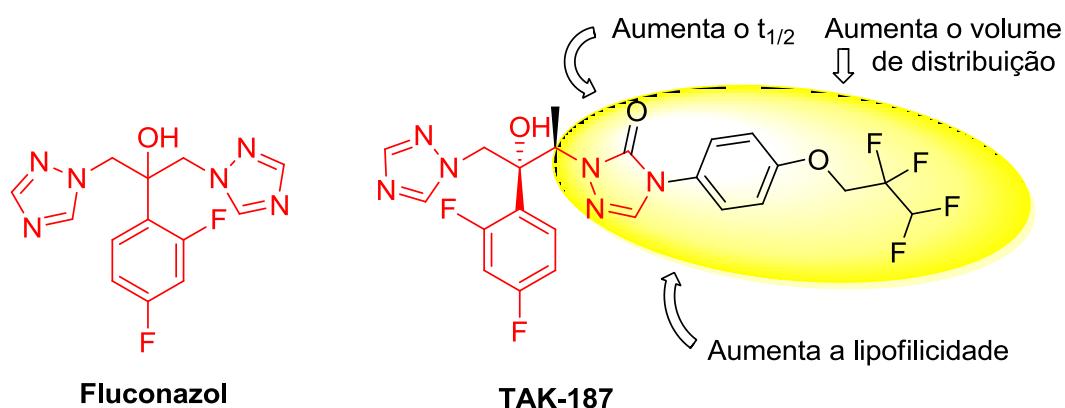
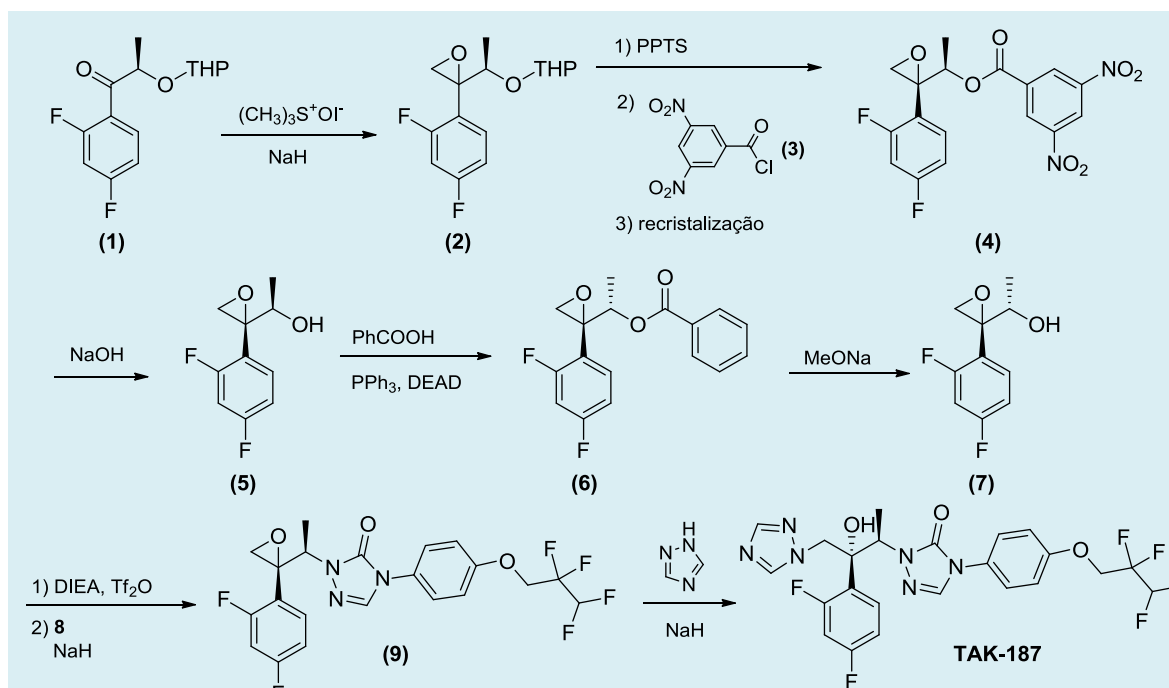


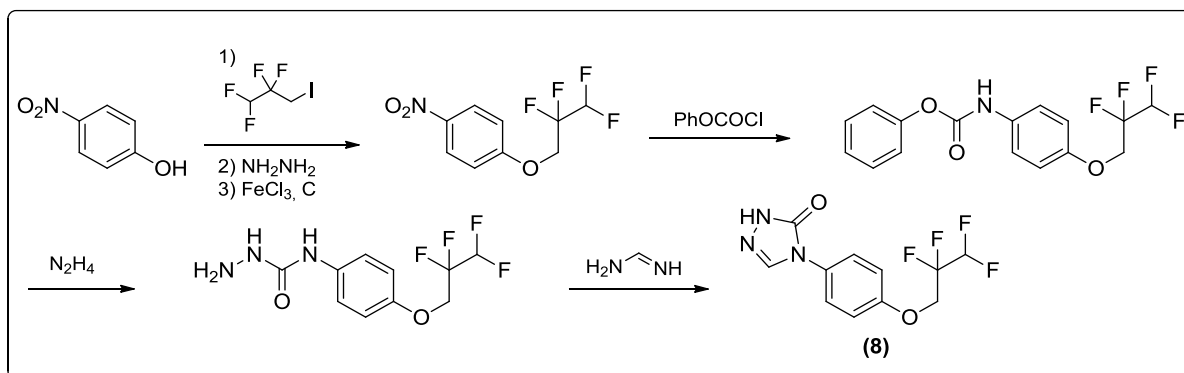
Figura 26. Estudo da relação estrutura-atividade do TAK-187

A primeira etapa da síntese do TAK-187 é a epoxidação diastereosseletiva de **1** por iodeto de trimetilsulfoxônio para dar o epóxido **2**. Na etapa seguinte, ocorre a remoção do grupo tetra-hidropirânica (THP) por *p*-toluenossulfonato de piridínio (PPTS), seguido pela reação com cloreto de 3,5-dinitrobenzoíla (**3**), produzindo uma mistura de diastereoisômeros do dinitrobenzoato, **4**, que é obtido por recristalização. A hidrólise de **4** fornece o intermediário **5**, que é convertido no éster **6** pela reação de Mitsunobu utilizando ácido benzoico em

tetra-hidrofurano, que inverte a configuração do carbono α em relação à hidroxila. A desbenzoilação subsequente do intermediário **6** fornece **7**, que na etapa seguinte é convertido no derivado triflato e, logo em seguida, no derivado triazolona **9** pela reação com o intermediário **8** (Esquema 14) e hidreto de sódio em diclorometano/dimetilformamida. A última etapa é a reação do intermediário **9** com o 1*H*-1,2,4-triazol para dar o TAK-187 (Esquema 13).^{54,55}



Esquema 13. Síntese do TAK-187



Esquema 14. Síntese do intermediário 8 da rota do TAK-187

Tipifarnibe e análogos

O tipifarnibe (Figura 27) é uma substância que está sendo estudada como anticancerígeno. É um inibidor da enzima farnesil-transferase de humanos que tem atividade contra o *T. cruzi in vitro* pela inibição da enzima CYP51 e não da farnesil-transferase.⁵⁶

Com essa descoberta, cientistas da Universidade de Washington desenvolveram uma série de derivados do tipifarnibe com o objetivo de inibir seletivamente a enzima CYP51 e menos a enzima farnesil-transferase. Várias substâncias foram sintetizadas modificando-se os anéis 1 e 2 (Figura 29). Em um dos análogos, o grupo amino foi substituído por metoxila.⁵⁷

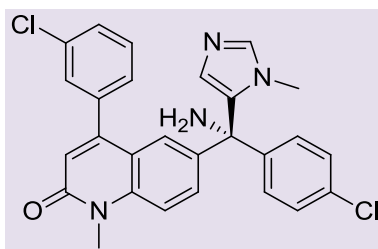


Figura 27. Estrutura química do tipifarnibe

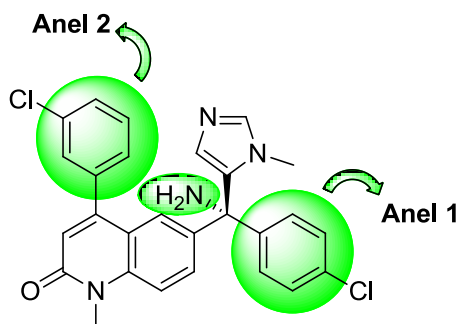


Figura 29. Estrutura química do tipifarnibe. Em verde estão representados os grupos que sofreram alterações no desenvolvimento dos análogos

Os análogos mais ativos estão ilustrados na Figura 30. Este estudo revelou a importância da substituição do grupo amino do tipifarnibe por metoxila e do átomo de cloro por fluor.⁵⁷ Os análogos tipifarnibe I e II

têm atividade anti-*T.cruzi* equivalente à do posaconazol e inibem menos a enzima farnesil-transferase (PFT) do que o tipifarnibe.⁵⁸

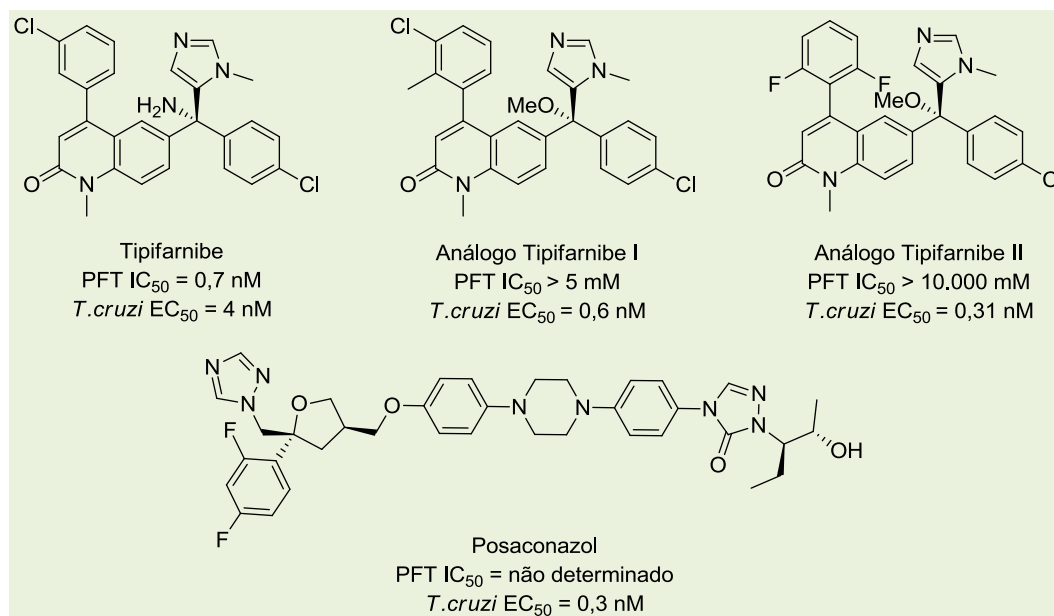
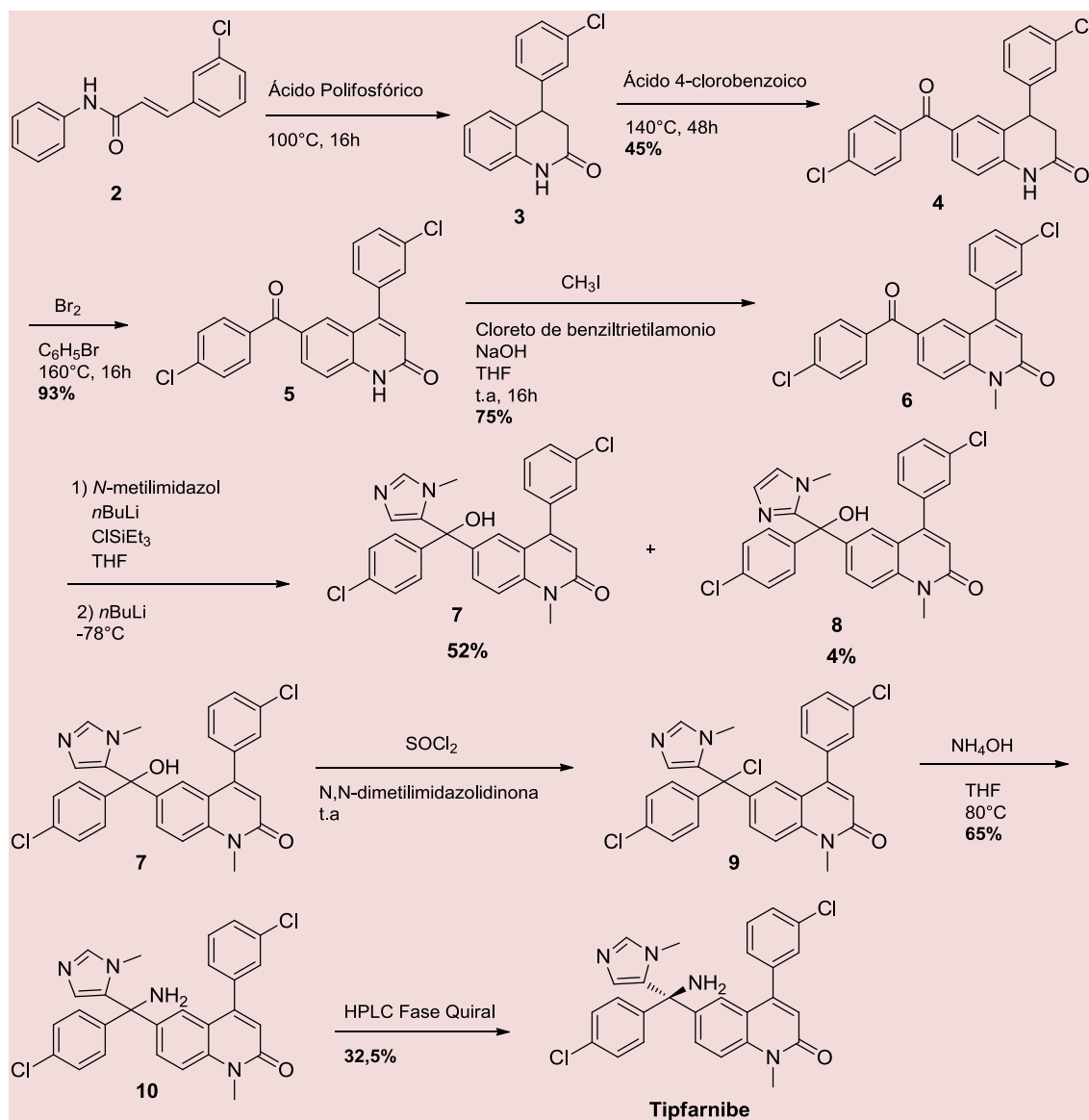


Figura 30. Atividade anti-*T. cruzi* do tipifarnibe, seus análogos I e II e do posaconazol e atividade inibitória da enzima farnesil-transferase (PFT)

A primeira etapa da síntese do tipifarnibe é a preparação do intermediário **3** pela ciclização intramolecular da amida **2** em ácido polifosfórico (PPA). A adição do ácido 4-clorobenzoico seguida por aquecimento dá a quinolina **4** que é oxidada a **5**. A *N*-metilação é feita por catálise de transferência de fase e dá o intermediário **6**. O *N*-metilimidazol é desprotonado no C-2 por adição de *n*-BuLi e com a adição de cloreto de trietilsilila forma um carbânion sililado. A adição de mais um equivalente de *n*-BuLi forma o 5-lítio-1-metil-

2-trietilsililimidazol que reage com a cetona **6** dando os intermediários **7** e **8**. A próxima etapa é a substituição da hidroxila de **7** por um átomo de cloro, usando-se cloreto de tionila, obtendo-se o intermediário **9**, que sofre substituição nucleofílica pela amônia, dando o intermediário racêmico **10**. A última etapa é a resolução de **10** por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE/HPLC) em fase quiral (Chiral OD[®] Column), obtendo-se o enantiômero ativo (+)-(R) tipifarnibe em rendimento global de 3,4% (Esquema 15).⁵⁹

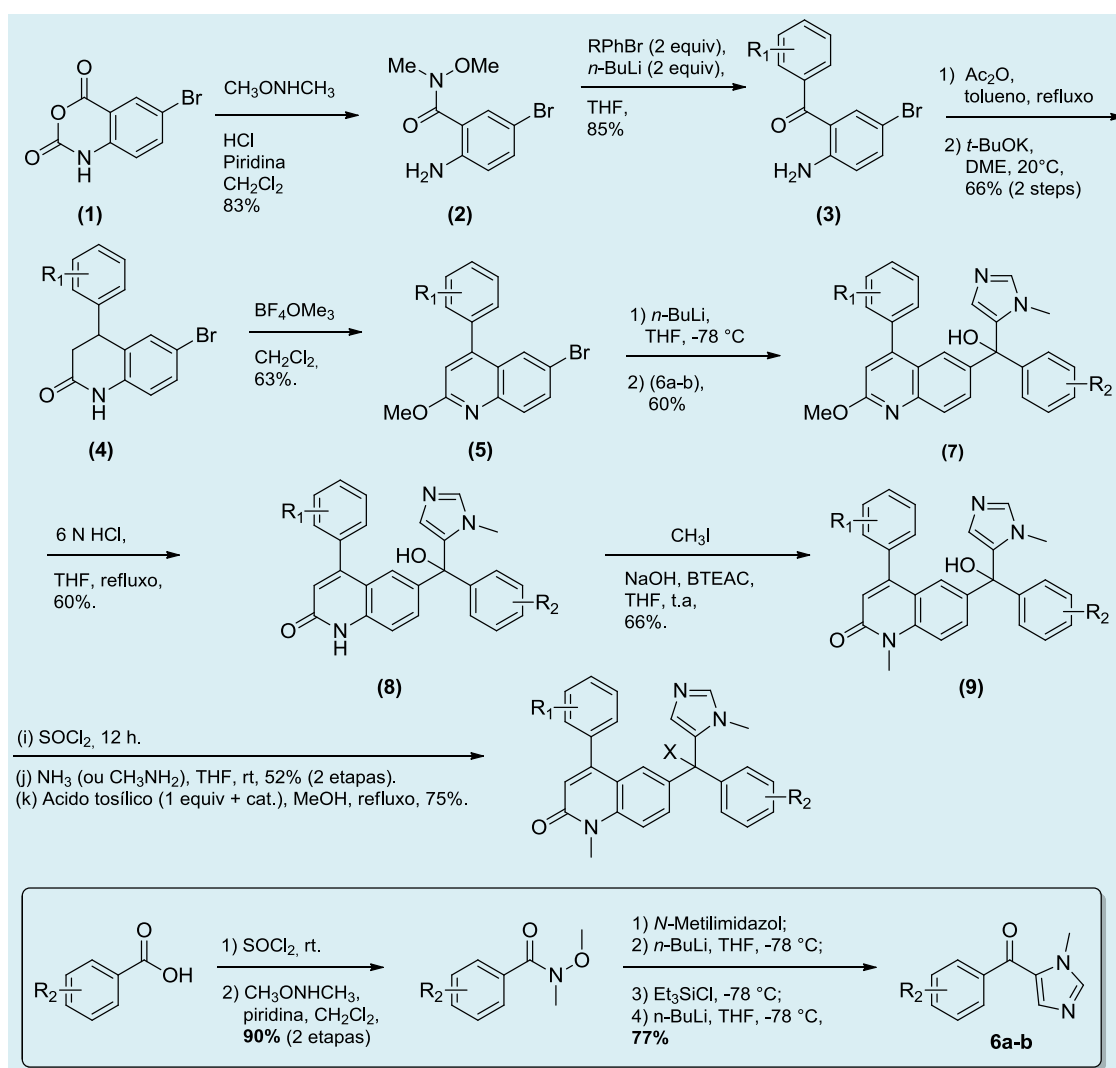


Esquema 15. Síntese do tipifarnibe

A primeira etapa da síntese dos análogos do tipifarnibe é a abertura do anidrido

isatoico **1**, para formar a amida de Weinred **2**. A etapa seguinte é a fenilação com feniltios (formados *in situ* por halogenetos de fenila e *n*-BuLi), dando origem à cetona **3**. Esta sofre acetilação seguida de anelação, para dar a quinolina **4**, que sofre aromatização no heterociclo dando o intermediário **5**. Na etapa seguinte, ocorre uma reação de troca halogênio-metal, com formação de um carbânion, que, em seguida, adiciona em **6a-b** para dar o intermediário **7**

que, por sua vez é convertido na amida **8** por ácido clorídrico 6N em tetra-hidrofurano em aquecimento sob refluxo. A amida **8** sofre *N*-metilação para gerar o intermediário **9** que, em seguida, é transformado no derivado tosila tosilato. Em seguida, faz-se a substituição nucleofílica com metanol, introduzindo o grupo -OMe e dando os análogos do tipifarnibe. O rendimento global desta rota foi cerca de 5% (Esquema 16)^{57,58}



Esquema 16. Síntese dos análogos do tipifarnibe

5. Conclusão

Nesta revisão pode-se observar a importância dos inibidores da enzima 14 α -

desmetilase como alvo promissor na quimioterapia da doença de Chagas. Além das rotas de síntese, descrevemos em detalhes a relação entre a estrutura química dos inibidores da enzima 14 α -desmetilase

com atividade anti-*T. cruzi*. O emprego do “piggyback approach” para a doença de Chagas está apresentando resultados relevantes, como o mostra a ação antichagásica do ravuconazol e do posaconazol. É incrível que após 105 anos da descoberta da doença de Chagas ainda não exista cura para a fase crônica desta patologia.

Referências Bibliográficas

- ¹ Chagas, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1911**, 3, 219. [[CrossRef](#)]
- ² Docampo, R.; Urbina, J.A. Specific chemotherapy of Chagas diseases: controversies and advances. *Trends in Parasitology* **2003**, 19, 495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³ Dias, L. C.; Dessoy, M. A.; Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova* **2009**, 32, 2444. [[CrossRef](#)]
- ⁴ Gascon, J.; Bern, C.; Pinazo, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica* **2010**, 115, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵ Bern, C.; Montgomery, S. P.; Katz, L.; Caglioti, S.; Stramer, S. L. Chagas disease and the US blood supply. *Current Opinion in Infectious Diseases* **2008**, 21, 476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶ Coura, J. R.; Vinas, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* **2010**, 465, S6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷ Coura, J. R.; De Castro, S. L. A Critical review on Chagas disease Chemoterapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2002**, 97, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Maya, J. D.; Cassels, B. K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology* **2007**, 146, 601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Ministério Da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530> Acesso em 02 junho 2014.
- ¹⁰ Adams, C. P.; Brantner, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Affairs* **2006**, 25, 420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Ruberto, I.; Szoor, B.; Clark, R.; Matthews, K. R. Investigating mammalian tyrosine phosphatase inhibitors as potential 'Piggyback' leads to target *Trypanosoma brucei* transmission. *Chemical Biology & Drug Design* **2013**, 81, 291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹² Lehninger, A.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5. ed. São Paulo, Artmed, 2011.
- ¹³ Daum, G.; Lees, N.D.; Bard, M.; Dickson, R. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1998**, 14, 1471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Golan, D. E.; Princípios de Farmacologia. A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia, 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 580, 2009.
- ¹⁵ Urbina, J. A. Parasitological cure of Chagas disease: It is possible? Is it relevant? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1999**, 94, 349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Urbina, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2009** 104, 311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Urbina, J. A.; Lazard, K.; Marchan, E.; Visbal, G.; Aguirre, T.; Piras, R.; Maldonado, R. A.; Payares, G.; De Souza, W. Mevilonin (Lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against of *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1993**, 37, 580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Martin, M. B.; Grimley, J. S.; Lewis, J. C.; Heath, H. T.; Bailey, B. N.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Caldera, A.; Lira, R.; Urbina, J. A.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R.; Croft, S. L.; Oldfield, E. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma*

- gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44*, 909. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ Urbina, J. A.; Concepcion, J. L.; Caldera, A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Otomo, T.; Hiyoshi, H. *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, *48*, 2379. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Lazardj, K.; Urbina, J. A.; de Souza, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1990**, *34*, 2097. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ Buckner, F. S.; Griffin, J. H.; Wilson, A. J.; Voorhis, W. C. V. Potent anti-*Trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2001**, *45*, 1210. [CrossRef] [PubMed]
- ²² Docampo, R. Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **1981**, *3*, 169. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Urbina, J. A.; Vivas, J.; Lazardj, K.; Molina, J.; Payares, G.; Piras, M. M.; Piras, R. Antiproliferative effects of delta 24 (25) sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Chemotherapy* **1996**, *42*, 294. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Urbina, J. A. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* **1997**, *114*, 91. [PubMed]
- ²⁵ Johnson, D. S.; Li, J. J. *The Art of Drug Synthesis*. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2007. p. 71-77. ISBN 978-0-471-75215-8 [CrossRef]
- ²⁶ Lepesheva, G.I.; Ott, R.D.; Hargrove, T.Y.; Kleshchenko, Y.Y.; Schuster, I. et al. Sterol 14 α Demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: Enzyme inhibition and parasite cell growth. *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 283. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ Haitao, J.; Wannian, Z.; Youjun, Z.; Min, Z.; Jie, Z; Yunlong, S.; Jiaguo, L; Ju, Z. A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 2493. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Wang, Y; Damu, G. L. V.; Lv, J; Geng, R.; Yang, D.; Zhou, C. Design, synthesis and evaluation of clinafloxacin triazole hybrids as a new type of antibacterial and antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 5363. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁹ Wang, X.; Ye, C. CN 101863832 A **2010**. [Link]
- ³⁰ Chevreuil, F.; Landreau, A.; Seraphin, D.; Larcher, G.; Bouchara, J.; Richomme, P. Synthesis and antifungal activity of new thienyl and aryl conazoles. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2006**, *21*, 293. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ De Castro, S. L. The challenge of Chagas disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* **1993**, *53*, 83. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Sean, E.; Dayna, C. M.; Dennis, J. H.; Michael, P. L.; Judith, L. T.; James, H. Jr. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of human CYP51 inhibitors. *Drug Metabolism and Disposition* **2007**, *35*, 493. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Heeres, J.; Backx, L. J. J.; Mostmans, J. H.; Cutsem, J. V. Antimycotic imidazoles. Part 4. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent orally active broad-spectrum antifungal agent. *Journal of Medicinal Chemistry* **1979**, *22*, 1003. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Buckner, F. S. Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections.

- Advances In Experimental Medicine And Biology **2008**, 625, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ McCabe, R. E.; Remington, J. S.; Araujo, F. J. *In vitro* and *in vivo* effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **1986**, 35, 280. [[PubMed](#)]
- ³⁶ Moreira, A. A. B.; Souza, H. B. W. T.; Amato Neto, V.; Matsubara, L.; Pinto, P. L. S.; Tolezano, J. E.; Nunes, E. V.; Okumura, M. Avaliação da atividade terapêutica do itraconazol nas infecções crônicas, experimental e humana, pelo *T. cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **1992**, 34, 177. [[Link](#)]
- ³⁷ Vandon, V. K.; Maurya, H. K.; Mishra, N. N.; Shukla P. K. Design, synthesis and biological evaluation of novel nitrogen and sulfur containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 44, 3130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Sundaram, V.; Uppala, V. B. R.; Akundi, S. P.; Muvva, V.; Chitta, V.; Donthula, A.; Kharkar, M. R.; Devarakonda, S. N.; Peddireddy, S. R. WO 2006065726 A2 **2006**.
- ³⁹ Liendo, A.; Visbal, G.; Piras, M.M.; Piras, R.; Urbina, J. A. Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **1999**, 104, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Urbina, J. A.; Payares, G.; Contreras, L. M.; Liendo, A.; Sanoja, C.; Molina, J.; Piras, M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P.; Loebenberg, D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, 42, 1771. [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Molina, J.; Martins-Filho, O.; Brener, Z.; Romanha, A. J.; Loebenberg, D.; Urbina, J. A. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, 44, 150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Molina, J.; Brener, Z.; Romanha, A. J.; Urbina, J. A. *In vivo* activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, 46, 137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ Lepesheva, G. I.; Hargrove, T. Y.; Anderson, S.; Kleshchenko, Y.; Furtak, V.; Wawrzak, Z.; Villalta, F.; Waterman, M. R. Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 25582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Saksena, A. K.; Girijavallabhan, V. M.; Lovey, R. G.; Pike, R. E.; Wang, H.; Liu, Y.-T.; Ganguly, A. K.; Bennett, F. EP 0736030 **1997**. [[Link](#)]
- ⁴⁵ Urbina, J. A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Molina, J.; Lira, R.; Brener, Z.; Romanha, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2003**, 21, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Clayton, J. Chagas disease: Pushing through the pipeline. *Nature* **2010**, 465, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Urbina, J. A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Lira, R.; Romanha, A. J. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2003**, 21, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Diniz, L. F.; Caldas, I. S.; Guedes, P. M.; Crepalde, G.; De Lana, M.; Carneiro, C. M.; Talvani, A.; Urbina, J. A.; Bahia, M. T. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2010**, 54, 2979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Xu, L.; Muller, M. R.; Yu, X.; Zhu, B. Improved chiral synthesis of ravuconazole. *Synthetic Communications* **2009**, 39, 1611. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁰ Guedes, P. M.; Urbina, J. A.; De Lana, M.; Afonso, L. C.; Velosos, V. M.; Tafuri, W. L.; Machado-Coelho, G. L.; Chiari, E.; Bahia, M. T. Activity of the new triazole derivat albacozazole against *Trypanosoma*

- (Schizotrypanum) *cruzi* in dog host. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, *48*, 4286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Huang, H.; Li, S. Synthesis of erythro-1-[[2-(2,4-difluorophenyl)-3-methoxyiranyl]methyl]-1H-1,2,4-triazole. *Jingxi Huagong Zhongjianti* **2006**, *36*, 14. [[Link](#)]
- ⁵² Bartrouli Orpi, J.; Anguita Lopez, M. WO 01/66519 A2 **2001**. [[Link](#)]
- ⁵³ Urbina, J. A.; Payares, B.; Molina, J.; Sanoja, C.; Liendo, A.; Lazard, K.; Piras, M. M.; Piras, R.; Wincker, P.; Ryley, J. F. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science* **1996**, *273*, 969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Tamura, N.; Okonogi, K.; Hayashi, R.; Matsushita, Y.; Kitazaki, T.; Tasaka, A.; Itoh, K. Optically active antifungal azoles.VI. Synthesis and antifungal activity of N-[(1R,2R)-2-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-N'-(4-substituted phenyl)-3(2H,4H)-1,2,4-triazolones and 5(1H,4H)-tetrazolones. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1996**, *44*, 314. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁵ Kitazaki, T.; Tasaka, A.; Hosono, H.; Matsushita, Y.; Itoh, K. Optically active antifungal azoles. IX. An alternative synthetic route for 2-[(1R,2R)-2-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-4-[4-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phenyl]-3(2H,4H)-1,2,4-triazolone and its analogs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1999**, *47*, 360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Hucke, O.; Gelb, M. H.; Verlinde, C. L.; Buckner, F. S. The protein farnesyltransferase inhibitor tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 5415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Kraus, J. M.; Verlinde, C. L.; Karimi, M.; Lepesheva, G. I.; Gelb, M. H.; Buckner, F. S. Rational modification of a candidate cancer drug for use against Chagas disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 1639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Kraus, J. M.; Tatipaka, H. B.; Mcguffin, S. A.; Chennamaneni, N. K.; Karimi, M.; Arif, J.; Verlinde, C. L.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H. Second generation analogues of the cancer drug clinical candidate tipifarnib for anti-Chagas disease drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 3887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Angibaud, P. R.; Venet, M. G.; Filliers, W.; Broeckx, R.; Ligny, Y. A.; Muller, P.; Poncelet, V. S.; End, D. W. Synthesis routes towards the farnesyl protein transferase inhibitor ZARNESTRATM. *European Journal of Organic Chemistry* **2004**, *3*, 479. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁰ Urbina, J. A.; Lira, R.; Visbal, G.; Bartroli, J. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite Trypanosoma (Schizotrypanum) *cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, *44*, 2498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶¹ Peter, D. E.; Blakeney, M. K.; David, P. J.; Philip T. N. WO9604256 **1996**. [[Link](#)]