

Artigo

Otimização da Síntese do Fluconazol: um Importante Fármaco Antifúngico da Classe dos Azóis

Menozzi, C. A. C.;^{a,b} Castelo-Branco, F. S.;^a França, R. R. F.;^{a,c} Domingos, J. L. O.;^d Boechat, N.^{a,*}

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (2), no prelo. Data de publicação na Web: 24 de março de 2017

<http://rvq.sbq.org.br>

Optimization of Fluconazol Synthesis: An Important Azole Antifungal Drug

Abstract: Fluconazole is an azolic second-generation antifungal drug and is part of the National List of Essential Drugs (RENAME) of the Brazilian Ministry of Health. It is considered as first choice for the treatment of some opportunistic fungal infections and also applied in the AIDS treatment program as prophylactic therapy to avoid these infections. Due to the importance of fluconazole for the Brazilian Health System (SUS), it is strategic the domain of its obtaining process. Thus, improvements in the synthesis of this substance are also of special interest. In this work, many changes were proposed and carried out in the original fluconazole synthetic route, aiming to increase yield and using solvents and processes with a lower environmental impact. With these optimizations, the overall yield achieved was 53%, which is about 10 times higher than that of the original process.

Keywords: Fluconazole; synthesis; optimization.

Resumo

O fluconazol é um antifúngico da classe dos azóis de segunda geração, sendo integrante da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Ministério da Saúde do Brasil. Este fármaco é considerado como de primeira escolha para o tratamento de algumas infecções fúngicas oportunistas e também no programa de tratamento da AIDS, como terapia profilática para evitar estas infecções. Devido à importância do fluconazol para o sistema único de saúde (SUS), é estratégico para o Brasil o domínio de seu método de obtenção e, desta forma, melhorias na síntese desta substância também são de especial interesse. Neste trabalho foram propostas e realizadas diversas alterações na rota original do fluconazol, buscando o aumento do rendimento e utilizando solventes e processos de menor impacto ambiental. Com estas otimizações, o rendimento global alcançado foi de 53%, que é cerca de 10 vezes superior ao processo original.

Palavras-chave: Fluconazol; síntese; otimização.

* Fundação Oswaldo Cruz, Farmanguinhos, Rua Sizenando Nabuco, 100, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

 boechat@far.fiocruz.br

DOI:

Otimização da Síntese do Fluconazol: um Importante Fármaco Antifúngico da Classe dos Azóis

Cheyene A. C. Menozzi,^{a,b} Frederico S. Castelo-Branco,^a Rodolfo Rodrigo F. França,^{a,c} Jorge Luiz O. Domingos,^d Núbia Boechat^{a,*}

^a Fundação Oswaldo Cruz, Farmanguinhos, Rua Sizenando Nabuco, 100, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^b Associação Brasileira de Ensino Universitário, Rua Itaiara, 301, Centro, Belford Roxo-RJ, Brasil.

^c Universidade Federal do Rio de Janeiro, DQO-IQ, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Bl. A, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^d Universidade do Estado do Rio de Janeiro, DQO-IQ, Rua São Francisco Xavier, 524, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* boechat@far.fiocruz.br

Recebido em 11 de janeiro de 2017. Aceito para publicação em 23 de março de 2017

1. Introdução
2. Resultados e Discussão
3. Conclusão
4. Parte Experimental

1. Introdução

Os fungos são micro-organismos pertencentes ao reino *Fungi* e abundantemente distribuídos na natureza, podendo ser encontrado em plantas, animais, ambientes aquáticos e terrestres.^{1,2} Estima-se que na natureza exista cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas, porém apenas cerca de 100 mil foram descritas até o momento.³ Entre essas espécies, existem aquelas que são importantes para as indústrias alimentícias, farmacêuticas, agrônômicas como também há aquelas que causam danos às plantações, aos animais e aos seres

humanos.⁴

Apesar de os fungos serem pouco virulentos e poucas espécies serem capazes de iniciar uma infecção em uma pessoa saudável, as infecções fúngicas sistêmicas progressivas representam alguns dos mais difíceis diagnósticos e prognósticos em doenças infecciosas.^{5,6} Essas infecções são classificadas de acordo com os tecidos e órgãos afetados, sendo assim, as micoses são divididas em superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas ou profundas e oportunistas.⁷

As micoses superficiais, também chamadas de ceratofitoses, são produzidas por diversas espécies fúngicas que invadem a

camada mais externa na pele ou a haste dos pelos, causando lesões como manchas e nódulos, porém não causam reações de hipersensibilidade cutânea. As principais doenças desse grupo são as pedras branca e negra e a pitíriase versicolor, causadas respectivamente, pelos fungos *Trichosporon beiguele*, *Piedraia hortae* e *Malassezia furfur*.

Já as micoses cutâneas podem ocorrer através da colonização de toda a camada córnea da pele, parte queratinizada intrafolicular dos pelos, mucosa e unhas, sendo causadas por dermatófitos e leveduras. Os dermatófitos são fungos que necessitam de queratina para o crescimento e podem causar infecções na pele, pelos e unhas, que são chamadas de dermatofitoses ou popularmente de “tinha”. Estes patógenos pertencem aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, responsáveis por causar doenças como tinea corporis, tinea pedis, tinea cruris, tinea barbae, tinea unguium, tinea imbricata e tinea fávica. As leveduras são produzidas na maioria das vezes por leveduras do gênero *Candida*, principalmente pela espécie *C. albicans* que são responsáveis por causar lesões nas unhas e na pele, principalmente em regiões como as dos espaços interdigitais, axilas e sulcos mamários.^{7,8}

As micoses subcutâneas ocorrem através da inoculação de um fungo patogênico em decorrência de um traumatismo, manifestando-se através de edemas ou lesões na pele. As principais doenças desse grupo são a esporotricose, cromoblastomicose ou cromomicose, micetomas, rinosporidiose e blastomicose queloidiana, sendo as três primeiras as mais comuns no Brasil. As micoses profundas ou sistêmicas são adquiridas através da inalação de propágulos dos fungos, dessa forma, a via pulmonar é a primeira a ser atingida e a infecção pode regredir espontaneamente. O fungo pode ainda ser disseminado pelo corpo através da circulação sanguínea causando lesões extrapulmonares. As micoses deste grupo são a coccidioidomicose, a blastomicose, a histoplasmose e a

paracoccidioidomicose.^{7,8}

Um relevante problema de saúde pública e que pode levar a casos de óbito são as micoses oportunistas, normalmente causadas por fungos que convivem com o hospedeiro sem causar doenças, porém, ao encontrar condições favoráveis, desenvolvem seu potencial patogênico causando infecções que acometem os mais variados órgãos.^{8,9} Este tipo de infecção se deve a fatores como a imunossupressão causada pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), em casos de transplantes de órgãos (que exigem o uso de imunossupressores) ou resultante da quimioterapia com antitumorais.^{9,10} O uso indiscriminado de antimicrobianos de largo espectro, uso crônico de corticoides, aumento de cirurgias e o envelhecimento populacional agrava esse quadro.¹⁰ As principais infecções causadas por esse tipo de micose são a criptococose, candidíase e aspergilose, sendo as duas últimas micoses de incidência mundial.⁷

Dentre as principais classes de fármacos antifúngicos destaca-se a dos azóis. Esta, desenvolvida há cerca de cinquenta anos, é composta por heterociclos sintéticos subdivididos em imidazóis e triazóis, que têm como alvo terapêutico a membrana celular dos fungos através da inibição da enzima lanosteol 14- α desmetilase (CYP51) pertencente à família do citocromo P-450. A inibição da CYP51 impede a formação de ergosterol, um esterol de membrana relacionado à permeabilidade celular, que é essencial para a sobrevivência do fungo.

Os azóis são classificados como imidazólicos ou triazólicos de primeira e segunda geração. Os fármacos de primeira geração são utilizados principalmente para tratar micoses superficiais, sendo os de segunda e terceira para tratar as infecções sistêmicas. Alguns exemplos dos principais representantes desta classe são: cetoconazol e itraconazol (imidazólicos), fluconazol (triazólico de primeira geração), voriconazol e posaconazol (triazólicos de segunda geração) (Figura 1).^{9,11}

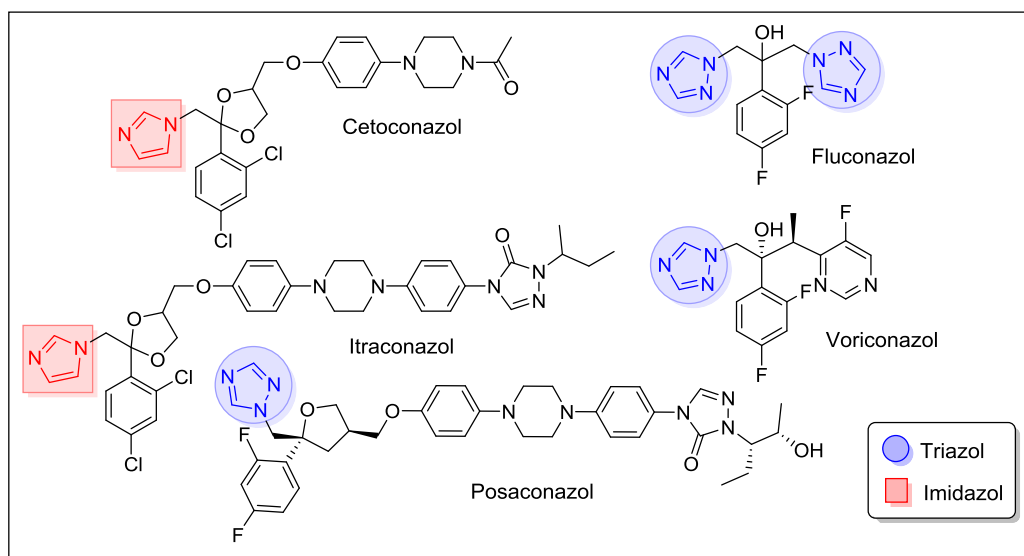


Figura 1. Estruturas moleculares de alguns dos principais fármacos azólicos

O fluconazol é um fármaco triazólico planejado a partir dos imidazóis de primeira geração.¹¹ É um dos representantes mais importantes desta classe, devido a sua maior solubilidade em água do que os demais representantes desta classe, além da via oral este fármaco pode também ser administrado por via intravenosa.^{11,12} Ele possui uma boa biodisponibilidade oral, tendo um tempo de meia vida de até 22 horas e, com isso, sua administração é realizada em menor frequência, facilitando a adesão do paciente ao tratamento.¹¹ Sua principal via de eliminação é a depuração renal devido a sua alta estabilidade metabólica.^{11,12} Não obstante, é uma substância que possui baixos níveis de toxicidade. Este ótimo perfil farmacocinético foi alcançado através do planejamento racional.^{11,12}

Ao analisar o desenvolvimento do fluconazol considerando os imidazóis de primeira geração como protótipos, observa-se que uma importante modificação realizada foi a inclusão do anel 1,2,4-triazol em substituição ao imidazol, o que contornou o problema da oxidação metabólica, que diminuía sua eficácia e tempo de meia vida.^{11,12} Grupos laterais foram também substituídos pelo anel 1,2,4-triazol, o que eliminou o centro estereogênico (que, quando definido, eleva o custo de produção

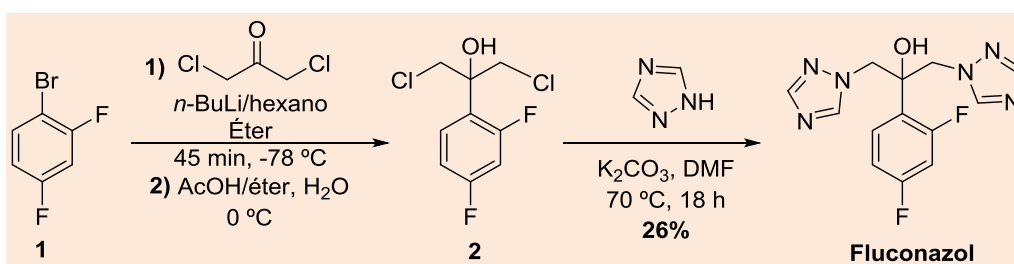
do fármaco) e também resultando em maior solubilidade em água.¹¹ O anel 2,4-difluorobenzeno foi escolhido por este ser capaz de aumentar o tempo de meia vida e a atividade da substância, além deste não ser passível de hidroxilação aromática, o que, caso ocorresse, poderia aumentar a sua toxicidade.^{11,12} A hidroxila presente na molécula, por estar ligada a um carbono terciário, e por ser muito impedida estericamente, não torna possível uma bioconjugação neste sítio, o que também contribui para o aumento do tempo de meia vida.¹²

O fluconazol é utilizado no Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde do Brasil como terapia profilática, sendo também empregado como medicamento de primeira escolha para o tratamento de infecções oportunistas causadas pelo gênero *Candida*.¹³ Este também possui ação contra dermatófitos e a espécie *Cryptococcus neoformans*, sendo eficaz no tratamento de meningite criptocócica, devido a sua excelente penetração no liquor cefalorraquiano.^{8,11}

A obtenção do fluconazol está descrita em várias patentes,^{14,15} sendo a original realizada por Richardson, então pesquisador da Pfizer, nos anos de 1982 e 1983. Esta foi executada

em escala de bancada (grama) e ocorreu em duas etapas: a primeira foi uma reação de acoplamento carbono-carbono entre 1-bromo-2,4-difluorbenzeno (**1**) e 1,3-dicloropropanona, empregando-se *n*-BuLi, para obter **2**; e a segunda uma substituição dos átomos de cloro de **2**, por 1,2,4-triazol, para a qual o rendimento descrito para a obtenção do fluconazol foi de apenas 26%. Apenas o rendimento da última etapa foi relatado, sendo este considerado para as

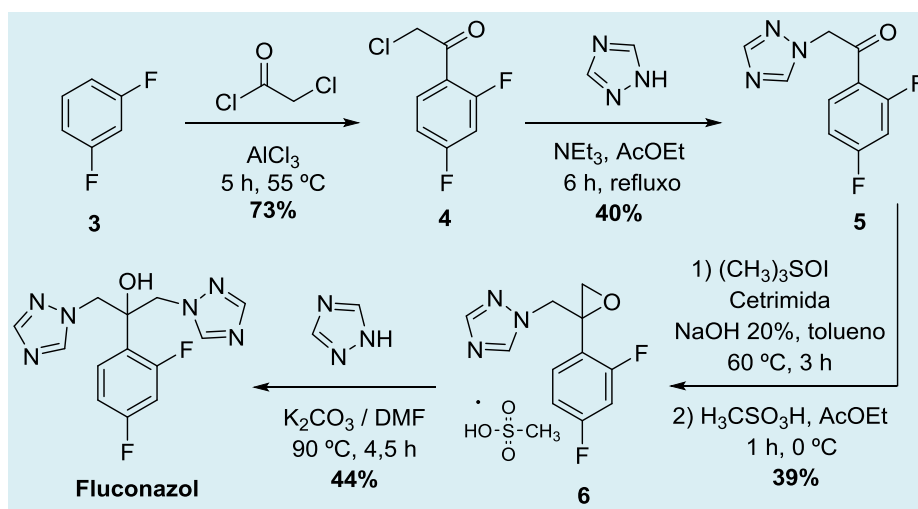
duas etapas (Esquema 1). As desvantagens desta rota são decorrentes do uso de *n*-BuLi, o qual reage vigorosamente com a água e pode ser explosivo, quando não manipulado adequadamente, especialmente em processos indústrias de maior escala, e pelo método de purificação, através de coluna cromatográfica, que exige grande quantidade de solventes e sílica, encarecendo o custo do processo.



Esquema 1. Primeira rota sintética proposta por Richardson para a obtenção do fluconazol

Desta forma, Richardson desenvolveu uma segunda rota para a obtenção do fluconazol com o uso de reagentes mais facilmente aplicáveis em escala industrial.¹⁵ A primeira etapa consistiu em uma acilação de Friedel-Crafts do 1,3-difluorbenzeno (**3**), com o cloreto de α -cloroacetila, com rendimento de 73%. Em seguida, foi realizada a substituição nucleofílica de **4** com o 1,2,4-triazol, cujo rendimento alcançado foi de 40%. Na etapa seguinte foi feita a epoxidação

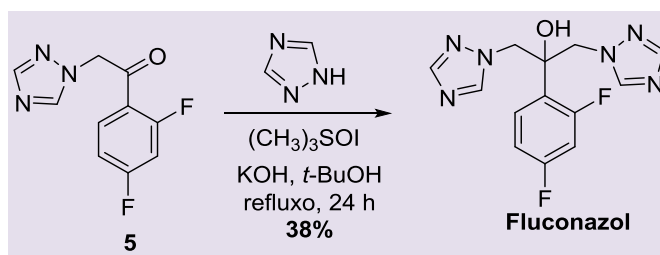
de Corey-Chaykovsky da cetona **5**, gerando o sal de mesilato (**6**), o qual foi mais facilmente manipulado, por ser sólido. O fluconazol foi finalmente obtido pela abertura do epóxido **6** com o 1,2,4-triazol, cujo rendimento foi de 44%. A desvantagem desta rota pode ser atribuída aos baixos a moderados rendimentos, o que leva à obtenção do fluconazol em rendimento global de apenas 5% (Esquema 2).



Esquema 2. Segunda rota sintética proposta por Richardson para obtenção do fluconazol

Em 1993, Narayanan *et al.* otimizaram a rota sintética de Richardson ao realizar as duas reações finais em uma etapa (*one pot*) na escala de bancada (grama).¹⁶ Com isso, além de facilitar o processo, pois não foi necessário o isolamento do epóxido e nem a sua conversão ao sal mesilato, o rendimento nesta etapa (38%) foi cerca de duas vezes maior do que as três últimas etapas do processo de Richardson (Esquema 3). No

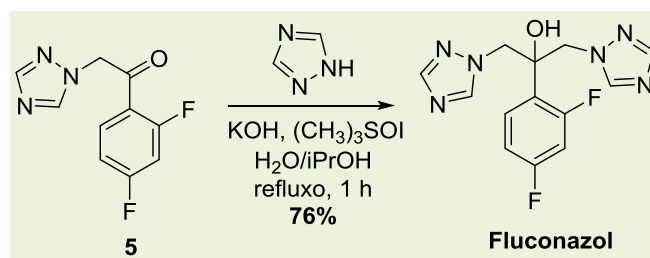
entanto, essa síntese possui desvantagens como o alto tempo reacional de 24 horas, que ocorre devido ao fato dos reagentes não serem completamente solúveis no meio reacional. Além disso, essas condições reacionais levam à formação de muitos subprodutos, tornando a purificação mais difícil, sendo também necessária a utilização de coluna cromatográfica, desaconselhável em escala industrial.



Esquema 3. Otimização da síntese do fluconazol realizada por Narayanan *et al.*

Alguns anos depois, baseados no processo descrito por Narayanan *et al.*, Kim *et al.* desenvolveram um outro método de síntese do fluconazol, visando uma maior aplicabilidade industrial.¹⁷ Neste, com o objetivo de diminuir o tempo reacional, foi utilizado uma mistura de água e isopropanol na proporção de 1:1 como sistema de solvente, tornando todos os reagentes solúveis no meio reacional.¹⁷ O tempo de reação foi reduzido para 1 hora e o rendimento aumentado para 76% (Esquema

4). Apesar do método de purificação descrito neste processo não utilizar coluna cromatográfica, ele inclui sucessivas etapas de extração.¹⁷ Além disso, tanto Kim *et al.* quanto Narayanan *et al.* apenas otimizaram as duas últimas etapas da rota original do fluconazol, fazendo com que o rendimento global não aumentasse significativamente, visto que as duas primeiras etapas permanecem com baixos rendimentos (73% e 40%, respectivamente).



Esquema 4. Otimização da síntese do fluconazol realizada por Kim *et al.*

Considerando a importância do fluconazol para a quimioterapia antifúngica e sua demanda para o SUS, é estratégico dominar o seu processo de síntese, mesmo sabendo que

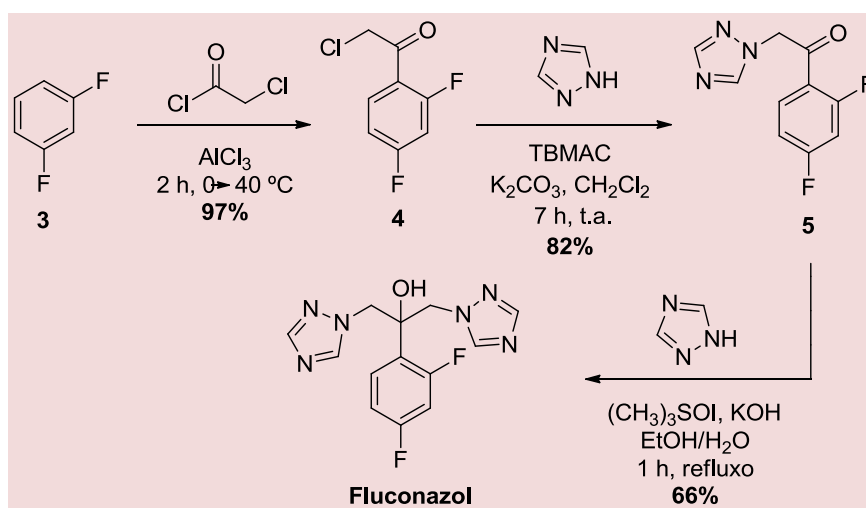
ele é uma *commodity* no mercado farmoquímico mundial. Desse modo, além do domínio da técnica de obtenção deste fármaco, através de uma rota verticalizada,

ou seja, a partir de reagentes mais simples e de menor custo, é de grande interesse que seja desenvolvido um processo para a preparação do fluconazol, visando menores custos, menores impactos ambientais e etapas com rendimentos otimizados, que sejam aplicáveis de forma vantajosa em escala industrial. Por outro lado, ter a capacitação e domínio da técnica de sua síntese é um importante estímulo para um químico medicinal desenvolver novas moléculas derivadas do fluconazol.

Assim, os objetivos deste trabalho foram o desenvolvimento e otimizações na síntese do fluconazol, tendo em vista a obtenção do domínio nacional da tecnologia de produção deste insumo farmacêutico ativo (IFA).

2. Resultados e Discussão

A rota sintética proposta é composta por três etapas, onde a primeira consistiu na acilação de Friedel-Crafts no 1,3-difluorbenzeno (**3**) com o uso de cloreto de α -cloroacetila com catálise por cloreto de alumínio (Esquema 5).¹⁹ Esta foi realizada sem o uso de solvente, já que o cloreto de α -cloroacetila e **3** são líquidos, o que configura uma vantagem sob o ponto de vista de custo e de impacto ambiental. O meio reacional foi mantido à 40 °C por 2 horas, sendo a evolução da reação monitorada por cromatografia em camada fina (CCF) (R_f = 0,5; acetato de etila/hexano (2:8)). O produto desejado **4** foi obtido em 97% de rendimento.



Esquema 5. Rota sintética desenvolvida para a obtenção do fluconazol

O produto **4** foi caracterizado por espectrometria de massas de ionização por elétrons (CG-EM), por RMN ¹H e por ponto de fusão. A incorporação do grupamento α -cloroacetila ao 1,3-difluorbenzeno foi observado por RMN ¹H através da presença do duplete com integração para 2 hidrogênios em 5,05 ppm (J = 2,6 Hz) referente aos hidrogênios do grupo metileno (Figura 2). O espectro de massas por ionização por elétrons mostrou a presença do íon molecular e fragmentos característicos para a sua estrutura, como o pico base de

m/z 141, referente à formação do íon acílio, correspondente à perda de CH_2Cl (Figura 3). É importante ressaltar que o produto foi obtido com a seletividade desejada, uma vez que não houve formação dos regioisômeros referentes à adição ao carbono 2, provavelmente devido à repulsão dos átomos de flúor, e ao carbono 4, devido ao padrão de orientação dos substituintes. A faixa de fusão aferida foi compatível com a da literatura.²² Não foi necessária nenhuma etapa adicional de purificação. O rendimento foi otimizado em relação ao método de referência, através

do uso de menor quantidade de solvente no isolamento e sucessivas extrações da fase aquosa. Com isso, foi proporcionado um

rendimento que é cerca de 30% maior que o original descrito por Richardson.

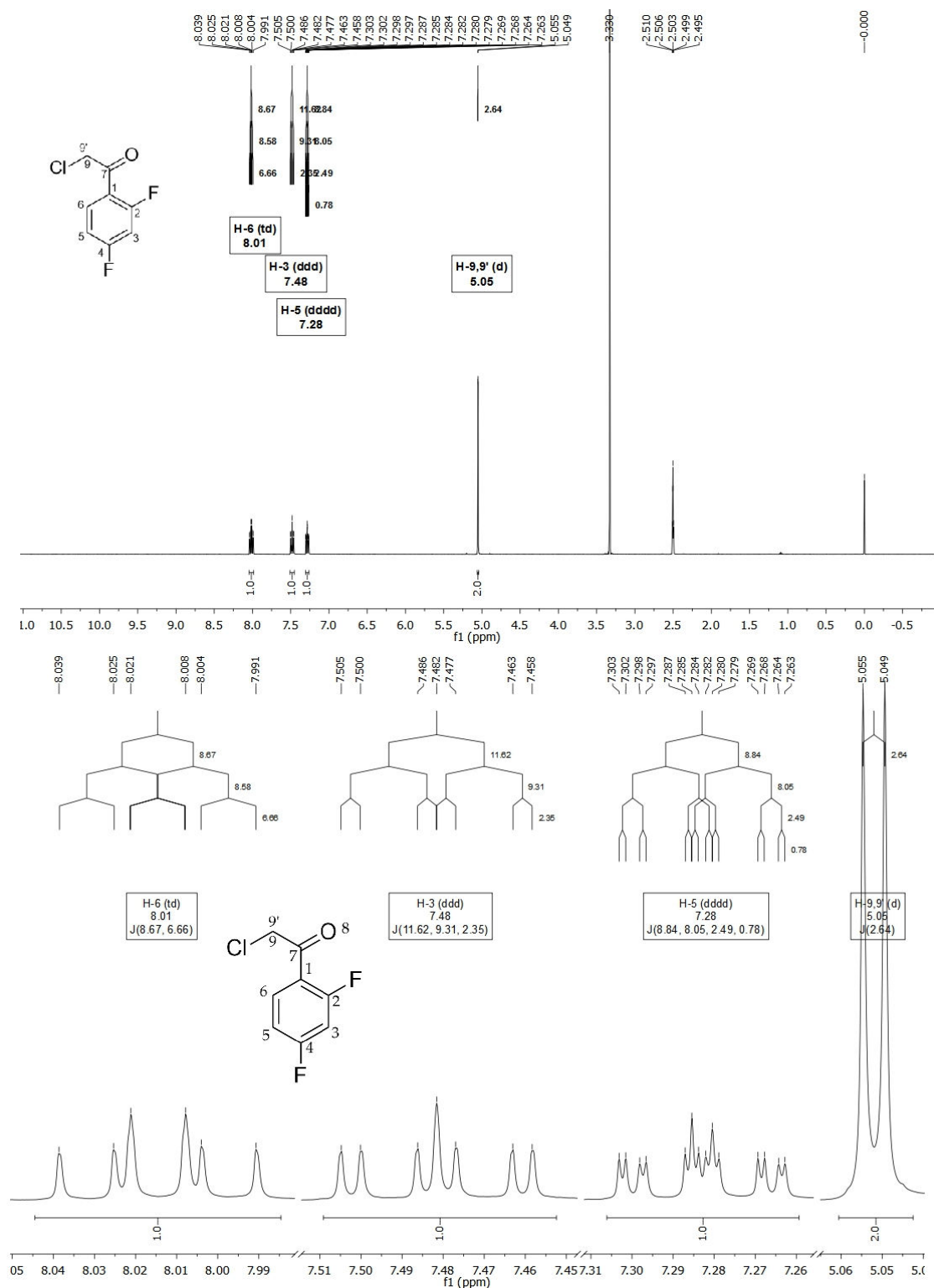


Figura 2. Espectro de RMN ^1H , completo e expandido, (400 MHz, DMSO D_6) do intermediário 4

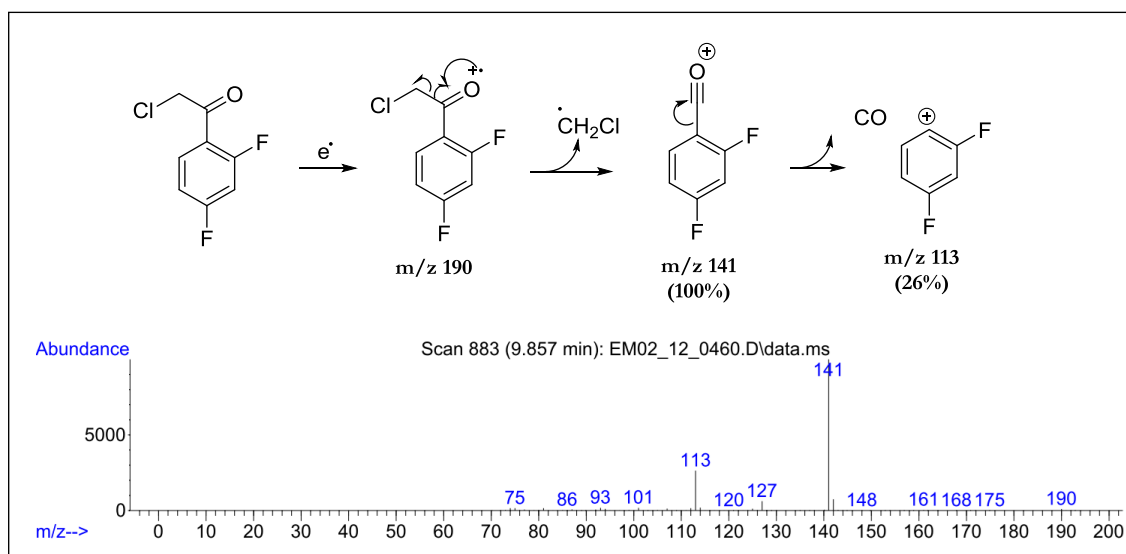


Figura 3. Proposta de fragmentação e espectro do intermediário 4

Na segunda etapa foi realizada uma reação de substituição nucleofílica do cloro do intermediário 4, utilizando o 1,2,4-triazol como nucleófilo (Esquema 5). A melhor condição encontrada para esta reação compreendeu o uso de diclorometano, em substituição ao acetato de etila, e de carbonato de potássio, substituindo a base trietilamina. Também foi adicionado o catalisador de transferência de fase cloreto de tetrabutilmetilamônio (TBMAC). O carbonato de potássio tem menor custo e menor impacto ambiental do que a trietilamina e proporcionou um perfil de reação mais limpo, através da formação de menos subprodutos. O diclorometano foi escolhido como solvente porque, dada à sua baixa polaridade, não é capaz de solvatar o nucleófilo e, assim, não dificulta o seu ataque ao eletrófilo. No entanto, tanto o carbonato quanto o triazol têm solubilidade muito baixa em diclorometano, dada a baixa constante dielétrica deste solvente, o que faz necessário o uso do TBMAC como catalisador de transferência de fase. A evolução da reação monitorada por CCF ($R_f = 0,3$; acetato de etila/hexano (8:2)). Nesta condição, a

reação foi realizada à temperatura ambiente e forneceu o produto de interesse em 82% de rendimento, após purificação por recristalização em etanol. O rendimento desta rota é o dobro do original, o que justifica o uso de um solvente menos vantajoso sob o ponto ambiental, além disso, o diclorometano pode ser reciclado, diminuindo o impacto ambiental e os custos do processo.

O intermediário 5 foi caracterizado por CG-EM, RMN ^1H e ponto de fusão. A incorporação do grupo 1,2,4-triazol foi observada por RMN ^1H pelos simpletos em 8,21 e 8,01 ppm relativos aos hidrogênios deste heterociclo (Figura 4). A substituição pelo N-1 do 1,2,4-triazol foi observada pela diferenciação dos hidrogênios deste heterociclo. Caso o ataque ocorresse pelo N-4, haveria um plano de simetria neste anel, deixando os hidrogênios equivalentes. A espectrometria de massas mostrou a presença do íon molecular e fragmentos característicos desta estrutura, como m/z 82, referente ao fragmento do 1,2,4-triazol ligado a um metileno (Figura 5). A faixa de fusão aferida foi similar à da literatura.²³

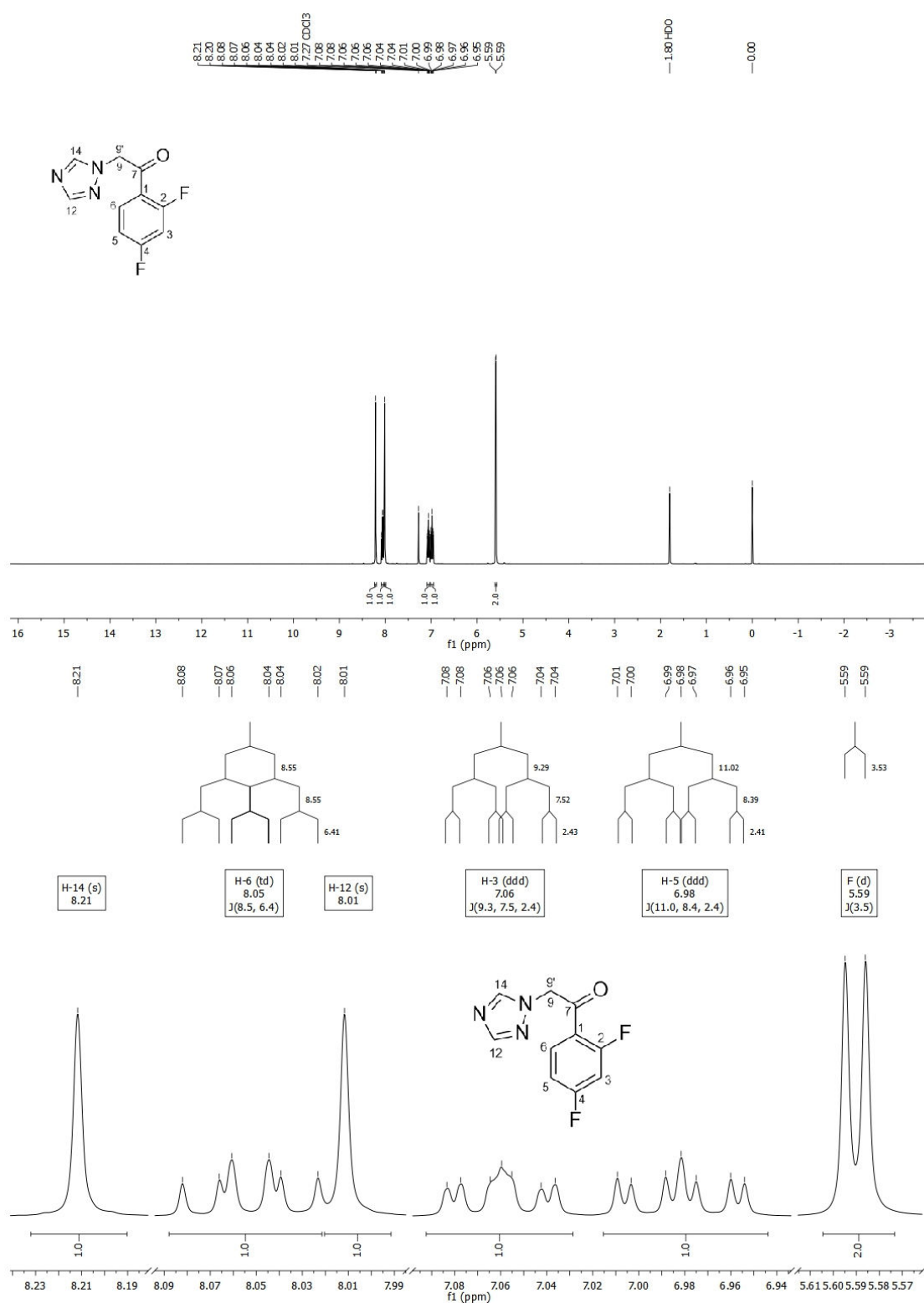


Figura 4. Espectro de RMN ^1H , completo e expandido, (400 MHz, CDCl_3) do intermediário 5

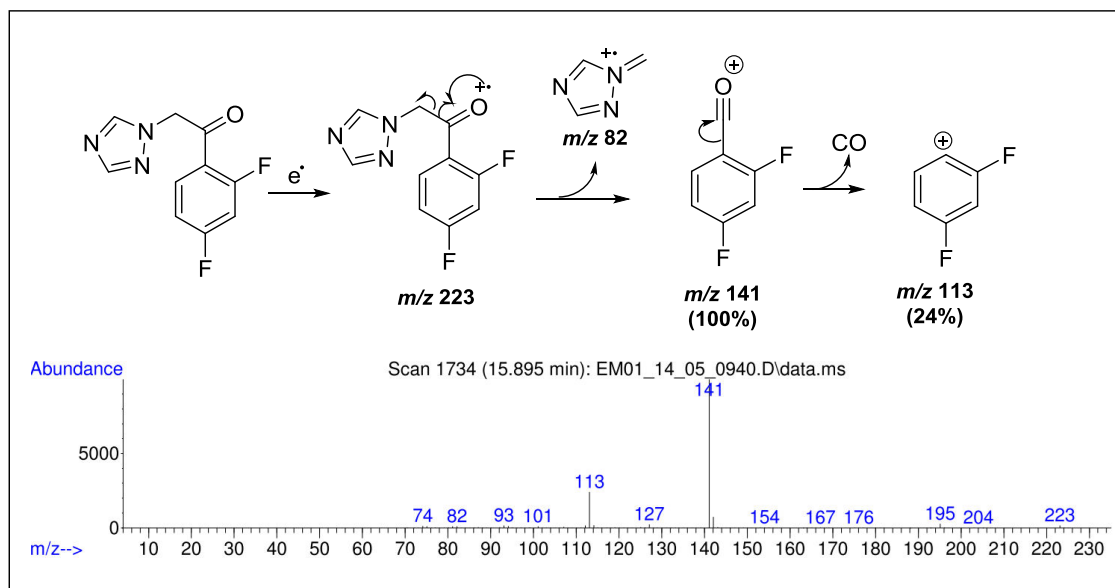


Figura 5. Proposta de fragmentação e espectro do intermediário 5

As duas últimas reações foram realizadas em uma única etapa (*one-pot*), onde ocorre a formação do epóxido na carbonila de **5**, através de uma reação de Corey-Chaykovsky, seguida da abertura deste pelo 1,2,4-triazol, que age como nucleófilo em um mecanismo similar à uma S_N2 . Para a realização desta última etapa, foi utilizado como referência o método descrito por Kim *et al.*, no qual é utilizado iodeto de trimetilsulfoxônio e hidróxido de potássio, como base. Porém, na mistura de solventes, foi trocado o isopropanol pelo etanol, devido ao fato do segundo ter menor custo e ter menor impacto ambiental. Como mencionado, a mistura de solventes água:etanol (1:1) foi utilizada com o objetivo de manter todos os reagentes em solução, o que aumenta a velocidade de reação. Esta foi realizada sob refluxo, sendo monitorada por CCF ($R_f = 0,3$, acetato de etila/acetonitrila (1:1)), e obteve-se um rendimento de 66%, que é cerca de 3,5 vezes maior do que essas etapas no processo original. Apesar do fluconazol ter sido obtido com um menor rendimento, quando comparado ao método descrito por Kim *et al.* (66% contra 76%), o grande diferencial está no isolamento e purificação do produto obtido. Enquanto no método de Kim *et al.* a purificação do fluconazol foi realizada por diversas etapas de extração ácido-base (as quais aumentam a complexidade e custo do

processo), no método desenvolvido no presente trabalho, o fluconazol é purificado por duas recristalizações com o uso de pequenas quantidades de um sistema de solvente descrito por Chandrasekhar *et al.*, composto por água e pequenas proporções de acetona e acetato de etila, seguido de solubilização em etanol e tratamento com carvão ativo.²⁰

Finalmente, o rendimento global da síntese do fluconazol realizado neste trabalho foi de aproximadamente 53%, cerca de dez vezes maior que o do processo original descrito por Richardson.

A caracterização do fluconazol foi realizada por ponto de fusão, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia na região do ultravioleta, espectrometria de massas, RMN de 1H , ^{13}C e ^{19}F e sua pureza foi quantificada por CLAE-UV.

No espectro de RMN de 1H (Figura 6) é possível observar a presença dos hidrogênios do anel 1,2,4-triazol, através dos simpletos em 8,33 e 7,80 ppm. Os hidrogênios da fenila H-3 e H-6 realizam acoplamento com os átomos de flúor do anel, o que aumenta a sua multiplicidade, tendo os sinais sobrepostos na região de 7,29 – 7,09 ppm, formando um multipeto. H-5 pode ser detectado pelo tripleto de dupletos em 6,88

ppm ($J = 8,5; 2,5$ Hz) formado pelo seu acoplamento com F-4, F-2 e H-6. O hidrogênio da hidroxila apresentou-se como

um simpleto em 6,36 ppm. Já os hidrogênios metilênicos (H-9,9') tiveram dupletos ($J = 14,5$ Hz) localizados em 4,74 ppm e 4,56 ppm.

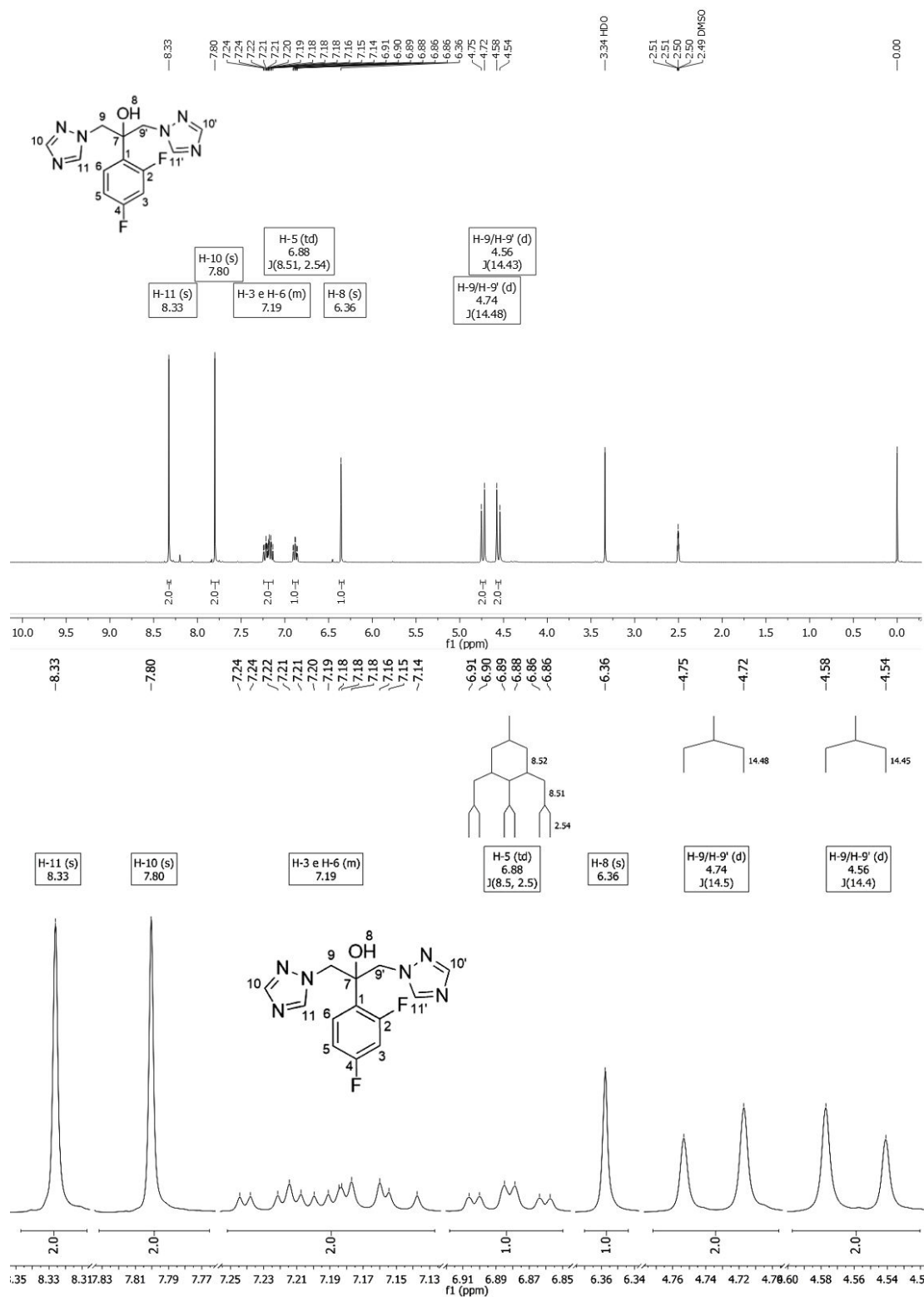


Figura 6. Espectro de RMN ^1H , completo e expandido, (400 MHz, DMSO D_6) do fluconazol sintetizado neste trabalho

A espectroscopia de RMN de ^{13}C mostrou sinais bastante característicos da presença de átomos de flúor na estrutura (Figura 7). C-2 e C-4 geraram dois duplos dupletos ($J = 247\text{ Hz}$, $12,5\text{ Hz}$) em $161,4$ e $158,5\text{ ppm}$, respectivamente. Os carbonos C-1, C-3, C-5 e C-6 apresentaram-se como duplos dupletos com diferentes constantes de acoplamentos.

Já C-7 e C-9/9' puderam ser observados como dois dupletos com ($J = 5\text{ Hz}$) em $73,0$ e $54,3\text{ ppm}$, respectivamente.

O espectro de RMN ^{19}F mostrou os dois sinais referentes a F-2 e F-4, os quais geraram multipletos em $-111,4$ e $-107,4\text{ ppm}$ devido ao acoplamento com os núcleos de hidrogênio presentes na molécula (Figura 8).

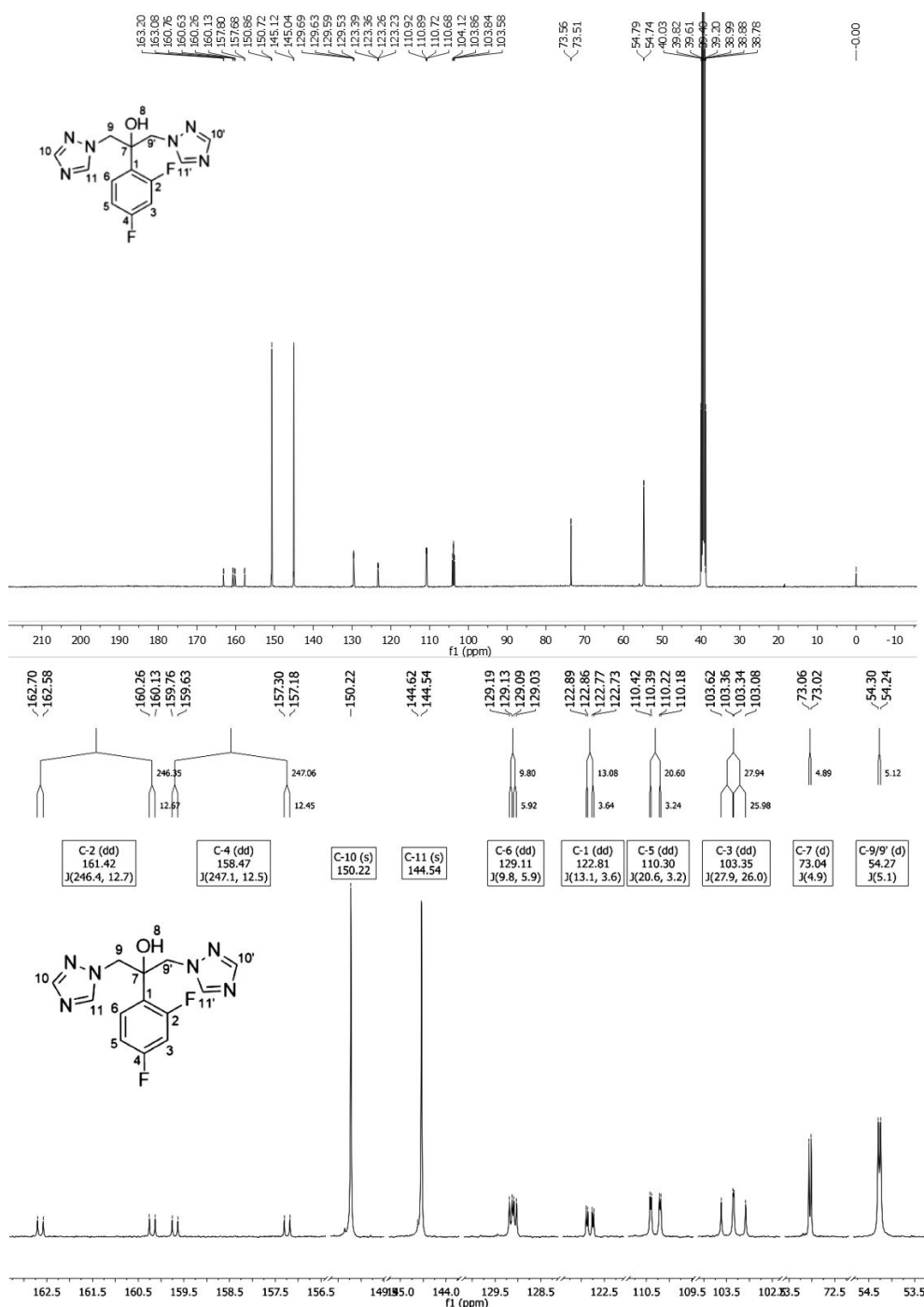


Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C , completo e expandido, (100 MHz, DMSO D_6) do fluconazol sintetizado neste trabalho

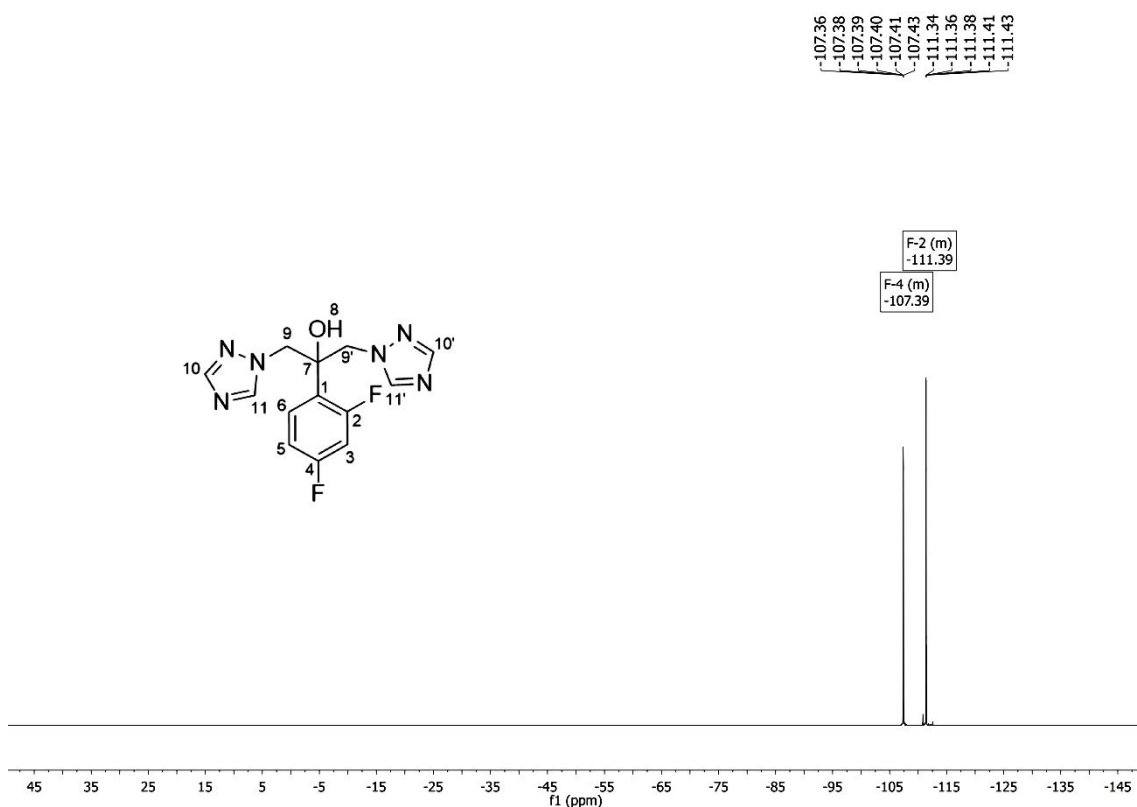


Figura 8. Espectro de RMN de ^{19}F (377 MHz, DMSO D_6) do fluconazol sintetizado neste trabalho

O espectro de massas por ionização por elétrons mostrou fragmentos compatíveis com a estrutura do fluconazol, tal como formação do íon de m/z 82 referente à perda do triazol com o grupo metileno e geração do pico base (m/z 224) e posterior rearranjo para o íon acílio (m/z 141), além da formação do íon de m/z 127 pelo rearranjo do íon benzílio, conforme pode ser observado na proposta de mecanismo de fragmentação apresentada na Figura 9. O espectro de massas por ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI(-)) mostrou a presença do íon *quasi*-molecular m/z 305,16.

Os espectros nas regiões do

infravermelho e do ultravioleta, e o ponto de fusão foram compatíveis com os apresentados na literatura.²⁴

A pureza do fluconazol sintetizado foi determinada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV). O método utilizado foi o descrito pela Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia* - USP).²¹ A pureza determinada foi de 96%, estando acima do preconizado pela USP (>90%), o que mostra que a substância é qualificada para atender a etapa de formulações farmacêuticas (Figura 10).

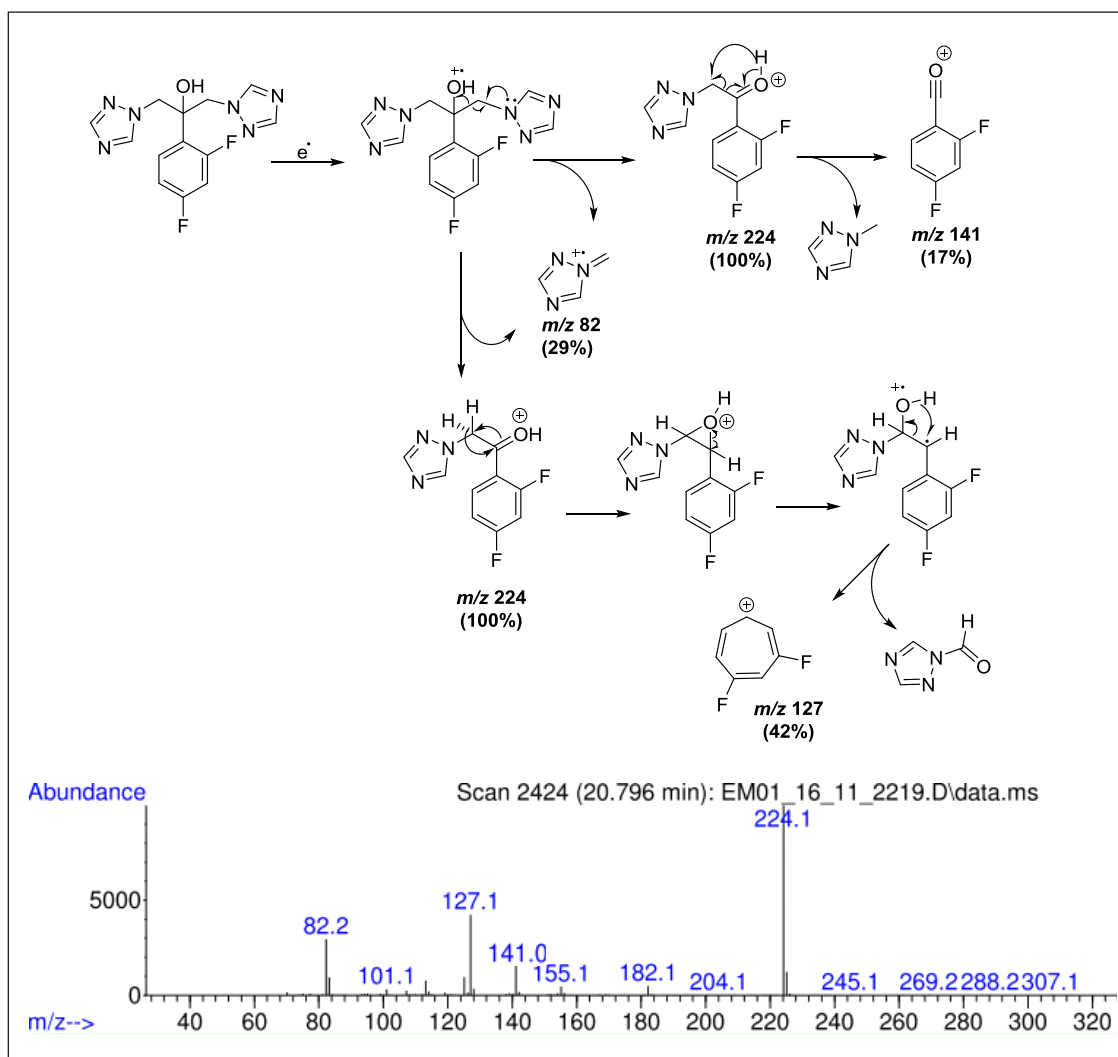
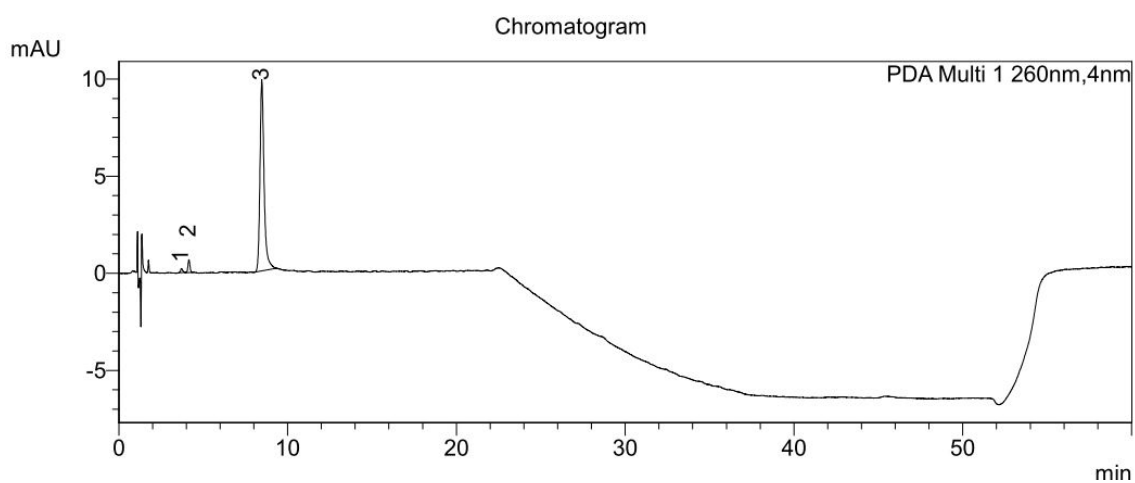


Figura 9. Espectro de massas por ionização por elétrons do fluconazol sintetizado neste trabalho



PDA Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%
1	3,72		1702	1,0
2	4,15		5278	3,0
3	8,47	Fluconazol	167735	96,0
Total			174715	100,0

Figura 10. Cromatograma (CLAE-UV) do fluconazol sintetizado neste trabalho

3. Conclusão

Baseado na rota sintética desenvolvida originalmente por Richardson para a obtenção do fluconazol e em outros trabalhos descritos na literatura, foi desenvolvido um processo sintético otimizado para a obtenção deste fármaco, composto por três etapas, em escala de gramas. Através deste, foi possível obter o fluconazol, com pureza adequada para a produção do IFA, em um rendimento global de aproximadamente 53%, que é cerca de 10 vezes superior ao processo original. Além disso, este processo oferece outras vantagens por apresentar métodos fáceis e eficientes de purificação dos intermediários e do produto final e fazer o uso de reagentes e solventes de menor custo e melhor aplicação em escala industrial, sendo disponibilizado ao Brasil o domínio da tecnologia para a produção deste fármaco.

Este processo otimizado de síntese do fluconazol abre a perspectiva de preparação de novos análogos ou derivados como possíveis inibidores da CYP51 de diversos micro-organismos, tais como os tripanossomatídeos que causam a leishmaniose, doença de Chagas e a doença do sono.¹⁸

4. Parte Experimental

Instrumentação, solventes e reagentes

Nas cromatografias em camada fina (CCF) foi utilizada a cromatofolha Merck® Kieselgel 60 F₂₅₄ em sistema de eluição correspondente especificado com revelação em luz ultravioleta de ondas curtas e longas (254 e 366 nm).

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada utilizando o cromatógrafo Agilent® modelo 6890 com o módulo de massas Agilent® modelo 5973 a 70 eV. Os valores das fragmentações e íon molecular estão expressos em relação massa/carga (m/z). A coluna usada foi a Agilent® 122-5532 DB-5MS (5% difenil:95% dimetilpolisiloxano). As corridas foram realizadas com volume de injeção de 1.000 µL, utilizando a rampa de temperatura de 50 °C a 350 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min. e hélio como gás de arraste.

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) de alta resolução foi realizada em equipamento MicroToF Bruker Daltonics em modo positivo ou negativo. Os valores estão expressos em relação massa/carga (m/z) e são equivalentes à massa molecular da substância mais (ESI-MS(+)) ou menos (ESI-MS(-)) um próton.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram adquiridos em dois aparelhos Bruker® Avance, um de 500 MHz e outro de 400 MHz para ¹H, 100 ou 125 MHz para ¹³C e 377 MHz para ¹⁹F conforme discriminado no experimental de cada substância analisada. Foi utilizado tetrametilsilano como referência para ¹H e ¹³C em 0 ppm. Os deslocamentos estão atribuídos em unidades adimensionais δ, expressos em partes por milhão (ppm). A

multiplicidade de cada sinal seguiu a seguinte escala: s – simpleto, d – duplete, t – tripleto, dd – duplo duplete, td – triplo tripleto, sl – sinal largo e m – multiplete. Os arquivos com os sinais *fid* foram editados com programa MestReNova[®] versão cortesia de demonstração 9.0.2 (© 2014 Mestrelab Research S. L., Santiago de Compostela, Espanha).

As amostras analisadas por espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram feitas por refletância, diluídas em brometo de potássio (KBr), utilizando o espectrofotômetro Shimadzu[®], modelo IR Prestige-21. Os valores correspondentes são expressos em número de ondas em centímetro recíproco (cm⁻¹).

As faixas de fusão das substâncias foram determinadas no aparelho Büchi[®] B-545 e não foram corrigidas.

Os solventes usados foram adquiridos da Merck[®], Tedia[®] ou J.Baker[®] e não sofreram tratamento adicional.

Os reagentes usados foram adquiridos da Vetec[®], Merck[®], Acros Organics[®], ou Sigma-Aldrich[®] e foram usados sem purificação adicional.

Síntese do intermediário 2-cloro-1-(2,4-difluorfenil)etanona (2). A um balão foi adicionado 50 g (0,44 mol) de 1,3-difluorbenzeno e resfriado a 0 °C e foram gotejados 49,5 g (1 eq.) de cloreto de α -cloroacetila. O meio foi mantido em agitação por 15 minutos nesta temperatura. Em seguida, foi adicionado 61,4 g (1,05 eq.) de AlCl₃ em porções, sendo a mistura agitada por 1,5 hora a 10 °C e por mais 30 minutos a 40 °C. O meio de reação foi vertido em uma mistura de gelo (300 g) e solução de HCl concentrada (37%) previamente resfriada. O meio foi mantido em agitação por cerca de 5 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi extraída 3 vezes com 100 mL de éter etílico. As fases orgânicas foram combinadas e lavadas 2 vezes com solução saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e concentrada no evaporador rotatório,

forneendo o produto com pureza suficiente para a próxima etapa. Massa obtida: 80,5 g / Rendimento: 97%. **RMN ¹H** (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,01 (td, J = 8,7, 8,6, 6,7 Hz, 1H), 7,48 (ddd, J = 11,6, 9,3, 2,3 Hz, 1H), 7,28 (dddd, J = 8,8, 8,0, 2,5, 0,8 Hz, 1H), 5,05 (d, J = 2,6 Hz, 2H). **CG-EM:** tempo de retenção: 9,9 min. m/z 142 (7%), m/z 141 (100%), m/z 127 (6%), m/z 114 (2%), m/z 113 (26%). **Faixa de fusão:** 46-47 °C (Lit.: 46-48 °C)²²

Síntese do intermediário 1-(2,4-difluorfenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etanona (3). A um balão foram adicionados 50 g (0,22 mol) do intermediário **2**, 31 g (3 eq.) de 1,2,4-triazol, 33,4 g (1,1 eq.) de K₂CO₃, 1 mL de solução de TBMAC (75%) e 350 mL de diclorometano. A reação foi mantida em agitação por 7 horas. Ao final, foi adicionado 10 mL de solução de HCl concentrado (37%) e o meio extraído com 150 mL de água até total remoção do produto da fase orgânica. A fase aquosa foi neutralizada e o produto extraído com 250 mL de diclorometano. O produto foi seco no evaporador rotatório e recristalizado em etanol. Massa obtida: 48,0 g / Rendimento: 82%. **RMN ¹H** (400 MHz, Clorofórmio-d) δ 8,21 (s, 1H), 8,05 (td, J = 8,6; 8,5; 6,4 Hz, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,06 (ddd, J = 9,3; 7,5; 2,4 Hz, 1H), 6,98 (ddd, J = 11,0; 8,4; 2,4 Hz, 1H), 5,59 (d, J = 3,5 Hz, 2H). **CG-EM:** Tempo de retenção: 15,9 min. m/z 223, m/z 195 (3%) m/z 142 (7%), m/z 141 (100%), m/z 127 (2%), m/z 113 (24%). **Faixa de fusão:** 104-105 °C (Lit.: 104-105 °C)²³

Síntese do Fluconazol. A um balão foram adicionados 1 g (0,22 mol) do intermediário **3**, 1,2 g (1,2 eq.) de iodeto de trimetilsulfoxônio, 372 mg (1,2 eq.) de 1,2,4-triazol, 710 mg (2,4 eq.) de hidróxido de potássio, 4 mL de água destilada e 4 mL de etanol. A reação foi mantida em agitação sob refluxo por 1 hora. O produto foi então concentrado à vácuo e recristalizado com 5 mL de uma solução contendo 4 mL de água destilada, 0,5 mL de acetato de etila e 0,5 mL de acetona. A mistura foi mantida em refrigeração a 4 °C por 12 horas e o

precipitado formado foi filtrado à vácuo, sendo obtido um sólido levemente amarelado. O processo de recristalização foi repetido e o sólido obtido foi solubilizado em etanol e tratado com carvão ativo sob agitação por 1 hora a 60 °C. Após filtração a solução foi concentrada à vácuo gerando um sólido branco. Massa obtida: 880,0 mg / Rendimento: 66%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,33 (s, 1H); 7,80 (s, 1H); 7,29 – 7,09 (m, 1H); 6,88 (td, *J* = 8,5; 2,5 Hz, 1H); 6,36 (s, 1H); 4,74 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H); 4,56 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 161,42 (dd, *J* = 246,4; 12,7 Hz), 158,47 (dd, *J* = 247,1; 12,5 Hz), 150,22; 144,54; 129,11 (dd, *J* = 9,8; 5,9 Hz); 122,81 (dd, *J* = 13,1; 3,6 Hz); 110,30 (dd, *J* = 20,6; 3,2 Hz); 103,35 (dd, *J* = 27,9; 26,0 Hz); 73,04 (d, *J* = 4,9 Hz); 54,27 (d, *J* = 5,1 Hz). **RMN ¹⁹F** (376 MHz, DMSO-d₆) δ -103,92 – -109,05 (m), -109,87 – -112,66 (m). **CG-EM**: Tempo de retenção: 20,8 min. *m/z* 82,20 (29%); 127,10 (42%); 141,05 (17%); 224,10 (100%); 225,10 (12%). **ESI-MS (-)**: *m/z* 305,16. **IV**: *v* (cm⁻¹) /estiramento: 3.102 (O-H), 3.050 (C-H_{ar}), 1504 (C_{ar}-C_{ar}), 1.139 (C-OH), 1.275 (C-F). **UV**: λ_{max} 261 nm. **Pureza CLAE-UV**: 96%. Tempo de retenção: 8,47 min. Fase móvel: água e acetonitrila (4:1), detector: 261 nm, coluna: 4.6-mm × 15-cm; 5-μm, temperatura: 40 °C, taxa de fluxo: 1,5 mL/min, volume da injeção: 50 μL. **Faixa de fusão**: 137-139 °C (Lit.: 138-140 °C)²⁴

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de fomento CNPq, FAPERJ e FIOCRP pelo apoio financeiro, à Fundação Oswaldo Cruz e à Farmanguinhos pelo apoio e ao Eng. Walter Trajano pela consultoria técnica.

Referências Bibliográficas

¹ Bergold, A. M.; Georgiadis, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão Acadêmica* **2004**, *5*, 159. [Link]

² Costa, A. C. B. P.; Pereira, C. P.; Jorge, A. O. C.; *Microbiologia e Imunologia Oral*. Elsevier: Rio de Janeiro, 2012

³ Abreu, J. A. S.; Rovida, A. F. S.; Pamphile, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. *Uningá Review* **2015**, *21*, 55. [Link]

⁴ Lopes, F. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. [Link]

⁵ Silbert, S.; *Microbiologia Médica*. Elsevier: Rio de Janeiro, 2014.

⁶ Ryan, K. J. *Sherris medical microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*. McGraw-Hill Companies: New York, 2004.

⁷ Moraes, A. M. L.; Paes, R. A.; Holanda, V. L. Micologia. In: Molinaro, E. M.; Caputo, L. F. G.; Amendoeira, M. R. R. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. EPSJV/IOC: Rio de Janeiro, 2014.

⁸ Oliveira, J. C. *Tópicos em micologia médica*. 4ª ed. Fundação Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro, 2014.

⁹ Maffei, C. M. L. *Agentes antifúngicos*. Disponível em: <<http://rbp.fmrp.usp.br/sites/default/files/antifungicos.pdf>> Acesso em: 18 outubro 2016.

¹⁰ Agência Nacional De Vigilância Sanitária (Anvisa). *Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audemicrobiologia/mod_7_2004.pdf> Acesso em: 18 outubro 2016.

¹¹ Heeres, J.; Meerpoel, L.; Lewi, P. Conazoles. *Molecules* **2010**, *15*, 4129. [CrossRef] [PubMed]

¹² Pereira, D. G. Importância do Metabolismo no Planejamento de Fármacos. *Química Nova* **2007**, *30*, 171 [CrossRef]

¹³ Ministério Da Saúde Do Brasil. *Protocolo de assistência farmacêutica em DST/HIV/AIDS*. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_assistencia_farmacutica_aids.pdf> Acesso em: 23 outubro 2016.

¹⁴ Richardson, K.; U.K. Patent 2099818A, **1982**.

¹⁵ Richardson, K.; U.S. Patent 4404216, **1983**.

- ¹⁶ Narayanan, A.; Chapman, D. R.; Upadhyaya, S. P.; Bauer, L. Conversion of 4-amino-4H-1,2,4-triazole to 1,3-bis(1H-azol-1-yl)-2-aryl-2-propanols and 1-phenacyl-4-[(benzoyl or 4-toluenesulfonyl)-imino]-(1H-1,2,4-triazolium) Ylides. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1993**, *30*, 1405. [CrossRef]
- ¹⁷ Kim, Y. F.; Yoon, G. J. S.; Park, M. H. H; *WO Patent 1998032744 A1*, **1998**.
- ¹⁸ Castelo-Branco, F. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.
- ¹⁹ Bartroli, J.; Turmo, E.; Alguero, M.; Boncompte, E.; Vericat, M. L.; García-Rafanell, J.; Forn, J. Synthesis and antifungal activity of new azole derivatives containing an N-acylmorpholine ring. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 38, p. 3918-3932, 1995. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Chandrasekhar, B.; Sridharan, R.; Pillai, B. K. G.; Bhirud, S. B.; *U. S. Patent 2005/0282878 A1*, **2005**.
- ²¹ United States Pharmacopeia (USP), Revision Bulletin Official October 1, 2010. Disponível em: <http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/fluconazoleTabletsA.pdf> Acesso em: 12 dezembro 2016
- ²² Upadhyaya R. S.; Jain S.; Sinha N.; Kishore N.; Chandra R.; Arora S. K. Synthesis of novel substituted tetrazoles having antifungal activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *39*, 579. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Aher, N. G.; Pore, V. S.; Mishra, N. N.; Kumar, A.; Shukla, P. K.; Sharma, A.; Bhat, M. K. Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009, *19*, 759. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Kastelic, J.; Hodnik, Z.; Sket, P.; Plavec, J.; Lah, N.; Leban, I.; Pajk, M.; Planinsek, O.; Kikelj, D. Fluconazole Cocrystals with Dicarboxylic Acids. *Crystal Growth & Design* **2010**, *10*, 4943. [CrossRef]