



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



# **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO: Estudos para a obtenção de palmitato de taurina**

Pedro Malatesta Procopio de Araujo

Araraquara  
2011

Pedro Malatesta Procopio de Araujo

# **Estudos para Obtenção de Palmitato de Taurina**

## Monografia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin

Araraquara  
2011

## **DEDICATÓRIA:**

Ao meu avô Roque Malatesta, quem auxiliou em minha criação nas fases iniciais de minha vida. Até hoje ainda guardo um carinho e admiração enormes por ele, que atuou como um verdadeiro pai para mim, e tento fazer, onde quer que ele esteja, que fique o mais orgulhoso possível.

À minha mãe, Meli, por sempre ter se preocupado ao máximo com a minha formação pessoal e profissional, e por sempre ter sido uma grande amiga, me apoiando e incentivando em todas as decisões que já tomei. Mãe, obrigado por sempre ser essa mulher tão maravilhosa para mim, vou fazer de tudo para realizar seu sonho e me tornar um profissional qualificado e respeitado, pelo que você sempre lutou.

## **AGRADECIMENTOS:**

À minha orientadora, Profª. Dra. Chung Man Chin, por sempre ter acreditado em meu potencial e por ter participado não só da orientação deste trabalho mas também me orientando e me dando apoio para diversas outras decisões que tomei e terei que tomar, tanto no âmbito acadêmico como no profissional.

Ao Renato, quem me ajudou na fase de criação e desenvolvimento do projeto o qual consta neste trabalho, e quem também me auxiliou em meu estágio de treinamento no Lapdesf.

Aos técnicos do Lapdesf, Osmar e Mateus, que sempre estiveram dispostos a auxiliar principalmente nas metodologias analíticas que este trabalho envolveu, e com quem compartilhei momentos de descontração que com certeza funcionam como uma motivação para o melhor desenvolvimento do trabalho.

A todo o pessoal do Lapdesf: Jean, Paulo, Ednir, Priscila, José Ricardo, Rafael, Thaís, João Pedro, Leandro, Alberto, Renata, Arthur, Gustavo, Ariane e Fabiana, que certamente fazem com que as atividades no laboratório sejam mais prazerosas e menos desgastantes.

Finalmente, aos meus irmãos da República Diretoria: Mateus, Vitor, Michel, Allan, Tomasz, Lucca, Pedro, José Paulo, Jan, Federico, Alexandre, Thiago, Fernando, Ariel e Felipe, por me ensinarem cada vez mais como é importante conviver em grupo e por participarem de diversos momentos de alegria e descontração durante minha graduação.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1. Ações biológicas da taurina e derivados envolvidos.....	17
3.1.1. Ações no Sistema Nervoso Central.....	17
3.1.2. Osmorregulação/ atividade muscular.....	18
3.1.3. Atividade anti-inflamatória/ modulação do sistema imune.....	19
3.1.4. Efeito anti-envelhecimento.....	20
3.1.5. Redução do colesterol.....	21
3.1.6. Leite materno.....	21
3.1.7. Retina.....	21
3.1.8. Ácidos nucleicos.....	24
3.1.9. Cardiovascular.....	25
3.1.10. Apoptose.....	26
3.1.11. Efeito ergogênico.....	26
3.1.12. Termorregulação.....	27
3.1.13. Receptores putativos e antagonistas da taurina.....	28
3.1.14. Promoção da formação de sais biliares.....	28
3.1.15. Efeito anti-alcool.....	29
3.1.16. Efeito antidiabetes.....	30

3.1.17. Atividade antimicrobiana.....	31
3.2. Sínteses descritas na literatura de derivados da taurina.....	32
3.2.1. Síntese da N-pivaloil taurina.....	32
3.2.2. Síntese da $\gamma$ -L-glutamiltaurina.....	33
3.2.3. Síntese da taltrimida e seus derivados ftalimídicos.....	34
3.2.4. Método flexível para síntese de derivados substituídos da taurina .....	35
3.2.5. Síntese de derivados da taurina pelo método “safety-catch”.....	39
3.2.6. Síntese das quinoniltaurinas.....	42
3.3. Derivados graxos da taurina e síntese de amidas graxas.....	44
4. DESENVOLVIMENTO.....	50
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
5.1. Materiais de síntese.....	51
5.2. Métodos de síntese.....	51
5.3. Métodos de purificação.....	52
5.4. Métodos analíticos.....	53
5.4.1. Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	53
5.4.2. Faixa de fusão.....	53
5.4.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) .....	53
5.4.4. Espectrometria de massas.....	53
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
6.1. Considerações gerais e mecanismo de reação.....	54
6.2. Observações durante o desenvolvimento do experimento e respectivas discussões.....	57
6.3. Resultados dos procedimentos analíticos.....	59

6.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	59
6.3.2. Faixa de fusão.....	60
6.3.3. Espectofotometria de absorção no infravermelho (IV).....	60
6.3.4. Espectometria de massas.....	63
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
9. ANEXO A.....	74

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Esqueleto básico da taurina (modificado de Gupta, Win e Bittner, 2005).....	16
<b>Figura 2</b> - Estrutura-base dos derivados ftalimídicos da taurina.....	18
<b>Figura 3</b> - Derivados da taurina e homotaurina (n = 5 ou 7). Somente o primeiro (à esquerda) demonstrou atividade osmoregulatória (modificado de GUPTA, WIN E BITTNER, 2005, p. 2028).....	19
<b>Figura 4</b> - Análogos da taurina com atividade anti-inflamatória (taurina cloramina, a esquerda) e no sistema imune (TAU 15 e TAU 60, a direita).....	20
<b>Figura 5</b> - Estrutura da tauromustina.....	25
<b>Figura 6</b> - Análogos da taurina com atividade cardíaca (FRANCONI et al., 1986).....	26
<b>Figura 7</b> - Ácidos trans- e cis- 2-aminociclohexanosulfônico (TAHS e CAHS).....	27
<b>Figura 8</b> - Tentativas de modificação na estrutura do TAG (modificado de Gupta, Win e Bittner, 2005, p. 2023).....	28
<b>Figura 9</b> - Derivados da taurina com que atuam como sais biliares.....	29
<b>Figura 10</b> - Estruturas do acamprosato e homotaurina.....	30
<b>Figura 11</b> - Exemplo de N- Acil Taurina encontrada conjugada com FAAH em fígado e rins de ratos. Consiste de uma cadeia carbônica poliinsaturada.....	45
<b>Figura 12</b> - Possibilidades de surfactantes derivados de aminoácidos (modificado de Nnanna & Xia, 2001).....	46
<b>Figura 13</b> - Ácido 2-(palmitamido)etanossulfônico.....	51



<b>Figura 14</b> - Fragmentações moleculares do ácido 2-palmitamidoetanossulfônico obtidas em espectrometria de massa.....	64
--	----

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> - Biossíntese da taurina (modificado de Devlin, 2007).....	14
<b>Esquema 2</b> - Hidrólise da taurolidina formando moléculas com atividade antibacteriana (modificado de Caruso <i>et al.</i> , 2010, p. 2).....	32
<b>Esquema 3</b> - Reação de síntese da N-pivaloiltaurina.....	33
<b>Esquema 4</b> - Síntese da taltrimida e outros derivados ftalimídicos da taurina (modificado de USIFOH et al., 2001, p. 324).....	35
<b>Esquema 5</b> - Síntese de tiazolidina-2-tionas para obtenção de derivados substituídos da taurina pelo método A (modificado de CHEN, JIA & XU, 2009, p. 5842).....	36
<b>Esquema 6</b> - Síntese de tiazolidina-2-tionas para obtenção de derivados substituídos da taurina pelo método B (modificado de CHEN, JIA & XU, 2009, p. 5842).....	36
<b>Esquema 7</b> - Síntese de tiazolidina-2-tionas para obtenção de derivados substituídos da taurina pelo método C (modificado de CHEN, JIA E XU, 2009, p. 5842).....	37
<b>Esquema 8</b> -Obtenção de tiazolidinas-2-tionas bicíclicas partindo de amino álcoois cíclicos (modificado de CHEN, JIA E XU, 2009, p. 5844).....	38
<b>Esquema 9</b> - Oxidação das tiazolidina-2-tionas gerando taurina e seus derivados substituídos (modificado de CHEN, JIA E XU, 2009, p. 5844).....	38

<b>Esquema 10</b> - Síntese do 4-(tert-butilsifenilsilanoxi)-2,2-dimetilbutil-etanosulfonato- geração do etanosulfonato protegido (modificado de Seeberger et al., 2006, p. 133).....	39
<b>Esquema 11</b> - Reação do etanosulfonato protegido (1) com as amins secundárias e desproteção para obtenção de derivados da taurina (modificado de SEEBERGER et al., 2006, p. 133).....	40
<b>Esquema 12</b> - Esquema representando a formação das quinonil-taurinas 1-6b a partir da reação das quinonas 1-6a com taurina (modificado de Gorohovisky et al., 2002).....	43
<b>Esquema 13</b> - Esquema geral do emprego do método de Schotten-Baumann para a síntese de amidas graxas.....	47
<b>Esquema 14</b> - Mecanismo de reação e formação do ácido 2-palmitamidoetanossulfônico (palmitato de taurina).....	56
<b>Esquema 15</b> - Mecanismo de hidrólise do cloreto de palmitoíla.....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – derivados da taurina com atividade inibitória sob a fosforilação de proteínas da retina de ratos (modificado de LOMBARDINI & PROPS, 1991).....	23
<b>Tabela 2</b> – Substituintes das amins secundárias utilizadas e respectivos produtos (modificado de SEEBERGER et al., 2006).....	41
<b>Tabela 3</b> - Principais sínteses de amidas graxas e respectivas metodologias.....	49

## **LISTA DE ESPECTROS**

<b>Espectro 1</b> - Espectroscopia de absorção no IV do ácido 2-palmitamidoetanossulfônico.....	61
<b>Espectro 2</b> - Espectro do produto obtido com a rotaevaporação da fase orgânica.....	62
<b>Espectro 3</b> - Espectro de massas do ácido 2-palmitamidoetanossulfônico.....	63

## RESUMO

A taurina (ácido 2-etanoaminossulfônico) apresenta diversas funções fisiológicas, como atuação no neurodesenvolvimento, ação no coração contra arritmias, ação nos músculos esqueléticos contra atrofia, faz parte da bile na forma de um composto conjugado, constituindo um dos sais biliares, e anti-inflamatória, inibindo mediadores pró-inflamatórios. Neste projeto a ênfase foi voltada para a ação anti-oxidante da taurina, que forma um complexo com espécies como o ácido hipocloroso (HOCl) e ânions clorito (OCl<sup>-</sup>) que potencialmente possuem ações danosas à célula. Esse complexo, a taurina cloramina (Tau-Cl), possui também ações contra mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o óxido nítrico (NO).

Por ser uma molécula com alta polaridade e hidrossolubilidade, a taurina não consegue penetrar na pele pelo extrato córneo intacto, a camada mais externa da pele, que constitui sua barreira contra perda ou absorção de água e eletrólitos. Foi feita então a síntese de um pró-fármaco derivado da taurina, formado por seu acoplamento com uma cadeia carbônica longa, aumentando significativamente a lipossolubilidade em relação a taurina pura, e podendo assim, essa molécula, transpor o extrato córneo intacto e exercer sua ação anti-oxidante, podendo ser, portanto, caracterizado como um pró-ativo. Este pró-fármaco, o ácido 2-palmitamidoetanossulfônico, foi sintetizado por meio de uma reação entre um cloreto de acila (cloreto de palmitoíla) e taurina, utilizando trietilamina como base, por meio de um método conhecido por Schotten-Baumann. O produto formado foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD), faixa de fusão, espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) e espectrometria de massa (EM), sendo que todas as análises confirmaram que a síntese foi bem sucedida.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**CDO** - Cisteína dioxigenase

**CSAD** - Cisteína ácido sulfínico descarboxilase

**GABA** – Ácido gama-aminobutírico

**Cl<sup>-</sup>** - Íon cloreto

**TauT** – Transportador de taurina

**Tau-Cl** – Taurina cloramina

**MPO** - Mieloperoxidase

**TNF-alfa** – Fator de necrose tumoral alfa

**EROs** – Espécies reativas de oxigênio

**Ca<sup>+2</sup>** – Íon cálcio

**TAPS** - Ácido trans-2-aminociclopentassulfônico

**THQS** – Ácido 1,2,3,4-tetrahydroquinolina-8-sulfônico

**IC<sub>50</sub>** – Concentração necessária para produzir uma inibição de 50%

**RNA<sub>t</sub>** – RNA transportador

**PMNs** - Polimorfonucleares

**IL** - Interleucina

**FasL** – Ligante de Fas

**TAHS** - Ácido trans-2-aminociclohexanosulfônico

**CAHS** - Ácidos cis- 2-aminociclohexanosulfônico

**TAG** - 6-aminometil-3-metil-4H-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido

**UDCA** - Ácido ursodeoxicólico

**TUDCA** - Ácido ursodeoxicólico conjugado com taurina

**CUDCA** – Análogo do ácido ursodeoxicólico com anel ciclopropílico

**NMDA** – Ácido N-metil-D-aspartico

**FAAH** - Ácido graxo amida hidrolase

**NAEs** - N-acil etanolaminas

**NAT** – N-acil-aurina

**TRP** - Canais de cálcio de potencial receptor transiente

**logP** – logaritmo do coeficiente de partição óleo-água

**ClogP** – logP calculado

**Ph** – potencial hidrogeniônico

**CCD** – Cromatografia em camada delgada

**IV** – Infravermelho

**ESI** – Spray de elétrons

**NaCl** – Cloreto de sódio

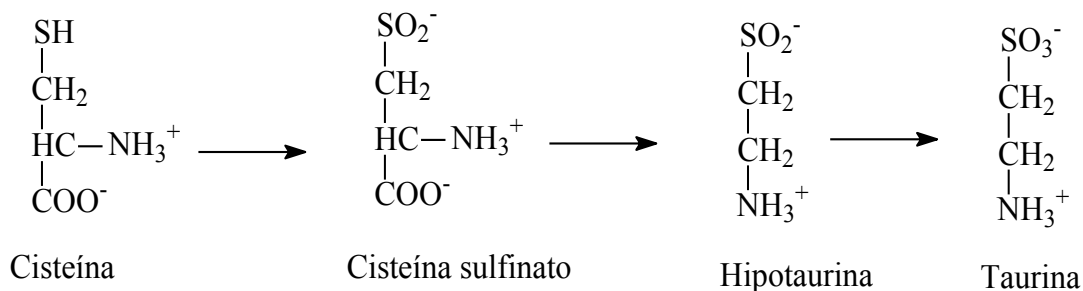
**Rf** – Fator de retenção

# 1) INTRODUÇÃO

A taurina (ácido 2-etanoaminossulfônico) é um aminoácido sulfurado não essencial livre, sendo um composto final do metabolismo dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína). Se encontra conjugada com ácidos biliares de sódio e potássio, resultando na formação do ácido taurocólico, um dos ácidos da bile alcalina, essencial para a absorção de gorduras (GANONG, 2006). No organismo este aminoácido encontra-se principalmente na musculatura esquelética, no sistema nervoso central (SNC) e no fígado.

A maior parte da taurina encontrada em mamíferos e outros animais é proveniente de fontes exógenas. A maioria destes animais perdem a habilidade de sintetizar taurina durante seu desenvolvimento. (GUPTA, WIN & BITTNER, 2005)

Segue abaixo os passos da síntese de taurina no organismo a partir de cisteína (modificado de DEVLIN, 2007, p.753):



## ***Esquema 1: Biossíntese da taurina***

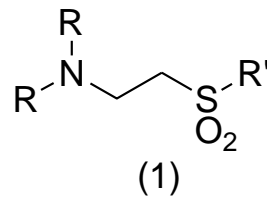
Foi comprovada a existência das enzimas envolvidas na reação acima em glândulas mamárias de ratas no período de gravidez e lactação (UEKI & STIPANUK, 2007). A conversão

de cisteína em cisteína sulfinato é catalizada pela enzima cisteína dioxigenase (CDO), sendo que a conversão de cisteína sulfinato em hipotaurina é catalizada pela cisteína ácido sulfínico descarboxilase (CSAD) (STIPANUK, 2004, UEKI & STIPANUK, 2007).

Diversos análogos de taurina vêm sendo desenvolvidos, no intuito de se obter moléculas que possam apresentar as atividades biológicas da taurina, mas com características farmacocineticamente melhoradas. A importância em melhorar tais características é devido a alguns fatores: a taurina, sendo um aminoácido, apresenta uma absorção gastrointestinal dependente de mecanismos de transporte ativo ; é caracterizada por uma baixa taxa de difusão passiva; é facilmente eliminada na urina devido ao seu forte caráter polar. Portanto, mesmo a taurina possuindo uma grande atividade no SNC, por exemplo, esta atividade requer uma dose maior de taurina por via oral para ser observada (GUPTA, WIN & BITTNER, 2005). Outros estudos indicam que administrações locais de taurina no SNC, como a intracerebroventricular, parecem ser mais eficazes para teste de seus derivados (FROSINI *et al.*, 2006).

Um estudo de caráter compilativo da taurina descreve algumas características que devem estar presentes nos derivados da taurina para manutenção de sua atividades. De acordo com este estudo, todos os derivados devem preservar a cadeia metilênica de dois carbonos na estrutura, ligados a um grupo sulfônico e a um grupo amino, de preferência primário (figura 1, estrutura 1). Estes grupos devem estar diretamente ligados a cadeia metilênica, sendo que a substituição desta leva a uma queda na atividade. A ligação de pequenos grupos alquílicos aos grupamentos amino e sulfônico é preferível. É também explicado que derivados cíclicos da taurina podem possuir uma boa atividade (GUPTA, WIN & BITTNER, 2005).





*Figura 1 – Esqueleto básico da taurina (modificado de Gupta, Win e Bittner, 2005)*

## 2) OBJETIVOS

### 2.1) Objetivo geral

Sintetizar um pró-fármaco pela reação da taurina com o ácido palmítico em sua forma clorada para obter o palmitato de taurina, conferindo a taurina um maior caráter lipofílico, o que permitirá sua aplicação tópica para desempenhar um efeito antioxidante.

### 2.2) Objetivos específicos

- Realização de um levantamento bibliográfico sobre ações da taurina e derivados envolvidos, síntese de derivados da taurina e sobre amidas graxas, culminando com a escolha de uma metodologia sintética;
- Síntese do palmitato de taurina (ácido 2-palmitamidoetanossulfônico) através do método de Schotten-Baumann
- Purificação do produto através de uma extração líquido-líquido empregando como líquido extrator o acetato de etila
- Caracterização do produto através de CCD e revelação com ninidrina, faixa de fusão, espectroscopia de absorção no IV e espectrometria de massa

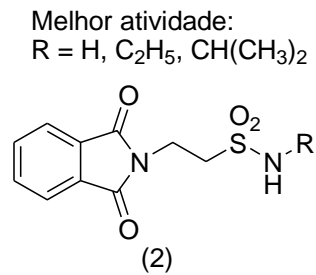
### 3) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1) Ações biológicas da taurina e derivados envolvidos

##### 3.1.1) Ações no Sistema Nervoso Central (SNC):

A taurina possui um importante efeito no desenvolvimento neuronal no período neonatal, pois é um neurotransmissor agonista pleno de receptores de glicina, promovendo o influxo de cálcio, que está relacionado como um fator trófico no desenvolvimento neuronal (WANG *et al.* 2004). Provavelmente a taurina também interage com receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA), modulando sua ação (GUPTA, WIN & BITTNER, 2005). De acordo com Oja & Saransaari (2007), altas concentrações de taurina causam um aumento GABA-induzido no fluxo de íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) em membranas sinápticas. Foi demonstrado que níveis baixos de taurina no período neonatal estão relacionados a um neurodesenvolvimento tardio (WHARTON, *et al.* 2004). Deve-se destacar também que foi demonstrada ação da taurina no tratamento da Doença de Alzheimer, prevenindo a neurotoxicidade gerada pela deposição de proteína beta-amilóide nos neurônios (LOUZADA, *et al.* 2004).

A atividade neurológica mais marcante da taurina é como anticonvulsivante. Diversos análogos da taurina vêm sendo sintetizados com base nesta atividade, que se dá devido a sua interação com o sítio de ligação do GABA. Um grupo de pesquisadores na Finlândia (LINDÉN *et al.*, 1983) sintetizaram e avaliaram a atividade de diversos 2-ftalimidoetano-sulfonamidas, derivados ftalimídicos mantendo o esqueleto básico da taurina (ver figura 1, estrutura 1). Observou-se neste estudo que os derivados com melhor atividade deveriam possuir pequenos grupos alquílicos. Dentre estes compostos, destaca-se os que apresentavam como substituinte um grupo metil, etil e isopropil (figura 2, estrutura 2).



**Figura 2 - Estrutura-base dos derivados ftalimídicos da taurina**

Em estudos posteriores envolvendo os derivados ftalimídicos da taurina com atividade anticonvulsivante, sua estrutura-base (figura 2) foi mantida (USIFOH *et al.*, 2001; AKGUL *et al.*, 2007).

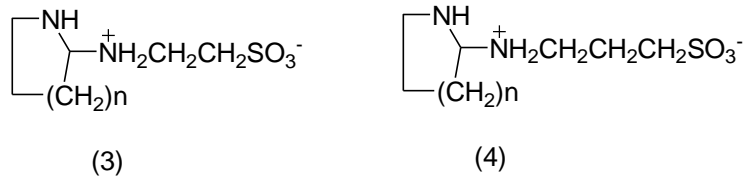
### 3.1.2) Osmorregulação/ atividade muscular:

A taurina é um importante osmólito utilizado na osmorregulação celular, comprovado por uma maior expressão de transportadores de taurina (TauT) em células submetidas a um ambiente hiperosmótico, como por exemplo em queratinócitos (JANEKE *et al.*, 2003) e em neurônios do hipocampo de ratos (OLSON & MARTINHO-JR, 2006).

Os músculos esqueléticos armazenam 70% da taurina de todo o organismo. Foi demonstrado aumento na expressão de TauT nos músculos em miogênese, e que a taurina promove resistência a atrofia muscular (UOZUMI *et al.*, 2006). Outros estudos indicam que a taurina provoca um aumento da condutância muscular a íons Cl<sup>-</sup> e regula a entrada de íons cálcio no retículo sarcoplasmático, modulando assim o mecanismo de contração muscular (GUPTA, WIN & BITTNER, 2005)

A atividade osmorregulatória de alguns compostos derivados de taurina e de homotaurina foi avaliada (figura 3, estruturas 3 e 4) , sendo comprovado que apenas os derivados de taurina

ocasionaram um aumento na condutância de íons  $\text{Cl}^-$  em músculos esqueléticos de ratos (GUPTA, WIN E BITTNER, 2005).

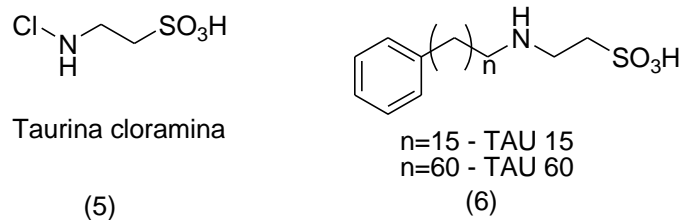


**Figura 3 – Derivados da taurina e homotaurina ( $n = 5$  ou  $7$ ). Somente o primeiro (estrutura 3) demonstrou atividade osmoregulatória (modificado de GUPTA, WIN E BITTNER, 2005, p. 2028)**

### 3.1.3) Atividade anti-inflamatória/ modulação do sistema imune

A taurina possui a capacidade de se ligar ao ácido hipocloroso (HOCl), formando taurina cloramina (Tau-Cl, figura 4). A formação de Tau-Cl é importante para evitar a ação danosa de HOCl e íons hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ), espécies cloradas reativas formadas nos neutrófilos, em processos inflamatórios crônicos. Essas espécies são formadas pela reação de íons cloreto com peróxido de hidrogênio, que é formado na mesma ocasião, sendo essa reação catalizada pela enzima mieloperoxidase (MPO), que também é liberada neste processo. Entre as ações danosas dessas espécies, pode-se destacar a oxidação de importantes moléculas localizadas na membrana plasmática como a ATPase e o colágeno, e outras como o DNA e nucleotídeos (AROUMA *et al.*, 1989; WHITEMAN *et al.*, 2003). Demonstrou-se outra importante ação da taurina, ainda se tratando de processos inflamatórios, que é a sua capacidade de, novamente formando o complexo Tau-Cl, inibir a expressão dos genes óxido nítrico sintase (iNOS) e do fator necrose tumoral (TNF-alfa), agentes pró-inflamatórios, pela diminuição na ativação de fatores de transcrição correspondentes a esses genes (BARUA, YONG & QUINN, 2001).

Os derivados da taurina TAU-15 e TAU-60 (figura 4, estruturas 5 e 6) possuem ação inibitória sob as reações imunes a antígenos timo-dependentes, o que se dá devido a diminuição na produção da interleucina (IL) 1 $\beta$ , que tem um efeito importante na apresentação de antígenos. TAU-15 também inibe a produção do TNF-alfa (SAPRONOV, KHNYCHENKO & POLEVSHCHIKOV, 2001)



**Figura 4 - Análogos da taurina com atividade anti-inflamatória (taurina cloramina, estrutura 5) e no sistema imune (TAU 15 e TAU 60, estrutura 6)**

#### 3.1.4) Efeito anti-envelhecimento

A concentração de taurina no baço, olhos, rins, cerebelo e no sangue diminui com a idade. A suplementação com taurina parece corrigir este declínio em animais experimentais. Fora isso, diversas doenças neurodegenerativas podem ser causadas por espécies reativas de oxigênio (EROs), sob as quais a taurina possui propriedades neutralizantes. Problemas de idade avançada também resultam da disponibilidade de glutathiona, com a qual a taurina compartilha o mesmo precursor, a cisteína, possuindo portanto propriedades similares (GUPTA, WIN & BITTNER, 2005). Neste sentido, é de grande utilidade o desenvolvimento de formulações cosméticas contendo análogos de taurina.

### 3.1.5) Redução do colesterol:

Foi demonstrado que em pacientes que recebem suplementação de taurina ocorre um menor aumento nos níveis de LDL e colesterol séricos quando eles são submetidos a uma dieta rica em gorduras, sendo que há um maior aumento nesses níveis em pacientes sem essa suplementação (MIZUSHIMA *et al.*, 1996).

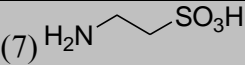
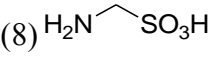
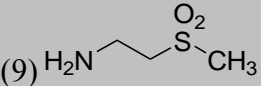
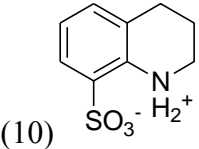
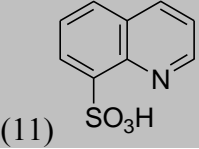
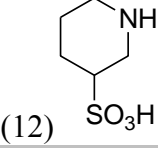
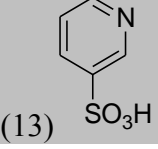
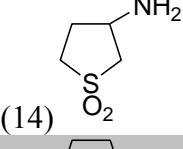
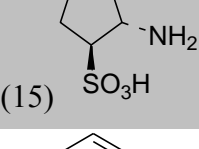
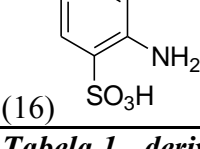
### 3.1.6) Leite materno:

É fundamental a presença de taurina no leite materno, pois, conforme dito antes, este aminoácido promove neurodesenvolvimento durante o período neonatal. Como citado anteriormente, um estudo indicou a presença de enzimas envolvidas na síntese de taurina, a partir do aminoácido cisteína, nas glândulas mamárias de ratas em período de gravidez e lactação (UEKI & STIPANUK, 2007, WANG *et al.* 2004, WHARTON, *et al.* 2004).

### 3.1.7) Retina

A taurina parece ser um elemento importante na retina de diversas espécies, tais como gatos, ratos e macacos (LOMBARDINI, 1991). A ação da taurina na retina parece envolver, de acordo com Lombardini (1991), três mecanismos: proteção do fotorreceptor, pelo efeito de blindagem sob os segmentos de haste exterior expostos a luz e substâncias químicas; regulação do transporte de  $\text{Ca}^{+2}$ , pelos seus efeitos modulatórios na presença ou não de ATP; e regulação da transdução de sinal, por seu efeito inibitório na fosforilação de proteínas. Estudo conduzido por Lombardini & Props (1997) comparou diversos análogos da taurina com base em seu efeito inibitório sob essa fosforilação (tabela 1, estruturas 7-16). Foi concluído que a distância entre os átomos de nitrogênio e enxofre foi importante para a atividade inibitória, que um nitrogênio dentro ou diretamente ligado a um anel insaturado provocava uma diminuição da atividade, e que

se ambos os átomos estivessem dentro do anel o análogo em questão não possuía atividade. Conforme pode-se observar na tabela 1, os derivados ácidos trans-2-aminociclopentassulfônico (TAPS, estrutura 15) e 1,2,3,4-tetrahydroquinolina-8-sulfônico (THQS, estrutura 10) foram os que possuíram melhor atividade, de acordo com suas concentrações correspondentes a 50% na inibição da fosforilação de proteínas específicas ( $IC_{50}$ ).

Estrutura	Nome	Atividade (IC <sub>50</sub> em mmol)
(7) 	Taurina	33,2
(8) 	Ácido aminometanosulfônico (AMS)	43,6
(9) 	2-aminoetilmetilsulfona (AEMS)	47,4
(10) 	Ácido 1,2,3,4-tetrahydroquinolina-8-sulfônico (THQS)	4,9
(11) 	Ácido quinolina-8-sulfônico (QS)	14,9
(12) 	Ácido piperidina-3-sulfônico (PiP)	19,1
(13) 	Ácido piridina-3-sulfônico (PyS)	44,0
(14) 	Aminotetrahidrotiopeno-1,1-dioxido (ATS),	20,5
(15) 	Ácido Trans-2-aminociclopentanosulfônico (TAPS)	1,6
(16) 	Ácido 2-aminobenzenossulfônico (ABS)	40,5

**Tabela 1 - derivados da taurina com atividade inibitória sob a fosforilação de proteínas da retina de ratos (modificado de LOMBARDINI & PROPS, 1997)**

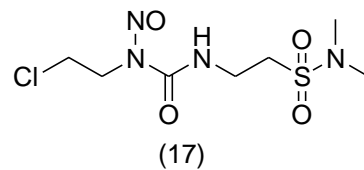


### 3.1.8) Ácidos nucleicos

É comum a utilização de substâncias contendo enxofre para a proteção de DNA e RNA contra agentes alquilantes e radiação, graças a uma interação com a base nitrogenada guanosina. A taurina, também possuindo um átomo de enxofre em sua estrutura na forma de ácido sulfônico, possui atividade radio-protetora e anti-mutagênica (LAIDLAW *et al.*, 1989; CUNNINGHAM *et al.*, 1998)

Foi demonstrado que é necessária uma modificação pós-transcricional no RNA transportador (RNAt) mitocondrial, na posição correspondente ao primeiro anti-códon (posição wobble) para que esse RNAt proporcione uma ligação correta códon-anticódon. Assim foi descoberto que essa modificação corresponde à incorporação de uma molécula de taurina na uracila localizada na posição wobble, sendo que a taurina, uma vez capturada no citosol por seu transportador, graças a uma diferença de concentração, é captada na mitocôndria por ação de uma outra enzima (*putative mt. taurine transporter*), e então, dentro da mitocôndria, ocorre a incorporação da taurina na uracila do RNAt por ação de uma enzima denominada taurina transferase (SUZUKI *et al.*, 2002).

Um importante análogo da taurina com atividade anti-cancer é a tauromustina (figura 5, estrutura 17). Um estudo de fase II conduzido por Gregor *et al.* (1992) demonstrou que este composto provocou uma melhora de pacientes acometidos por astrocitoma anaplástico ou glioblastoma que haviam apresentado quadro de recaída após cirurgia e radioterapia. Sendo uma nitrosureia, a tauromustina também apresenta efeitos adversos como trombocitopenia, apesar de ser menos tóxica que outros fármacos de sua classe.

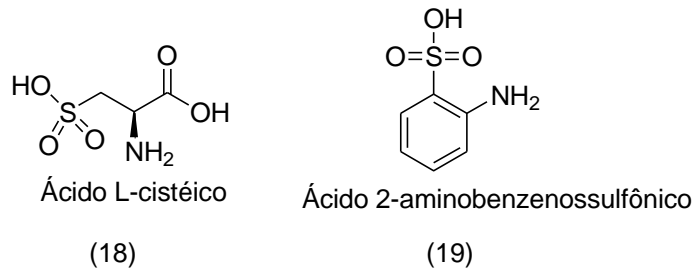


***Figura 5 - Estrutura da tauromustina***

### 3.1.9) Cardiovascular

Há uma grande quantidade de taurina no coração de mamíferos, captada do sangue por um sistema sódio-dependente (GUPTA, WIN E BITTNER, 2005). Foi comprovada sua ação na prevenção de arritmias cardíacas, como contrações atriais e ventriculares prematuras. Esse efeito é devido ao fato de a taurina regular os níveis de sódio, cálcio e potássio no sangue e nos tecidos, além de amortecer a atividade simpática do sistema nervoso e portanto a liberação de epinefrina, o que também está associado a um efeito anti-hipertensivo (EBY & HALCOMB, 2006). A taurina também possui efeito inotrópico positivo em baixas concentrações de íons cálcio (FRANCONI *et al.*, 1986)

Experimento realizado por Franconi et al. (1986) em porcos da Guinéa demonstrou que os análogos ácido L-cistéico e ácido 2-aminobenzenossulfônico (figura 6, estruturas 18 e 19) mimetizam as ações cardíacas da taurina. Este mesmo estudo estabelece que a distância entre os grupamentos amino e sulfônico são essenciais para a atividade e que a substituição do grupo sulfônico por outra função acídica provoca uma diminuição da atividade.



**Figura 6 - Análogos da taurina com atividade cardíaca (FRANCONI *et al.*, 1986)**

### 3.1.10) Apoptose:

Foi demonstrada a capacidade de a taurina inibir a apoptose de células polimorfonucleares (PMNs) induzida por arsenito de sódio, um potencial agente apoptótico. Isso se deve provavelmente a capacidade anti-oxidante da taurina, que forma complexos com espécies cloradas, já citadas anteriormente, impedindo sua ação que pode causar apoptose (WATSON, *et al.* 1996). Um estudo mais recente revelou que a taurina inibe a apoptose provocada pelo tratamento com a citocina IL-2, muito usado para o melanoma metastático e câncer renal. Seu problema é que a ativação de células T por meio de IL-2 na ausência de estímulo antigênico faz com que o sistema imunológico reduza as respostas imunes efetoras, em uma tentativa de evitar a auto-imunidade em uma situação saudável. Então a taurina promove uma redução do fator de transcrição do ligante de Fas (FasL), envolvido na auto estimulação celular que induz a apoptose (MAHER, *et al.* 2005).

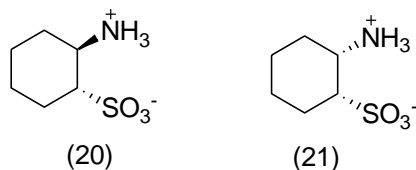
### 3.1.11) Efeito ergogênico

Um estudo mostrou o efeito da taurina na proteção do estresse oxidativo gerado pelo exercício físico. Como resultado, foi observado que a taurina atenuou os danos no DNA induzidos pelo exercício, devido a seus efeitos citoprotetores, melhorando a capacidade

ergogênica de indivíduos que receberam suplementação de taurina, além de atuar no aumento do volume de oxigênio ( $VO_2$ ) máximo. (ZHANG, *et al.* 2004).

### 3.1.12) Termorregulação

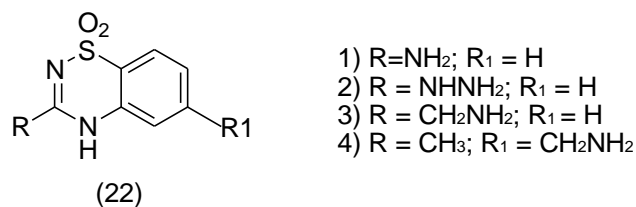
Os efeitos da taurina na temperatura corporal, ocasionados por sua interação com o sistema serotoninérgico central, resultam de uma perda de calor aumentada por diminuição no tônus vasomotor periférico e diminuição da temperatura fisiológica do organismo. Alguns análogos da taurina foram testados para descobrir se a ação na termorregulação se dá via receptores GABAérgicos ou se há outros receptores envolvidos nesta atividade. Foram testados os isômeros *cis* e *trans* do ácido 2-aminociclohexanosulfônico (figura 7, estruturas 20 e 21), sendo que apenas o primeiro apresentou ação termorregulatória, mas interagindo com um receptor putativo de taurina. Esta diferença de atividade pode ser explicada pela distância entre os átomos de nitrogênio e enxofre dentro de suas moléculas (GUPTA, WIN & BITTNER, 2005). Um outro estudo demonstrou que um análogo antagonista da taurina, o 6-aminometil-3-metil-4*H*-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido (TAG), ocasionou um aumento na temperatura fisiológica de coelhos, demonstrando mais uma vez que a ação destas substâncias na temperatura corporal se dá por interação com receptores próprios de taurina (OJA & SARANSAARI, 2007). A próxima seção deste trabalho irá descrever com maiores detalhes as características deste tipo de receptor.



**Figura 7 - Ácidos *trans*- e *cis*- 2-aminociclohexanosulfônico (TAHS e CAHS)**

### 3.1.13) Receptores putativos e antagonistas da taurina

Em espécies de animais inferiores e durante o desenvolvimento, têm sido um desafio determinar se todas as ações exercidas pela taurina são mediadas apenas por receptores de GABA e glicina, conforme já citado anteriormente, ou se existem receptores no organismo únicos para este aminoácido (OJA & SARANSAARI, 2007). Kontro & Oja (1983, *apud* OJA & SARANSAARI, 2007, p. 8) foram os primeiros a detectar a ligação de taurina em membranas sinápticas, após submetê-las a ciclos de gelo e degelo e realizar uma extração com detergentes. Conforme citado anteriormente, receptores específicos para taurina podem sofrer competição por agentes como o CAHS e o TAG. Tentativas de desenvolver derivados do TAG com melhor atividade antagonista foram feitas, modificando sua estrutura, porém resultando em análogos com atividade inferior (figura 8, estrutura 22) (GUPTA, WIN & BITTNER, 2005)



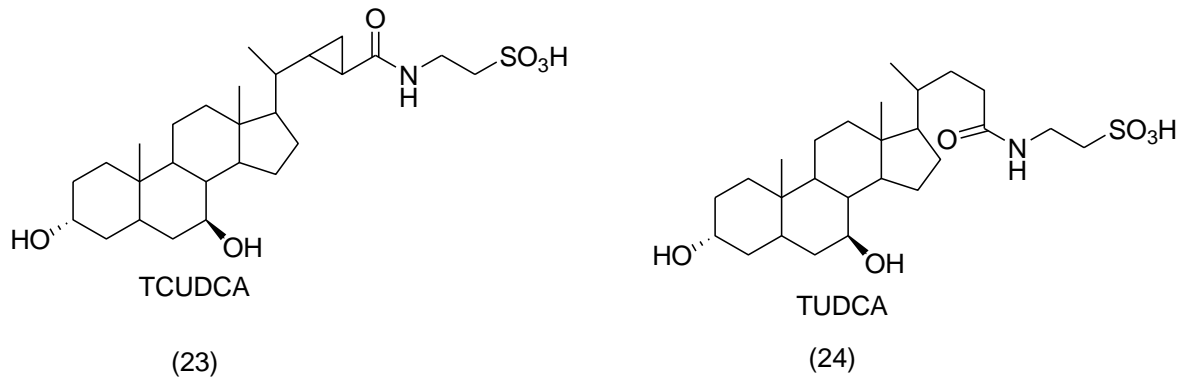
- 1) R=NH<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> = H
- 2) R = NHHNH<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> = H
- 3) R = CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> = H
- 4) R = CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>

***Figura 8 - Tentativas de modificação na estrutura do TAG (modificado de Gupta, Win e Bittner, 2005, p. 2023)***

### 3.1.14) Promoção da formação de sais biliares

A taurina é o principal aminoácido que se conjuga com derivados do colesterol para formar os sais biliares, úteis na solubilização e emulsificação de gordura para melhorar sua digestibilidade. O sal derivado de taurina formado chama-se taurocolato. O colesterol é extraído na forma de ácido taurocólico, sendo que a taxa desta extração depende da disponibilidade de taurina. Agentes que aumentam esta disponibilidade podem ser utilizados para melhorar a

extração de colesterol. Temos então o ácido ursodeoxicólico (UDCA), que conjugado com a taurina forma o TUDCA, e seu análogo o CUDCA (figura 9, estruturas 23 e 24), que possui um anel ciclopropil resistente a degradação por bactérias intestinais (GUPTA, WIN E BITTNER, 2005, p. 2033)

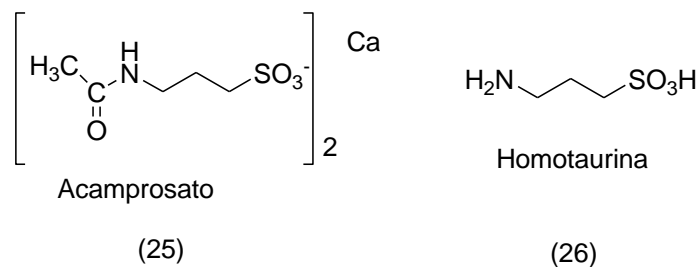


**Figura 9 - Derivados da taurina que atuam como sais biliares**

### 3.1.15) Efeito anti-álcool

O efeito anti-álcool exercido pela taurina se dá pela interação com receptores GABA e glicina, e com canais iônicos de cálcio. Assim, a administração aguda de taurina reduz o consumo voluntário de etanol por ratos. A taurina também influencia a atividade locomotora em ratos: baixas doses de taurina são inibitórias na atividade motora aumentada por uma baixa concentração plasmática de álcool, enquanto altas doses de taurina são excitatórias sob este efeito. Os efeitos sedativos causados por altas doses de álcool são estimulados pela taurina administrada intracerebroventricularmente, e inibidos pela taurina aplicada intraperitonealmente e em altas doses. Fora isso, a taurina possui papel importante na retirada do álcool. A hiperexcitabilidade neuronal causada pela retirada do álcool pode gerar convulsões, que são suprimidas pela atividade anticonvulsivante da taurina (ARAGÓN, TRUDEAU & AMIT, 1992)

Dois análogos da taurina, a homotaurina e o acamprosato (figura 10, estruturas 25 e 26), possuem ação no tratamento do alcoolismo. Um estudo demonstrou que ambos os compostos reduzem a auto-administração de álcool por ratos. Isso porque estes compostos atuam na diminuição da liberação mesolímbica de dopamina no núcleo acumbens, que é estimulada pelo álcool e produz sensação de saciedade. A homotaurina é um agonista de receptores GABA<sub>A</sub>, que exerce um controle inibitório sob a liberação de dopamina mesolímbica no núcleo acumbens. Já o acamprosato é um antagonista de receptores GABA<sub>B</sub>. Entretanto, é a estimulação deste receptor que tem efeito inibitório sob a liberação de dopamina mesolímbica, e não o antagonismo. Ou seja, o acamprosato causa diminuição na liberação de dopamina no núcleo acumbens por meio de outro mecanismo, que parece ser a atuação em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) ou em canais de cálcio voltagem dependente (OLIVE *et al.*, 2002).



**Figura 10 - Estruturas do acamprosato e homotaurina**

### 3.1.16) Efeito antidiabetes

No diabetes, a alta concentração extracelular de glicose provoca um desequilíbrio osmótico e ocasiona a formação de sorbitol intracelular, envolvido nas futuras complicações da doença e disfunções celulares. Esse aumento intracelular de sorbitol pode provocar uma depleção de osmólitos como a taurina (HANSEN, 2001). A taurina está envolvida na proteção da produção

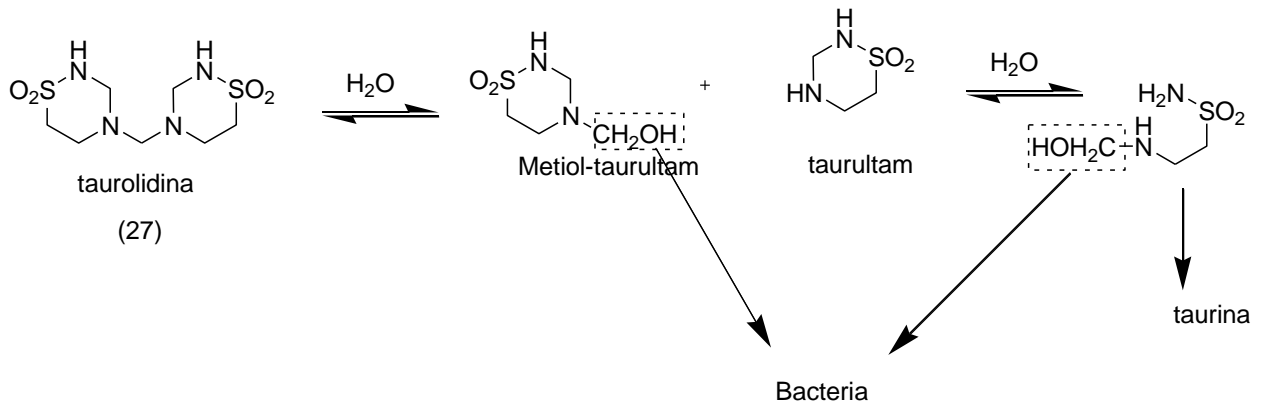
de insulina, sendo que ambas agem em simbiose na geração de efeitos hipoglicêmicos. Sua suplementação possui efeito benéfico em pacientes com diabetes tipo 2 (GUPTA, WIN & BITTNER, 2005).

Existem diversas formulações anti-diabetes contendo taurina. Podem ser encontrados também compostos de taurina contendo somatostatina, os quais aumentam a excreção de insulina basal. Como uma abordagem futura, seria interessante preparar derivados de sulfonilureia contendo taurina (GUPTA, WIN & BITTNER, 2005)

#### 3.1.17) Atividade antimicrobiana

Diversos compostos derivados da taurina apresentam atividade anti-microbiana. Dentre estes compostos, destaca-se a taurolidina (esquema 2, estrutura 27) que apresenta amplo espectro antibacteriano de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, micobactérias e fungos clinicamente importantes. A taurolidina é instável em meio aquoso, quebrando em outras moléculas que conferem a atividade biológica deste composto. Estas moléculas foram caracterizadas por um estudo conduzido por Caruso et al. (2010), e podem ser visualizadas no esquema 2. Elas inibem a propriedade adesiva de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em células humanas como as epiteliais e os fibroblastos. Outro estudo mostrou que a taurolidina reduziu a incidência de infecções sanguíneas associadas a cateter causadas por *Staphylococci* coagulase-negativos (SIMON et al., 2008)





**Esquema 2 - Hidrólise da taurolidina formando moléculas com atividade antibacética (modificado de Caruso et al., 2010, p. 2)**

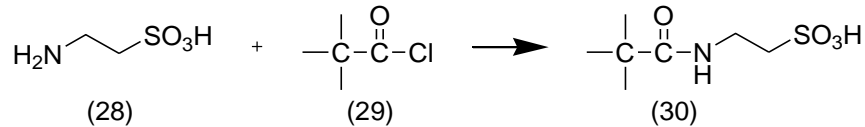
### 3.2) Sínteses descritas na literatura de derivados da taurina

Nesta etapa da seção de revisão deste trabalho será feito um compilado a respeito de síntese de derivados da taurina descritas na literatura. Como será observado, são utilizadas diferentes estratégias para sintetizar estes compostos, sendo alguma delas de caráter mais clássico, e outras trazendo uma maior inovação.

#### 3.2.1) Síntese da N-pivaloil taurina

Este composto foi sintetizado em estudo realizado por Salimaki et al. (2003), cujo objetivo era comparar sua atividade com a da taurina na elevação dos níveis extracelulares estriatais de dopamina, e a capacidade de causar hipotermia em ratos. O método sintético utilizado foi o de Schotten-Baumann, no qual um cloreto de acila reage com uma amina na presença de uma base formando uma amida (mais detalhes sobre este método serão citados na parte de síntese de amidas graxas). Neste caso, o autor reagiu taurina com cloreto de pivaloila

(esquema 3, estruturas 28 e 29, respectivamente), em solução 10% de hidróxido de sódio. O produto final (estrutura 30) foi purificado por recristalização com solução etanol/dietiléter.



**Esquema 3 - Reação de síntese da N-pivaloiltaurina**

### 3.2.2) Síntese da $\gamma$ -L-glutamiltaurina

Uma revisão também realizada por Bittner, Win e Gupta (2005) reuniu diversas estratégias de síntese descritas na literatura para se chegar a  $\gamma$ -L-glutamiltaurina. Este composto possui atividade anticonflito (termo relacionado a indecisão) e também inibe a ativação em excesso da neurotransmissão excitatória. Todos os métodos descritos nesta revisão foram reunidos em um esquema (ver anexo A).

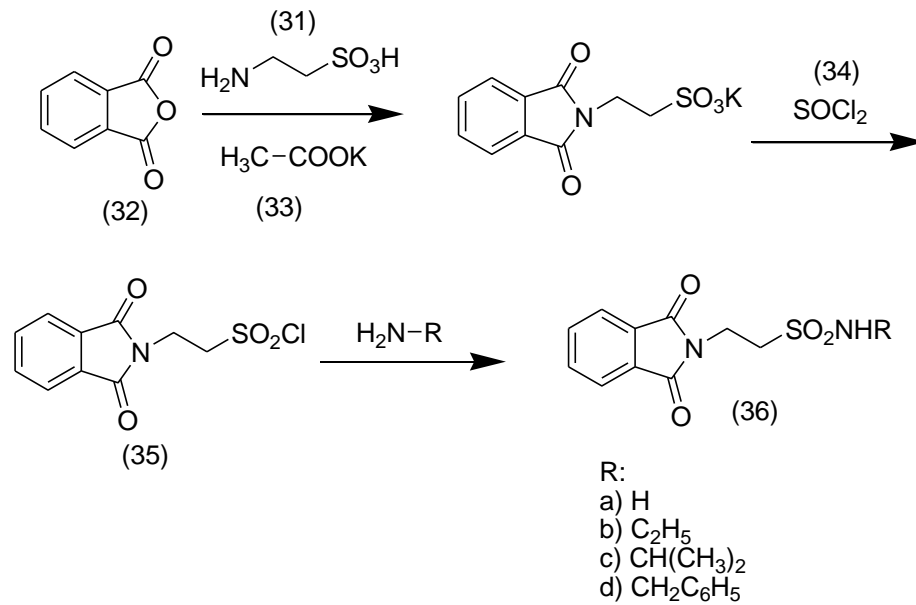
No primeiro método (rota 1 no esquema), a  $\gamma$ -L-glutamiltaurina é obtida a partir de uma substância chamada Z-Glu-Obz, um composto com grupos protetores que reage com cistamina ou taurina formando um intermediário que sofre oxidação, formando o produto. Este método, conhecido por método do anidrido misto, já havia sido patenteado por Feuer *et al.* (1977), cuja síntese é indicada pela rota 2. A técnica do anidrido misto tem sua utilização descrita na literatura para a síntese de peptídeos, onde ocorre a reação de um grupo amino protegido ou de um peptídeo ácido com cloroformato alquílico na presença de uma base terciária, gerando um ácido carboxílico misto com anidrido de ácido carbônico. O anidrido reage então com uma amina nucleófila, produzindo o peptídeo protegido (CHEN *et al.*, 1987).

Outros métodos envolveram: reação de um derivado succinimídico com taurina (rota 3); reação de uma ftaloíla de anidrido glutâmico com taurina (rota 4); reação de um derivado da

taurina que apresentava um halogênio no lugar do grupo sulfônico com o Z-Glu-Obz seguido de substituição com sulfato de sódio (rota 5); e a partir de  $\alpha$ -benzil- $\gamma$ -L-glutamiltaurina, numa síntese semelhante ao primeiro método (rota 6).

### 3.2.3) Síntese da taltrimida e seus derivados ftalimídicos

Esta estratégia de síntese mostra-se útil para os derivados ftalimídicos da taurina com atividade anticonvulsivante, já citados anteriormente. Assim, o trabalho de Usifoh *et al.* (2001) mostra a síntese de variados derivados desta classe, com o objetivo de comparar suas atividades baseando-se no tamanho da cadeia carbônica dos aminoácidos utilizados na síntese, dentre os quais taurina também estava presente. Esta estratégia, representada no esquema 4, envolveu reagir taurina (31) com o anidrido de ácido ftálico (32), na presença do sal potássico do ácido acético (33). Reagiu-se então o intermediário formado com cloreto de tionila (34), formando um derivado ftalimídico de taurina com um cloreto ligado ao grupo sulfônico (35), sendo que este pode ser substituído com versatilidade. Deste modo, reagiu-se este derivado com diferentes aminas, formando a taltrimida (36c no esquema) e outros diferentes produtos, de acordo com a substituição em R.



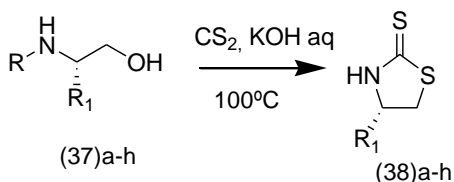
**Esquema 4 - Síntese da taltrimida e outros derivados ftalimídicos da taurina (modificado de USIFOH et al., 2001, p. 324)**

Vale lembrar que este estudo reuniu a reação do anidrido do ácido ftálico com outros aminoácidos. Porém, tais reações não estão relacionadas com o escopo deste trabalho, e portanto não serão detalhadas.

#### 3.2.4) Método flexível para síntese de derivados substituídos da taurina

Um estudo conduzido por Chen, Jia e Xu (2009) apresenta um modo rápido e eficiente de se sintetizar taurina e uma diversa gama de seus derivados substituídos. Este método, representado no esquema 5, envolve a reação de amino álcoois, com substituição na posição 4 37a-h e dissulfeto de carbono na presença de hidróxido de potássio (método A), gerando tiazolidina-2-tionas substituídas na posição 4.

Método A:

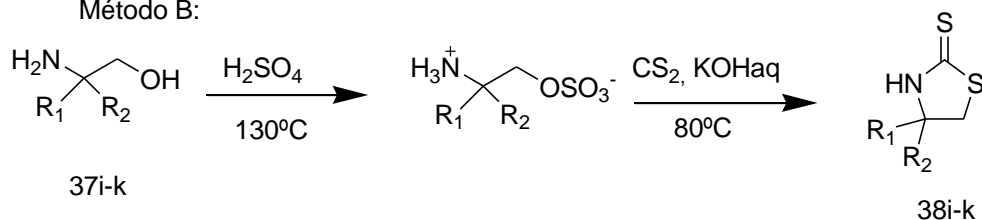


a: R=R<sub>1</sub>=H; b: R=H, R<sub>1</sub>=Me c: R=H, R<sub>1</sub>= Bn; d: R=H, R<sub>1</sub>=iPr; e: R=H, R<sub>1</sub> = iBu; f: R=H, R<sub>1</sub>=Ph; g: R=R<sub>1</sub>=Bn, h: R, R<sub>1</sub>=(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>

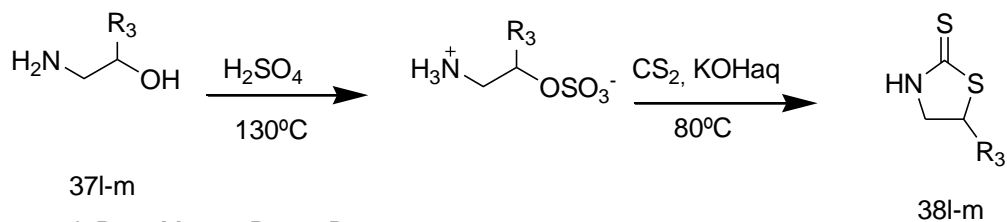
**Esquema 5 - Síntese de tiazolidina-2-tionas para obtenção de derivados substituídos da taurina pelo método A (modificado de CHEN, JIA E XU, 2009, p. 5842)**

Porém, por este método, os amino alcoois 4,4-dissubstituídos (37 i-k) e 5-substituídos (l-m) apresentaram impedimento estérico, comprovado por um baixo rendimento. Assim, para estes amino alcoois, foi necessário ativar o grupamento hidroxila com ácido clorossulfônico ou ácido sulfúrico, o que melhorou a obtenção de suas respectivas tiazolidina-2-tionas (método B, esquema 6).

Método B:



i: R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = Me; j: R<sub>1</sub>=Me, R<sub>2</sub> = BnCH<sub>2</sub>; k: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>

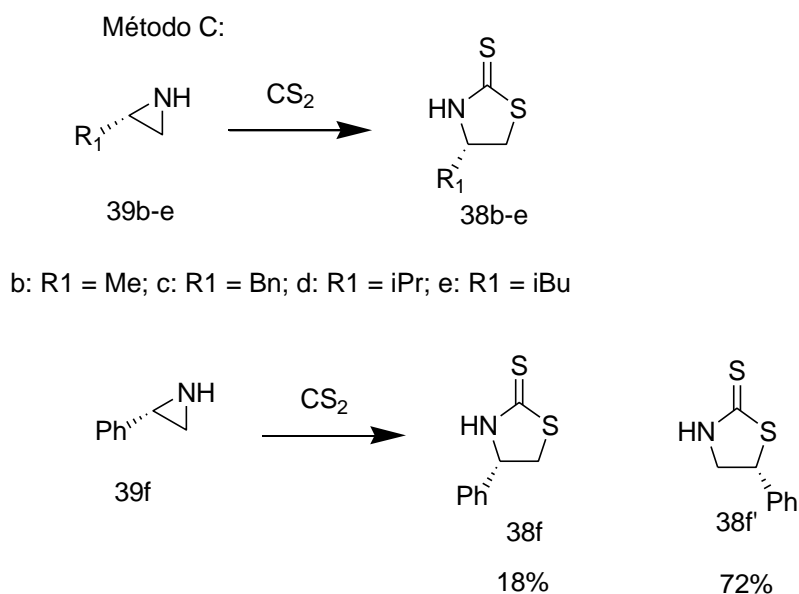


l: R<sub>3</sub> = Me; m: R<sub>3</sub> = nBu

**Esquema 6 - Síntese de tiazolidina-2-tionas para obtenção de derivados substituídos da taurina pelo método B (modificado de CHEN, JIA E XU, 2009, p. 5842)**

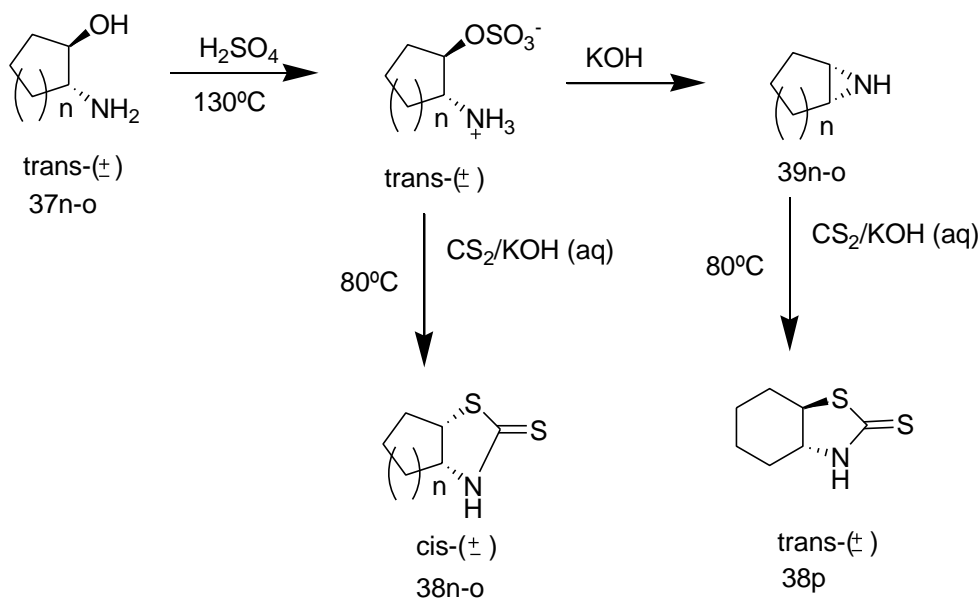
Outro método de se obter tiazolidinas-2-tionas foi a reação entre aziridinas e dissulfeto de carbono. Neste método, (S)-2-alkilaziridinas 39 b-e opticamente ativas reagem com dissulfeto

de carbono para formar (S)-4-alkiltiazolidinas-2-tionas 38b-e. Diferentemente, (S)-2-fenilaziridina 39f gerou uma mistura racêmica de (S)-3-feniltiazolidina-2-tiona (38f) e (R)-5-feniltiazolidina-2-tiona (38f') em uma proporção de 1:4, nas mesmas condições. Este é representado como método C no esquema 7.



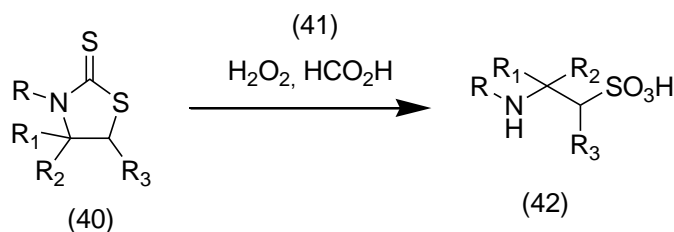
**Esquema 7 - Síntese de tiazolidina-2-tionas para obtenção de derivados substituídos da taurina pelo método C (modificado de CHEN, JIA E XU, 2009, p. 5842)**

Esta metodologia também incorporou amino álcoois cíclicos (37n-o), que foram ativados com ácido sulfúrico e reagidos com dissulfeto de carbono e hidróxido de potássio, gerando tiazolidinas-2-tionas bicíclicas (38n-p), esquema 8.



**Esquema 8 - Obtenção de tiazolidinas-2-tionas bicíclicas partindo de amino álcoois cíclicos (modificado de CHEN, JIA E XU, 2009, p. 5844).**

O passo seguinte envolvendo todas as tiazolidina-2-tionas obtidas nestes métodos (esquema 9, figura 40) foi a oxidação destas com ácido peroxifórmico (estrutura 41), gerando taurina (estrutura 42) e derivados substituídos da taurina. Este ácido peroxifórmico foi preparado reagindo ácido fórmico (88%) com solução de peróxido de hidrogênio (30%). Esta preparação foi melhorada pela mistura de ácido fórmico hídrico (98%) com peróxido de hidrogênio (30%).



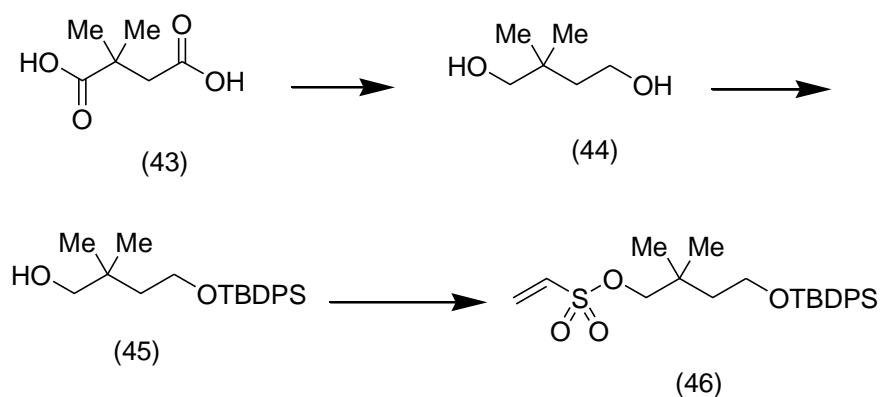
**Esquema 9 - Oxidação das tiazolidina-2-tionas gerando taurina e seus derivados substituídos (modificado de CHEN, JIA E XU, 2009, p. 5844)**

Esta metodologia pode ser aplicada para sintetizar os derivados da taurina TAHS E CAHS, já apresentados neste trabalho, com atividade termorregulatória, e o derivado TAPS, que

apresenta atividade inibitória sob a fosforilação de proteínas na retina, com já fora citado também.

### 3.2.5) Síntese de derivados da taurina pelo método “safety-catch”

Este método diferenciado para a síntese de derivados da taurina envolve a proteção do grupamento sulfônico, que é polar e fortemente ácido, descrito em estudo elaborado por Seeberger et al. (2006), relacionado nos esquemas 10 e 11. Primeiramente, ocorre a redução do ácido 2,2-dimetilsuccínico (43), seguido por uma proteção do produto, que ocorre pela siliação do grupo hidroxílico menos impedido. Uma vez protegido, este novo composto (45) é reagido com cloreto de 2-cloroetanosulfonila, gerando um etanosulfonato protegido (esquema 10, estrutura 46).

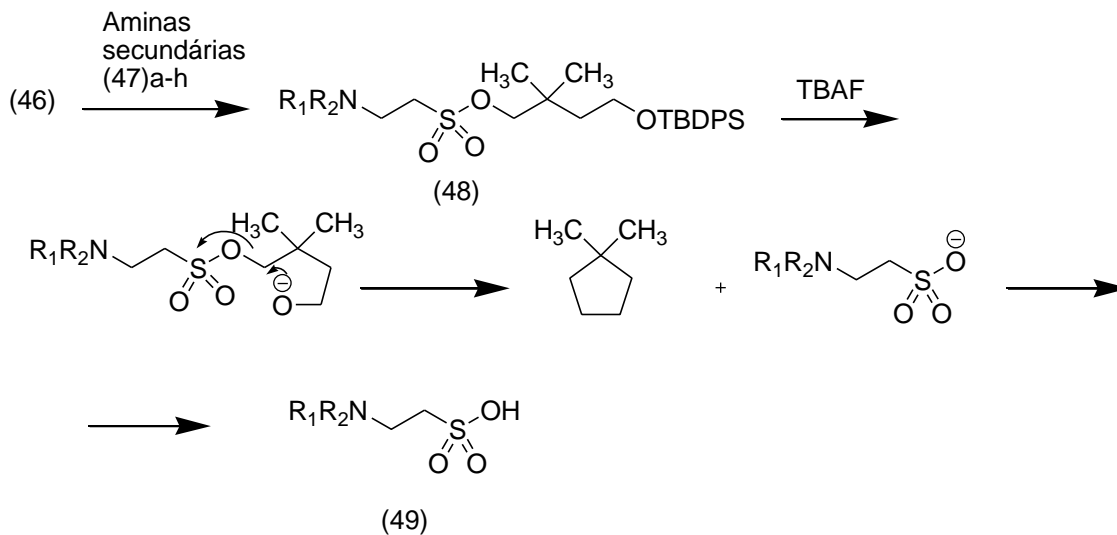


***Esquema 10 - Síntese do 4-(tert-butilsifenilsilanoxi)-2,2-dimetilbutil-etanosulfonato- geração do etanosulfonato protegido (modificado de Seeberger et al., 2006, p. 133)***

Após isso, este produto reage com as aminas secundárias 47a-h, em uma adição tipo Michael, para obter os derivados da taurina 48a-h protegidos (tabela 2). A desproteção ocorre pelo tratamento destes derivados com fluoreto de tetrabutilamônio, seguido de uma cromatografia

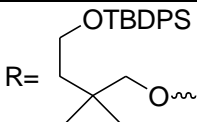
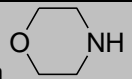
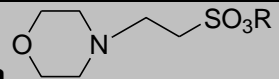
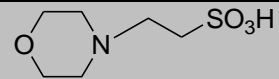
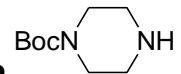
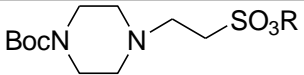
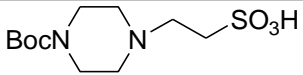
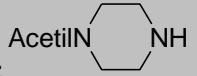
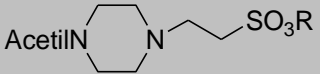
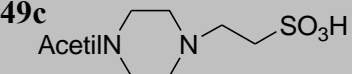
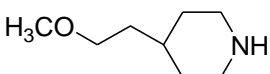
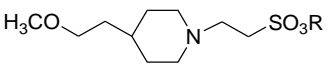
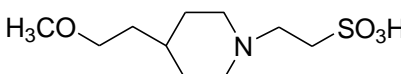
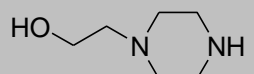
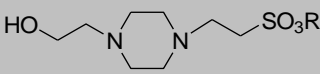
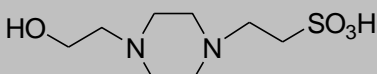

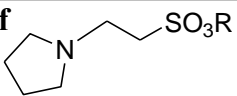
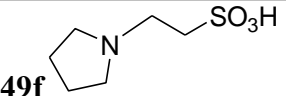
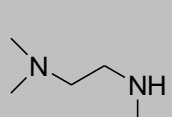
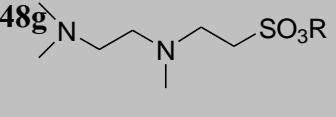
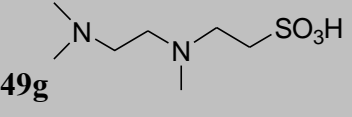
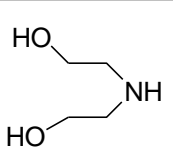
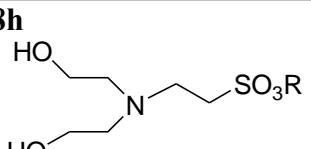
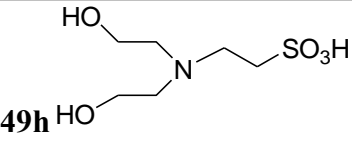


de troca iônica, obtendo, finalmente, ácidos sulfônicos puros (esquema 11 e tabela 2, estruturas 49a-h).



**Esquema 11 - Reação do etanosulfonato protegido (1) com as aminas secundárias e desproteção para obtenção de derivados da taurina (modificado de SEEBERGER *et al.*, 2006, p. 133)**

A tabela 2 apresenta os substituintes das aminas secundárias utilizadas na metodologia, e seus respectivos produtos.

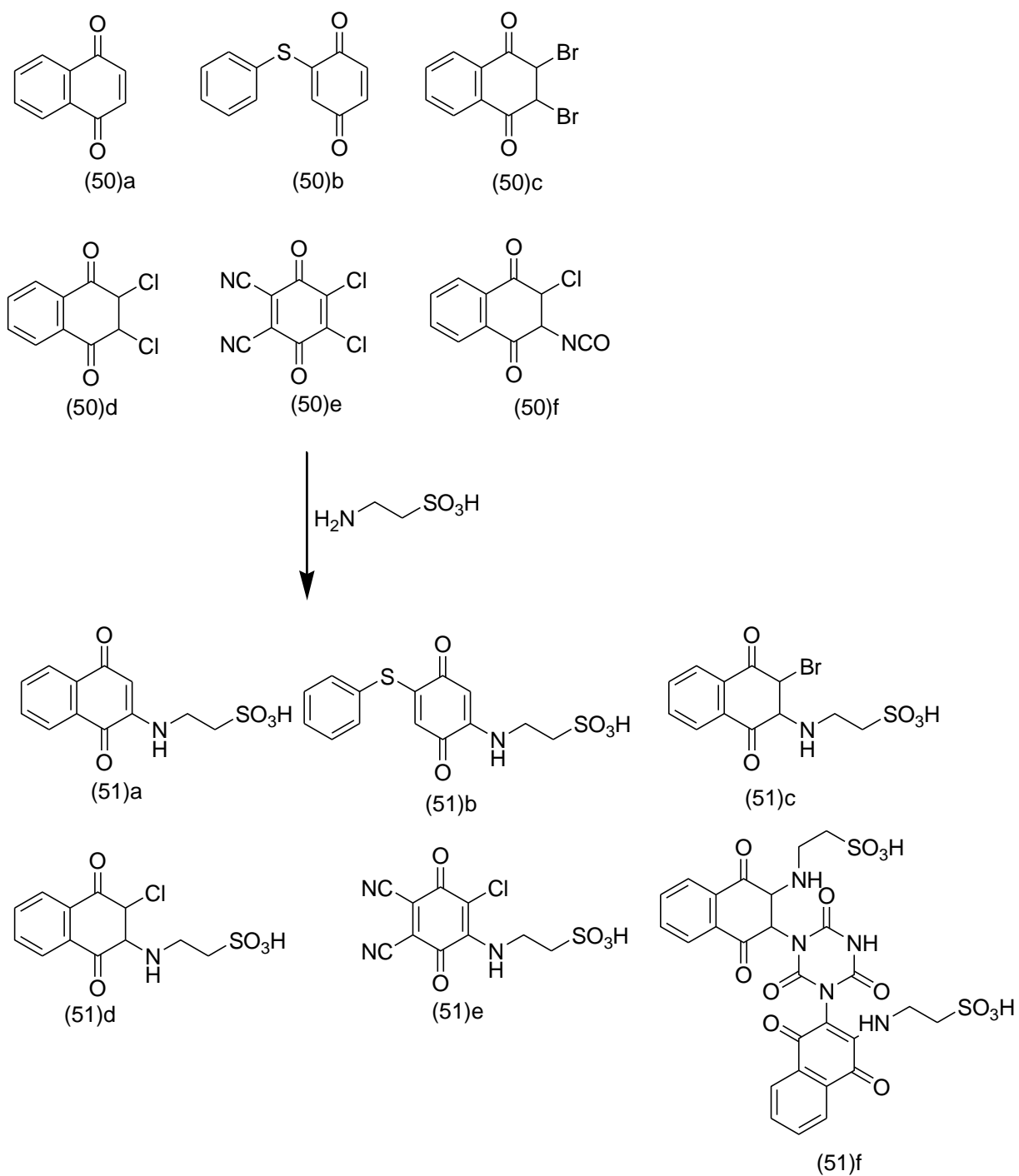
Aminas secundárias	R= 	Produtos após purificação por troca-iônica
<b>47a</b> 	<b>48a</b> 	<b>49a</b> 
<b>47b</b> 	<b>48b</b> 	<b>49b</b> 
<b>47c</b> 	<b>48c</b> 	<b>49c</b> 
<b>47d</b> 	<b>48d</b> 	<b>49d</b> 
<b>47e</b> 	<b>48e</b> 	<b>49e</b> 
<b>47f</b> 	<b>48f</b> 	<b>49f</b> 
<b>47g</b> 	<b>48g</b> 	<b>49g</b> 
<b>47h</b> 	<b>48h</b> 	<b>49h</b> 

**Tabela 2 - Substituintes das aminas secundárias utilizadas e respectivos produtos (modificado de SEEBERGER et al., 2006)**

### 3.2.6) Síntese das quinoniltaurinas

Uma síntese realizada por Gorohovisky, Temtsi-Krayz & Bittner (2002) teve como objetivo sintetizar derivados da taurina chamados quinonil taurinas, baseando-se no fato de que as para-quinonas são substâncias capazes de se ligar a diversas moléculas bioativas, ocasionando a imobilização de sistemas e geração de EROs. Assim, os autores desta síntese esperavam obter um composto com atividades anti-cancer e anti-malaria.

Diferentes quinonas foram sintetizadas, cada uma contendo uma molécula de taurina acoplada por seu grupamento amino. As quinonas (51)a e (51)c (esquema 10) foram obtidas por uma adição direta do tipo Michael do  $\beta$ -aminogruppo a respectiva quinona. Primeiramente, foi sintetizada uma forma reduzida destas quinonas (forma hidroquinônica). Porém, um processo redox acontece envolvendo um segundo equivalente da quinona inicial, gerando o produto desejado. Já a preparação das quinonas (51)b, (51)d e (51)e foi diferente. Este processo é semelhante a uma substituição de halogênios e eliminando ácido clorídrico (HCl) ou ácido bromídrico (HBr). Nestes casos, a hidroquinona não é formada, portanto não é necessário um segundo equivalente da quinona para participar do processo de redox. Por fim, a quinona (51)f indica o produto da reação da taurina com o quinonilisocianato (50)f, uma reação com diversos intermediários.

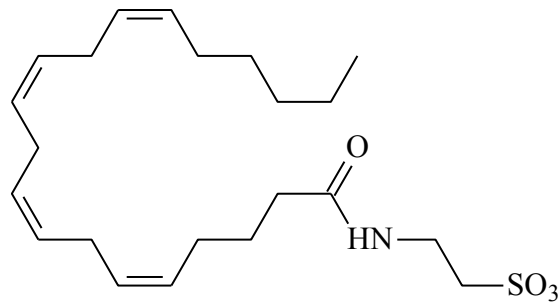


**Esquema 12 - Esquema representando a formação das quinonil-aurinas 1-6b a partir da reação das quinonas 1-6a com taurina (modificado de Gorohovisky et al., 2002)**

### 3.3) Derivados graxos da taurina e síntese de amidas graxas

Uma enzima de membrana integral chamada ácido graxo amida hidrolase (FAAH), é responsável pela inativação de uma grande classe de lipídeos sinalizadores denominados ácidos graxos amida, que incluem as N-acil etanolaminas (NAEs) (que interagem com receptores canabinóides), assim como as N-oleil e N- palmitoil amidas (que produzem, respectivamente, saciedade e efeitos anti-inflamatórios). Foi descoberto mais recentemente que essa enzima também interage com a N- acil taurina (NAT). Um dos estudos realizados sobre isso visou a mutação da enzima FAAH para que esta possa diferenciar as NAEs da NATs. Já o outro estudo visou caracterizar o sistema FAAH-NAT nos tecidos periféricos, o que já havia sido realizado no SNC, onde foram encontradas altas concentrações de NATs saturados relacionados ao FAAH. Foram encontradas altas concentrações desse sistema no fígado e rins de camundongos, porém os NATs encontravam-se sob forma insaturada, ao contrário do observado no SNC. Foi indicado também uma alta inativação do NAT nos tecidos periféricos pela ação da FAAH. Além disso, foi observado que o NAT participa da ativação de membros dos canais de cálcio de potencial receptor transiente (TRP). Inclui-se o TRPV1 e o TRPV4, ambos expressos nos rins (SAGHATELIAN, A., *et al.* 2006).

A figura 11 (estrutura 52) se trata da estrutura de uma das NATs encontradas nos rins e fígado de ratos conforme citado anteriormente:



20:4 NAT

(52)

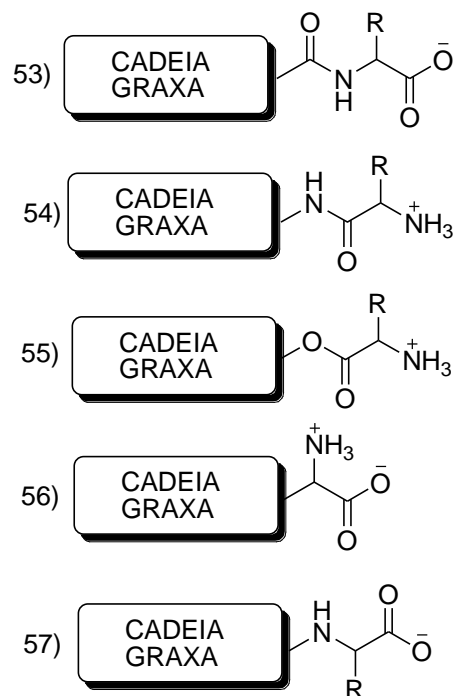
***Figura 11: Exemplo de N- Acil Taurina encontrada conjugada com FAAH em fígado e rins de ratos. Consiste de uma cadeia carbônica poliinsaturada.***

Em se tratando de síntese, uma grande importância tem sido direcionada a tensoativos biodegradáveis, principalmente derivados de aminoácidos. Nnanna & Xia (2001) são editoras do volume de uma série, com diversos autores, que trata apenas de surfactantes baseados em proteínas. Em um capítulo deste volume, é descrita a síntese e propriedades de diversos surfactantes derivados de aminoácidos. Segundo este, a maioria dos surfactantes de ocorrência natural são baseados em aminoácidos, com uma cadeia de ácido graxo ligada ao grupamento amino. Estes surfactantes aminoácidos possuem aplicabilidade cosmética, farmacêutica, caseira e alimentícia, podendo ser preparados por metodologias químicas, enzimáticas, ou químico-enzimáticas.

Aminoácidos combinados a lipídeos, chamados também de lipoaminoácidos, possuem uma ampla ocorrência em diversos organismos. Desde a primeira pesquisa realizada nesta área, por Bondi (1909, *apud* NNANNA & XIA, 2001, p. 5), onde é suposto que a necrose de gordura na célula deve ser atribuída a degradação de acil-aminoácidos a aminoácidos e ácidos graxos. Deste então, aminoácidos graxos de ocorrência em organismos vivos vêm sendo amplamente

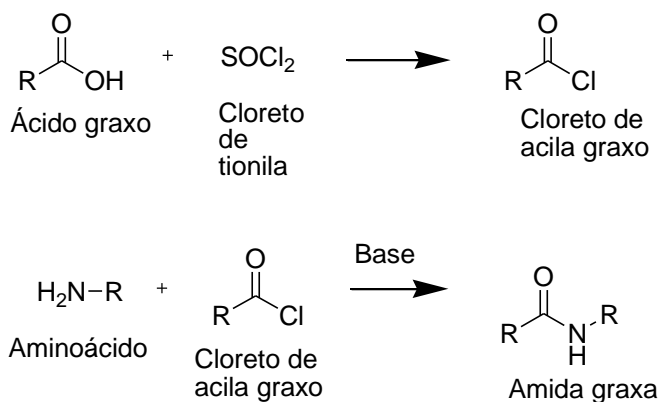
estudados. Um exemplo destes, como já fora citado neste trabalho, é o ácido taurocólico, um dos sais biliares que possuem propriedades emulsionantes sob as gorduras da alimentação. Para estudo de suas propriedades, diversas sínteses são desenvolvidas. Como o tema do presente trabalho também envolve a síntese de um aminoácido graxo, vale destacar aqui as metodologias sintéticas empregadas na literatura para a produção destas substâncias. Os parágrafos a seguir irão tratar deste assunto.

Ainda segundo a obra de Nnanna & Xia (2001), ambos os grupos funcionais dos aminoácidos, o amino e o carboxílico, podem ser convertidos a surfactantes. Estas possibilidades de conversão estão esquematizadas na figura 12, onde podemos observar que, dependendo do local de alcilação, obtemos um surfactante aniônico (53), catiônico (54 e 55), ou ainda anfótero (56 e 57).



**Figura 12 - Possibilidades de surfactantes derivados de aminoácidos (modificado de Nnanna & Xia, 2001)**

Há diversos métodos para se introduzir uma cadeia de ácido graxo em um aminoácido. Dentre estes, destaca-se o método Schotten-Baumann, no qual um aminoácido é condensado com um cloreto de acila graxo na presença de uma base, como hidróxido de sódio. Estas condições propiciam a existência de um grupo amino desprotonado, o que facilitará o ataque nucleofílico deste na carbonila do cloreto de acila. Este método é ilustrado pelo esquema 13. Amplas são as aplicações deste método descritas na literatura. Dentre estas, vale destacar a síntese realizada por Mohri, Okada e Benet (1998), onde os autores realizam a ligação de taurina ao anti-inflamatório benoxaprofeno, para avaliar a eliminação deste composto conjugado na urina de ratos. Este método também é citado nos trabalhos de Maugard et al. (1997) e de D'oca (2010). Outro trabalho onde esta metodologia também é empregada, sendo que este já foi citado anteriormente, é o realizado por Salimaki et al. (2003), para a síntese da N-pivaloil-taurina. O cloreto de acila graxo empregado neste método pode ser sintetizado a partir da reação de um ácido graxo com um cloreto de tionila, tal como realizado por Mohri, Okada e Benet (1997).



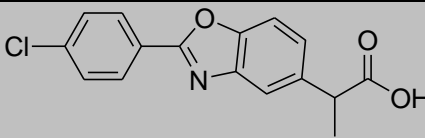
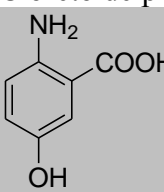
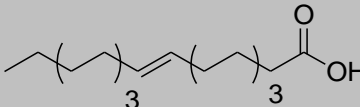
**Esquema 13 - Esquema geral do emprego do método de Schotten-Baumann para a síntese de amidas graxas**

Outras metodologias químicas para a síntese de aminoácidos graxos, ou amidas graxas, também são descritas em alguns estudos. Em um deles, D'oca (2010) reúne algumas destas



metodologias, tais como pela utilização de carbonildiimidazol (CDI), onde um imidazol é acoplado ao ácido graxo antes da reação deste com uma amina. Esta metodologia é utilizada em experimento realizado por Jung et al. (2003), onde há a reação de taurina com mesalazina para a formação de um pro-fármaco que permite a liberação de mesalazina no cólon, onde possui ação contra colite ulcerativa. Outro método de ativação de ácidos graxos descrito no trabalho de D'oca (2010) é pela conversão destes em anidridos, que se dá na presença de um agente desidratante, como dicicloexilcarbodiimida (DCC). Esta mesma autora participou também de outro trabalho onde é empregado como método para síntese de amidas graxas um processo de aminólise, onde diferentes ácidos graxos são primeiramente convertidos a ésteres, e depois reagem com aminas, na presença de metóxido de sódio (LOPES et al., 2010).

Uma nova abordagem para a síntese de aminoácidos graxos ou amidas graxas é a utilização de métodos enzimáticos. Um exemplo de emprego deste método é a síntese realizada por Maugard et al. (1997), onde a taurina é condensada com ácido oléico para a síntese de uma amida graxa surfactante. Nesta síntese, é formado primeiramente o sal sódico da taurina, taurato de sódio, pela reação desta com hidróxido de sódio em água, seguida de liofilização. A seguir, a reação enzimática é realizada, adicionando lipase a um sistema contendo ácido oléico, taurato de sódio e hexano como solvente.

Autor(es)	Amina	Ácido carboxílico ou cloreto de acila	Metodologia
Mohri, Okada e Benet (1997)	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ (58) Taurina	 (59) Benoxaprofeno	Schotten-Baumann
Salimaki et al. (2003)	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ Taurina	$\text{---C(=O)Cl}$ (60) Cloreto de pivaloila	Schotten-Baumann
Jung et al. (2003)	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ Taurina	 (61) Mesalazina	Acoplamento com CDI
Lopes et al. (2010)	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ (62) Etanolamina	$\text{---(CH}_2\text{)}_{14}\text{---C(=O)OH}$ (63) Ácido palmítico	Aminólise
Maugard et al. (1997)	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ (64) Taurato de sódio	 (65) Ácido oléico	Enzimática

**Tabela 3 - Principais sínteses de amidas graxas e respectivas metodologias**

A tabela 3 relaciona todos os métodos descritos anteriormente, indicando qual foi a amina utilizada, o ácido carboxílico, a metodologia utilizada e o produto formado. Vale destacar que existem diversas outras metodologias descritas na literatura, porém estas aqui relacionadas são de mais interesse e mais relacionadas ao objetivo deste trabalho.

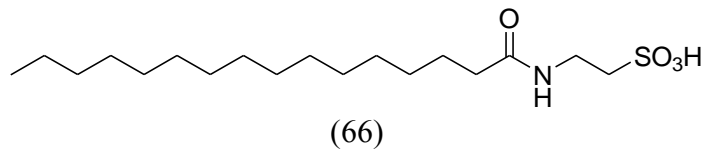
## 4) DESENVOLVIMENTO

Sabe-se que a pele é uma barreira que impede tanto a perda como a absorção de água e eletrólitos. Esta barreira é constituída por uma combinação de células córneas hidrofílicas e material intracelular hidrofóbico, formando o estrato córneo. As moléculas de um fármaco destinado a aplicação tópica podem penetrar na pele por 3 vias: pelo estrato córneo intacto, através dos ductos sudoríparos ou pelo folículo sebáceo. Fatores que interferem na absorção de um determinado fármaco é seu gradiente de concentração, que constitui a força motriz, e sua liberação do veículo (pomada, gel), que pode ser determinada por seu coeficiente de partição. Portanto, fatores como uma baixa massa molecular, solubilidade adequada em óleo e água e coeficiente de partição constituem as características ideais de absorção de um fármaco. Fora isso, íons hidrossolúveis e moléculas polares não penetram o estrato córneo intacto. (BRUNTON, LAZO E PARKER, 2007).

Portanto, a taurina, sendo uma molécula polar, não conseguiria transpor o estrato córneo. Pode-se demonstrar a baixa lipofilicidade da molécula de taurina pela averiguação de seu coeficiente de partição, representado por  $C \log P$  ( $\log P$  calculado), que representa a razão entre a distribuição de determinada substância entre a fase orgânica e a fase aquosa de um sistema formado, por exemplo, de óleo e água. Valores de  $\log P$  próximos de zero indicam alta hidrossolubilidade, ou seja, maior concentração da substância em análise na fase aquosa, enquanto valores próximos de 5 indicam alta lipossolubilidade, ou seja, maior concentração da substância na fase orgânica. O valor de  $C \log P$  da taurina é de -1,72 (Chem Draw), o que indica que esta molécula é muito polar e hidrossolúvel.

É necessário então fornecer um maior caráter lipofílico à molécula de taurina. Uma solução para tal problema é reagir a molécula de taurina com a molécula de ácido palmítico,

formada por uma cadeia de 15 carbonos saturados e uma carboxila, sendo portanto altamente lipofílica. Com essa reação, uma cadeia carbônica grande seria acoplada à molécula de taurina, formando um pró-fármaco com um bom caráter apolar e lipofílico. A molécula desejada (figura 13, estrutura 66) também seria um bom tensoativo, o que pode ser visualizado em sua estrutura, já que possui uma fração apolar (formada pela cadeia carbônica) e uma fração polar (taurina). Isso faz com que esta substância possa ser utilizada em uma formulação cosmética com aplicação como princípio ativo e adjuvante tensoativo. Um novo log P para essa molécula seria de 4,29 (Chem Draw), o que indica uma melhor lipossolubilidade.



*Figura 13 - ácido 2-(palmitamido)etanossulfônico*

## 5) MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1) Materiais de síntese

Taurina (Deg), cloreto de palmitoíla (palmitoyl chloride 98% - Aldrich) e trietilamina (Merck-Schuchardt).

### 5.2) Métodos de síntese

O método escolhido para síntese foi o de Schotten-Baumann, baseado nos experimentos descritos anteriormente realizados por Mohri, Ikada e Benet (1997) e Salimaki *et al.* (2003). Porém, não será necessário a síntese prévia de um cloreto de acila pela reação de um ácido carboxílico com o cloreto de tionila, uma vez que já encontra-se disponível o cloreto de acila a

ser utilizado. Assim, primeiramente, 30 mL de água foram aquecidos, seguido pela adição de 1,0 g (8,0 mmol) de taurina. Para basificação do meio, adicionou-se 1,5 mL (10 mmol) de trietilamina. Após observação de um potencial hidrogeniônico (pH) próximo de 9,0 com o uso de papel indicador universal, adicionou-se 2,5 mL (8,20 mmol) de cloreto de palmitoila. A reação foi deixada sob aquecimento e agitação, com a utilização de agitador magnético. Após alguns minutos de reação, observa-se diminuição do pH. Adicionou-se porções de 1 mL de trietilamina para compensar tal diminuição e manter o pH básico. A reação foi prosseguida por aproximadamente 15 minutos após observação de uma estabilidade no pH. A seguir, a mistura reacional foi colocada em banho de gelo para a precipitação do produto.

### **5.3) Métodos de purificação**

Para purificação, foi realizada uma extração, adicionando-se 15 mL de acetato de etila. Observou-se então a formação de um precipitado. Este sistema foi filtrado a vácuo. Ao filtrado, foi adicionado 1 g de cloreto de sódio (NaCl), realizando-se uma nova filtração. Repetiu-se a adição de 15 mL de acetato de etila ao filtrado, e agitou-se o sistema. Esperou-se então a obtenção de duas fases (aquosa e orgânica), e separou-se a fase orgânica. Foram adicionados mais 15 mL de acetato de etila na fase aquosa, agitando o sistema e separando novamente a fase orgânica. A fase aquosa foi deixada em geladeira para precipitação por um dia, e filtrada. O sólido retido no papel de filtro foi lavado com água gelada, e colocado em estufa para secagem, obtendo-se assim o produto. Já a fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida, obtendo-se um sólido de coloração amarela e aspecto pastoso.

## **5.4) Métodos analíticos**

### 5.4.1) Cromatografia em camada delgada (CCD)

Como método de análise para acompanhamento da reação e da purificação do produto formado, realizaram-se CCDs, utilizando como fase móvel 1 hexano :1 acetona, seguido de revelação com ninidrina. Este método foi aplicado apenas para fins qualitativos, avaliando a presença ou não de grupamentos amina. Na análise por CCD do produto final, este foi dissolvido em 15 mL de diclorometano, e foram adicionados 15 mL de solução de ácido clorídrico 50%. Este sistema foi deixado sob aquecimento e agitação em refluxo por 1 hora. Ao final, foi realizada a separação da fase orgânica e fase aquosa, e as duas foram analisadas por uma nova CCD seguida de revelação por ninidrina.

### 5.4.2) Faixa de fusão

A faixa de fusão do produto foi determinada em aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific.

### 5.4.3) Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no IV, na região de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro de infravermelho FTIR-8300 da Shimadzu.

### 5.4.4) Espectrometria de massa

A análise por espectrometria de massa foi realizada em aparelho LCQ FLEET – THERMO SCIENTIFIC, com bomba de infusão de fluxo 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ , utilizando como eluente

acetonitrila. A técnica de ionização utilizada foi a de Spray de Elétrons (ESI) negativo, com uma voltagem de ionização de 5,00 kV. Para a obtenção dos “íons filhos”, foi utilizado o hélio como gás de colisão, e voltagem de 35V.

## **6) RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1) Considerações gerais e mecanismo de reação**

Alguns requisitos devem ser atendidos para que a reação aconteça da maneira esperada:

- a) A taurina e o cloreto de palmitoíla devem ser bem dissolvidos no solvente utilizado;
- b) O grupamento amino da taurina deve estar totalmente na forma não protonada, para que possua um par de elétrons livres para realizar o ataque na carbonila do cloreto de palmitoíla;
- c) Um bom grupo abandonador deve estar presente na molécula que sofre o ataque do grupamento amino da taurina

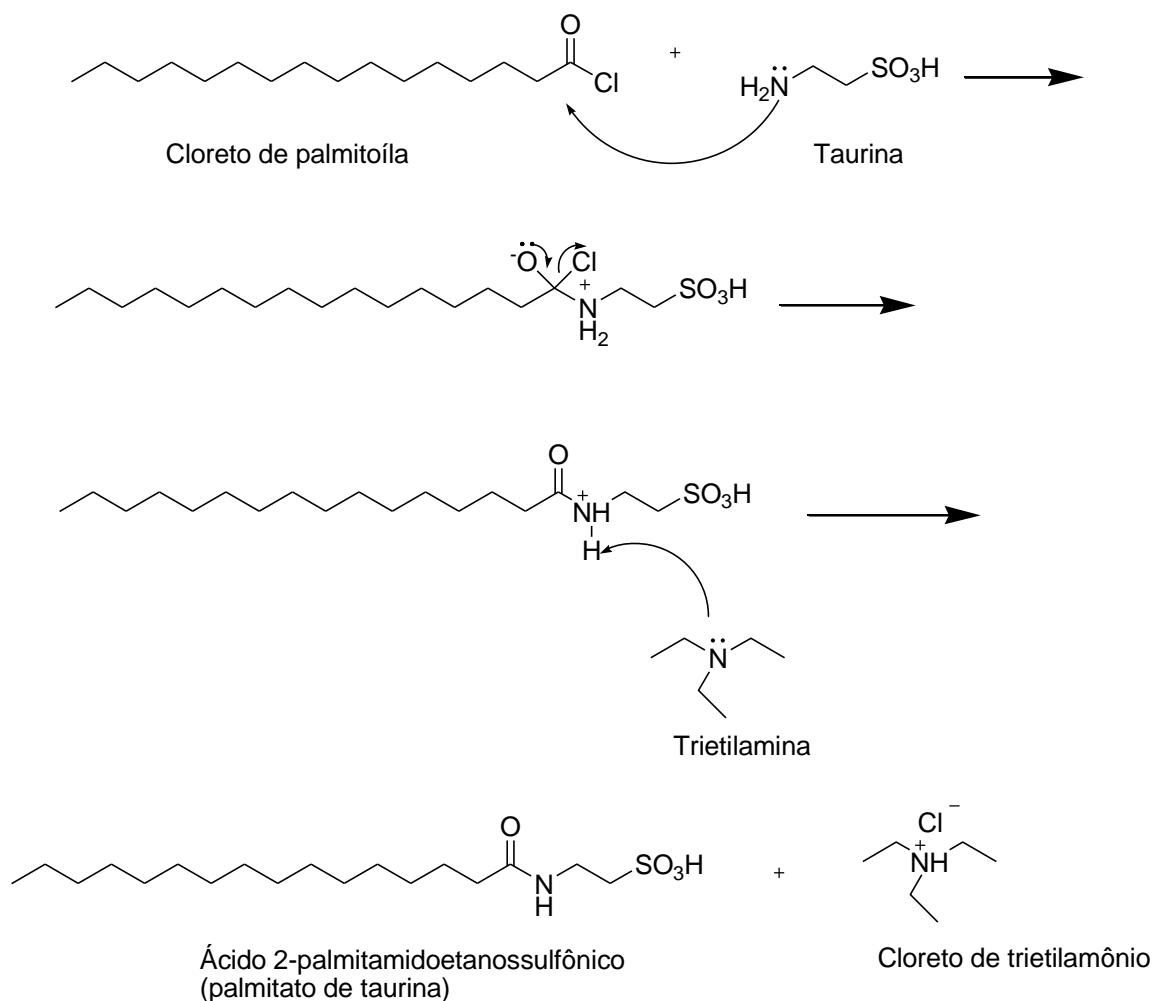
Na metodologia empregada, todos esses pré-requisitos são atendidos:

- a) Utiliza-se água como solvente, mas a reação é realizada sob aquecimento, o que propicia a dissolução de todos os reagentes;
- b) A reação é realizada em meio básico, com um pH acima de 9, sendo que o  $pK_2$  da taurina é igual a 8,74, o que garante que seu grupamento amino conterà um par de elétrons livres para realizar o ataque nucleofílico;
- c) Utiliza-se na reação o cloreto de palmitoíla, que possui um átomo de cloro como um bom grupo retirante.

Vale destacar que estas condições encontram-se pré-estabelecidas no método de Schotten-Baumann, empregado nos estudos citados anteriormente.

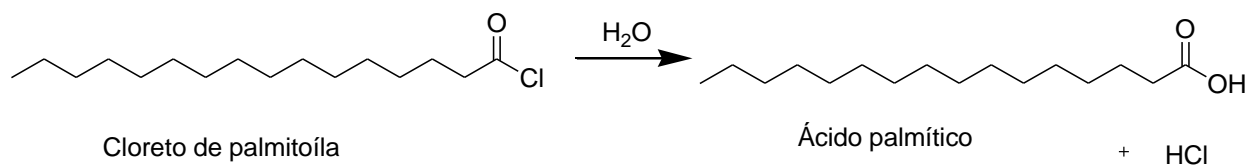
O esquema 14 ilustra o mecanismo da reação. Neste mecanismo, temos primeiramente um ataque nucleofílico do par de elétrons livres do grupamento amino da taurina no carbono carbonílico do cloreto de palmitoíla. Isso ocasiona a formação de um intermediário, que por rearranjo intramolecular irá liberar cloreto e formar um pré-protudo com um nitrogênio catiônico. Finalmente, o par de elétrons livres do nitrogênio da trietilamina irá atacar um próton do pré-produto, formando como produtos o ácido 2-palmitamidoetanossulfônico e o sal de trietilamina conjugada com um ânion cloreto que havia sido liberado, o cloreto de trietilamônio.





**Esquema 14 - Mecanismo de reação e formação do ácido 2-palmitamidoetanossulfônico (palmitato de taurina)**

O cloreto de palmitoila em meio aquoso sofre hidrólise formando o ácido palmítico, sendo este uma impureza na reação, além do cloreto de trietilamônio (esquema 15).



**Esquema 15 - Mecanismo de hidrólise do cloreto de palmitoila**

## **6.2) Observações durante o desenvolvimento do experimento e respectivas discussões**

Conforme fora citado na seção de metodologia, é observada uma diminuição no pH após a adição de cloreto de palmitoíla. Isto pode ser explicado por dois acontecimentos: o fato de o cloreto de palmitoíla sofrer hidrólise, de acordo com o esquema 15, liberando ácido palmítico e ácido clorídrico, que diminuem o pH; e o próprio ataque nucleofílico do grupamento amino da taurina no carbono carbonílico do cloreto de palmitoíla, ocasionando a liberação de um íon cloreto (esquema 14), que em meio aquoso forma HCl, também diminuindo o pH. Se o pH estiver ácido, a taurina vai estar com seu grupamento amino protonado e formará um sal com o cloreto liberado, sendo que o ataque no carbono carbonílico do cloreto de palmitoíla não acontecerá. Assim, a adição de porções de 1 mL de trietilamina irá garantir a manutenção de um pH básico.

A obtenção de um pH básico constante pode indicar que a reação já ocorreu por dois motivos: não há mais liberação de cloreto proveniente do ataque nucleofílico do grupamento amino da taurina no carbono carbonílico do cloreto de palmitoíla; e não há mais cloreto de palmitoíla disponível para sofrer hidrólise e gerar ácido palmítico e ácido clorídrico.

Uma vez terminada a reação, observa-se uma mistura reacional com aspecto opaco branco. Isto é caracterizado pela presença de um tensoativo no meio reacional, que provavelmente é o produto formado. A mistura reacional é colocada então em banho de gelo, para propiciar a precipitação do produto, que até então encontrava-se parcialmente dissolvido no meio aquoso aquecido. Com isso, o meio reacional turva-se ainda mais, com um aumento de sua viscosidade. Isso porque a baixa temperatura deve ter provocado a precipitação não só do

produto, mas também do cloreto de trietilamônio e do ácido palmítico, cujas formações foram explicadas anteriormente.

A seguir, como uma primeira etapa de purificação do produto, adiciona-se acetato de etila, justamente para extrair o ácido palmítico presente na mistura reacional. Porém, esta adição também ocasiona uma maior precipitação, que pode ser do cloreto de trietilamônio, insolúvel em acetato de etila. Este sistema é então filtrado, retirando assim o excesso de cloreto de trietilamônio. Forma-se então um sistema composto por apenas uma fase, apesar de termos ao mesmo tempo um ambiente aquoso (composto por água) e orgânico (composto por acetato de etila). Isso caracteriza uma emulsão, cujo agente tensoativo é o próprio produto. Para quebrar a emulsão, adiciona-se NaCl, que promove um aumento na densidade de fase aquosa, o que facilita sua separação como fase inferior. Observa-se também que há maior formação de precipitado com a adição de NaCl. Isso pode ser explicado pelo fato de esta adição aumentar a disponibilidade de ânions cloreto, proporcionando a formação do sal de cloreto de trietilamônio já descrita. Realiza-se então uma nova filtração, e a extração com acetato de etila é realizada mais duas vezes para retirar bem possível ácido palmítico que possa existir como impureza.

Ao final, de forma resumida, temos:

- purificação de excesso de sal de cloreto de trietilamônio, pela primeira filtração, pela adição de NaCl e pela segunda filtração;
- separação de ácido palmítico na fase orgânica

Portanto, teoricamente tem-se o produto final puro na fase aquosa. Assim deixa-se esta em geladeira para maior cristalização. Após filtração, deve-se lavar o sólido formado no papel de filtro com água gelada, para garantir a eliminação de sais amínicos (como os cloretos de trietilamônio e taurina). O produto lavado é colocado em estufa para secagem. O rendimento

obtido foi muito baixo, de 16,8%, o que é explicado pelo fato de parte do produto também estar presente nos cristalizados eliminados por filtração.

A título de observação, realizou-se também uma rotaevaporação da fase orgânica, para analisar o produto formado e se o mesmo seria ácido palmítico, conforme seria esperado.

### **6.3) Resultados dos procedimentos analíticos**

#### 6.3.1) Cromatografia em camada delgada (CCD)

Durante o desenvolvimento da reação e purificação foram realizadas 2 CCDs, sob as condições já descritas (fase móvel de 1 acetona:1 hexano e revelação com ninidrina)

- CCD 1: Realizada após o término da reação, utilizando como padrão taurina e eluindo junto com a mistura reacional. A mancha da taurina apresentou  $R_f = 0$ , enquanto a mistura reacional apresentou  $R_f = 0,4$ . A visualização destas manchas só foi possível a partir da revelação com ninidrina, que é um reagente utilizado para identificação de grupamentos amina. Portanto, verificamos que há sais de amina na mistura reacional, possivelmente o cloreto de trietilamônio, como já fora descrito.
- CCD 2: Realizada com o produto final. Não foram observadas manchas após revelação com ninidrina, o que é um bom sinal, já que o produto final não apresenta grupamentos amina, e estes indicam presença de impureza como sais de amina

Porém, é necessário realizar um teste após a CCD 2 para confirmar que a ausência de grupamentos amino realmente indica a formação do produto. Como o produto é uma amida, uma reação de hidrólise desta quebraria a ligação amídica, formando uma amina, sendo que esta pode ser caracterizada pela revelação com ninidrina. Assim, aplicou-se o procedimento descrito

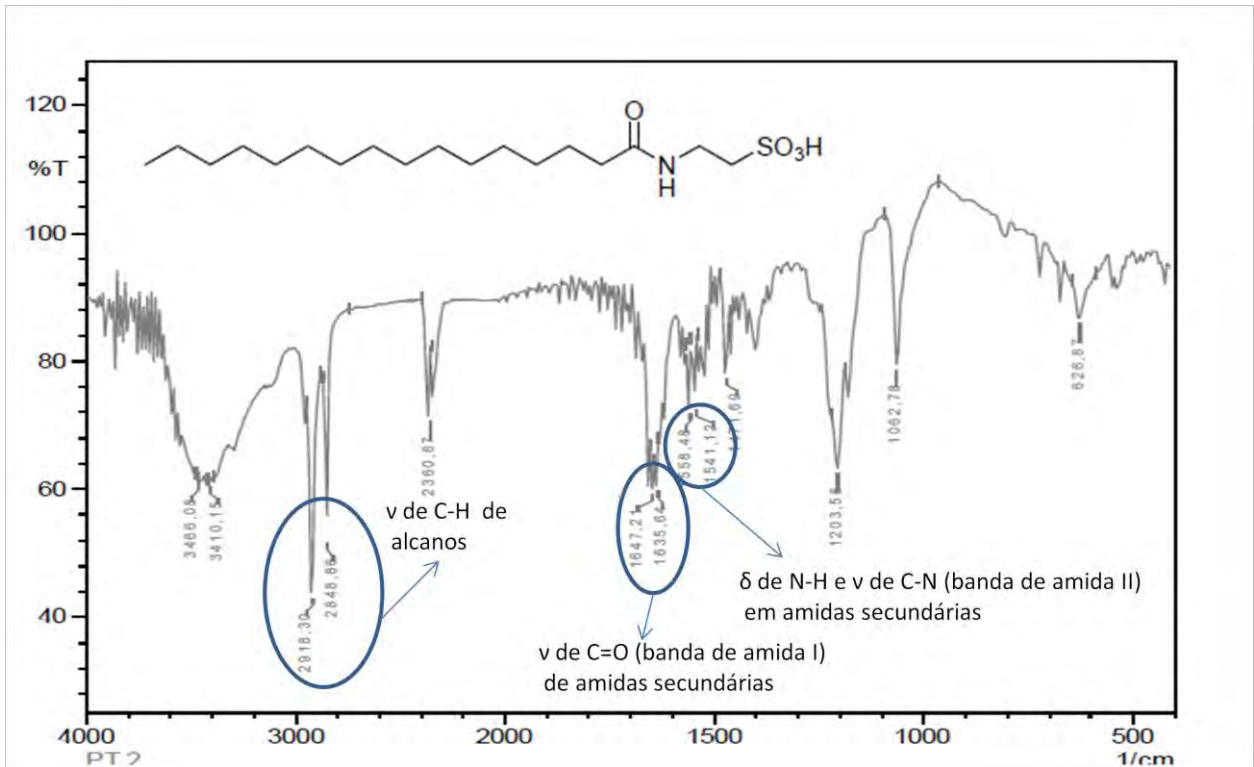
anteriormente. Observou-se, ao final da reação, a formação de uma fase orgânica e uma aquosa. Teoricamente, teremos a migração da amina formada (taurina) para a fase aquosa. Realizou-se então uma nova CCD, porém sem eluir, apenas aplicando as fases orgânica e aquosa e revelando com ninidrina. Isso bastou para observar a presença de uma mancha no local de aplicação da fase aquosa, o que indica a presença de taurina e que, portanto, o produto foi formado.

#### 6.3.2) Faixa de fusão

O produto apresentou uma faixa de fusão de 235-240°C. O fato de ser um valor intermediário entre os pontos de fusão do ácido palmítico (63-64°C) e da taurina (305°C) é um indicador positivo de formação do produto.

#### 6.3.3) Espectoscopia de absorção no infravermelho (IV)

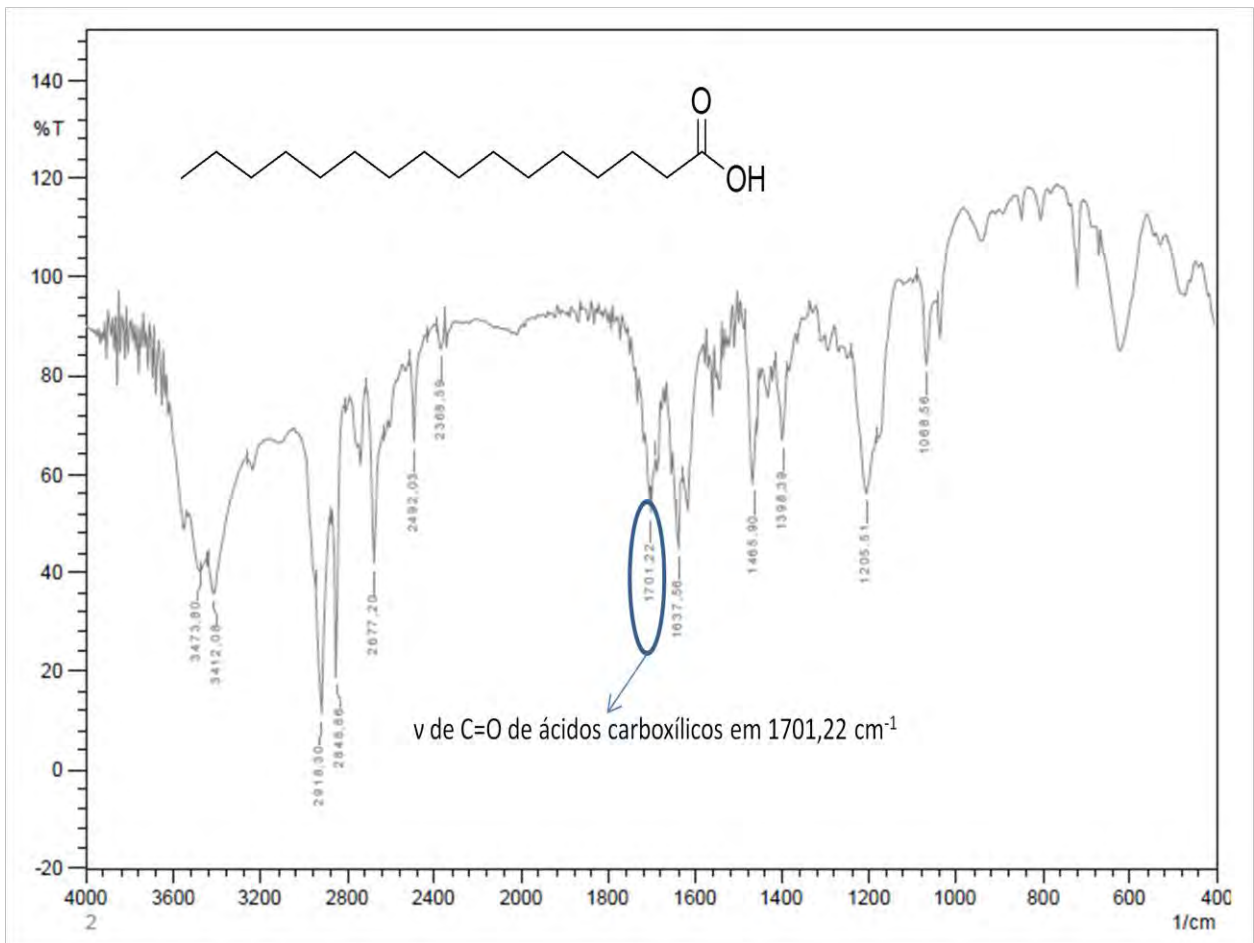
O produto final foi submetido a análise por IV, apresentando o seguinte perfil espectrométrico:



***Espectro 1 - Espectrofotometria de absorção no IV do ácido 2-palmitamidoetanossulfônico***

A análise espectroscópica de absorção no infravermelho do produto mostrou sinais de deformação axial ( $\nu$ ) de C-H de alcanos, com picos em  $2918,30\text{ cm}^{-1}$  e  $2848,86\text{ cm}^{-1}$ . Este tipo de deformação em alcanos é originado pela cadeia graxa presente na molécula. Observa-se também sinais de  $\nu$  de C=O (banda de amida I) de amidas secundárias, com picos em  $1647,21$  e  $1635,64\text{ cm}^{-1}$ . Também presentes são os picos de deformação angular ( $\delta$ ) de N-H e  $\nu$  de C-N (banda de amida II) em amidas secundárias, com absorção em  $1558,48\text{ cm}^{-1}$ .

O sub-produto obtido após rotaevaporação da fase orgânica também foi submetido a análise por IV, gerando o seguinte espectro:

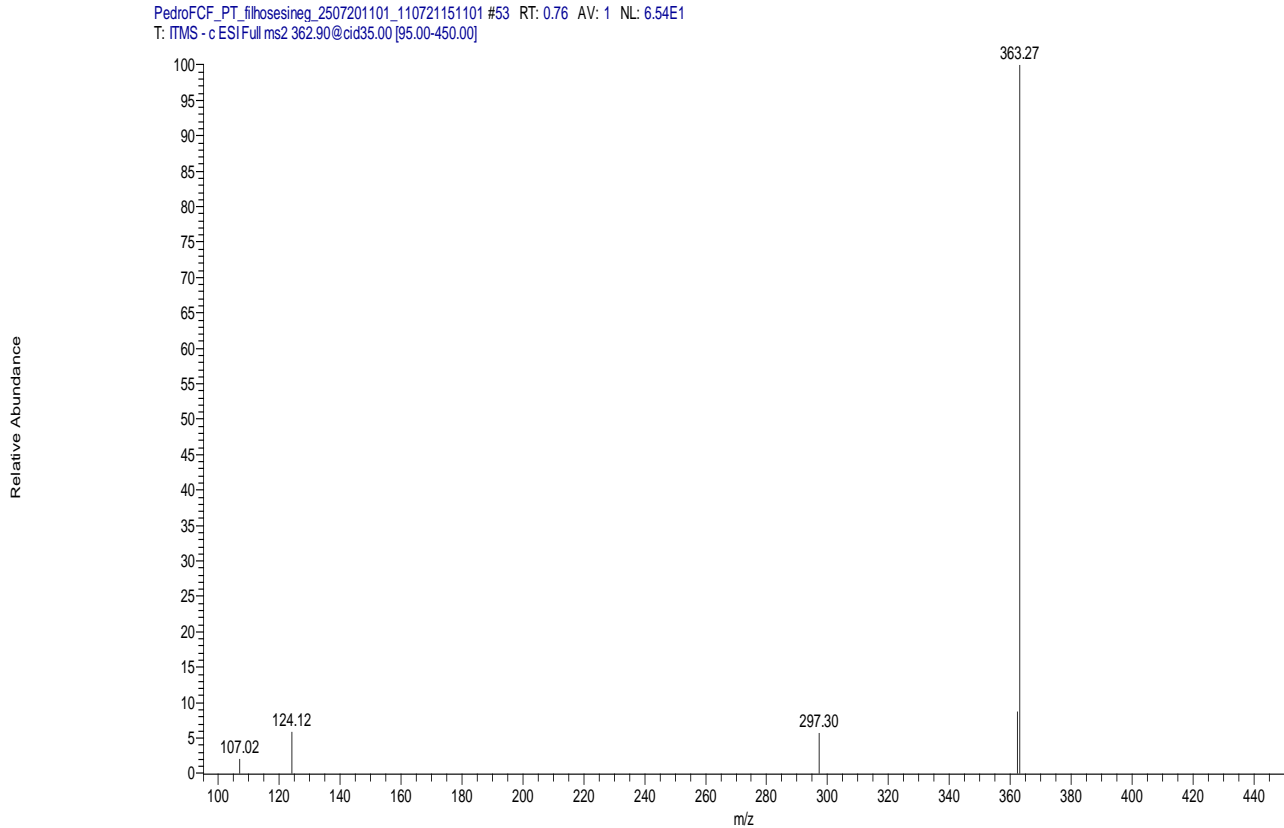


***Espectro 2 - Espectro do produto obtido com a rotaevaporação da fase orgânica***

Temos como uma diferença essencial neste espectro um pico de  $\nu$  de C=O de ácidos carboxílicos em  $1701,22 \text{ cm}^{-1}$ . Tal resultado confirma a presença de ácido palmítico, do qual realmente era desejada a separação na fase orgânica. As demais bandas indicadas no espectro 1 são observadas neste, sendo que, portanto, o produto também está contido no sólido obtido com a rotaevaporação da fase orgânica, porém em uma quantidade muito pequena.

### 6.3.4) Espectometria de massas (EM)

A partir da análise realizada foi obtido o seguinte espectro:

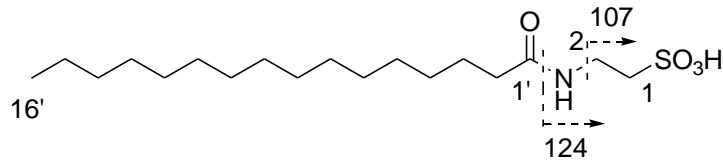


#### *Espectro 3 - Espectro de massas do ácido 2-palmitamidoetanossulfônico*

Como previsto, observou-se o pico do íon molecular ( $M^+$ ) em m/z igual a 363,27. A fragmentação para obtenção dos íons filhos resultou na formação de fragmentos de massa com picos em 297,30 (7); 124,12 (7) e em 107,02 (3) m/z.

A figura 14 indica as fragmentações moleculares mais facilmente identificadas no molécula.





**Figura 14 - Fragmentações moleculares do ácido 2-palmitamidoetanossulfônico obtidas em espectrometria de massa**

## 6) CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como principal meta a obtenção de um pró-fármaco derivado da taurina pelo acoplamento da molécula desta com uma cadeia carbônica palmítica, obtendo o ácido 2-palmitamidoetanossulfônico. Porém, durante o desenvolvimento desta tarefa, foi possível compilar informações bibliográficas sobre a taurina e sobre seus derivados, que permitiram o desenvolvimento de um método de síntese adequado para esta molécula.

Apesar do baixo rendimento, todos os testes analíticos confirmaram a obtenção do produto desejado.

Como uma abordagem futura, é de interesse o desenvolvimento de um melhor método de purificação do produto de modo a aumentar o rendimento. Fora isso, como já dito anteriormente, o ácido 2-palmitamidoetanossulfônico apresenta propriedades tensoativas, e seria muito interessante explorar tais propriedades em formulações cosméticas, onde teríamos além de um adjuvante surfactante, uma molécula bioativa como a taurina, com propriedades antioxidantes e antienvhecimento.

## 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKGUL, O.; KILIC, F. S.; EROL, K.; PABUCCUOGLU, V. Synthesis and Anticonvulsant Activity of Some *N*-Phenyl-2-phtalimidoethanesulfonamide Derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*, v. 340, p. 656-660, 2007.

ARAGÓN, C. M. G.; TRUDEAU, L. -E.; AMIT, Z. Effect of taurine on ethanol-induced changes in open-field locomotor activity. *Psychopharmacology*, v. 107, p. 337-340, 1992.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.;HOEY, B.M.;BUTLER, J.: The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.*, v. 6, n. 6, p. 593-597, 1989

BARUA, M.; YONG, L.; QUINN, M. R.: Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF-  $\alpha$  gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-  $\kappa$ B and I  $\kappa$ B activity. *J Immunol*, v. 167, p. 2275-2281, 2001.

BITTNER, S.; WIN, T.; GUPTA, R.  $\gamma$ -L-glutamyltaurine. *Amino Acids*, v. 28, p. 343-356, 2005.

CARUSO, F.; DARNOWSKI, J. W.; OPAZO, C.; GOLDBERG, A.; KISHORE, N.; AGOSTON, E. S.; ROSSI, M. Taurolidine Antiadhesive Properties on Interaction with *E. coli*; Its Transformation in Biological Environment and Interaction with Bacteria Cell Wall. *Plos one*, v. 5, n. 1. p. 1-10, 2010.

CHEN, F. M. F.; LEE, Y.; TEINAUER, R.; BENOITON, N. L. Mixed anhydrides in peptide synthesis. A study of urethane formation with a contribution on minimization of racemization.

*Can. J. Chem*, v. 65, p. 613-618, 1987.

CHEN, N.; JIA, W.; XU, J. A Versatile Synthesis of Various Substituted Taurines from Vicinal Amino Alcohols and Aziridines. *Eur. J. Org. Chem*, p. 5841-5846, 2009

CUNNINGHAM, C.; TIPTON, K. F.; DIXON, H. B. Conversion of taurine into N-chlorotaurine (taurine chloramine) and sulphoacetaldehyde in response to oxidative stress. *Biochem J*, p. 939-945, 1998.

D'OCA, C. R. M. *Síntese de novas benzilamidas graxas: estudo da influência da variação estrutural na atividade antituberculose*. 171f. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2010.

DEVLIN, T. M. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*, 6ª edição. São Paulo: Edgard Blucher, 2007, 1186p.

EBY, G; HALCOMB, W.W.: Elimination of cardiac arrhythmias using oral taurine with l-arginine with case histories: Hypothesis for nitric oxide stabilization of the sinus node. *Med Hypotheses*, v. 67, n. 5, p. 1200-1204, 2006.

FEUER, L.; FURKA, A.; SEBESTYEN, F.; SZEPESPATAKY, J. H.; DOBAY, E. B. Chinoin Gyogyszer es Vegyeszeti Termekek Gyara Rt. **Method of preparing gamma-L-glutamyl taurine**. US 4,324,743. 11 Jul. 1977, 13 Abr. 1982. United States Patent.

FRANCONI, F.; FAILLI, P.; STENDARDI, I.; MATUCCI, R.; BENNARDINI, F.; BACCARO, C.; GIOTTI, A. Positive inotropic effect of some taurine-related compounds on guinea-pig ventricular strips perfused with low calcium medium. *Eur J Pharmacol*, v. 124, p. 129-133, 1986.

GANONG, W. F.: Fisiologia Médica. 22<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, 796p.

GOROHOVISKY, S.; TEMTSI-KRAYZ, G.; BITTNER, S. Synthesis of N-quinonyltaurines. *Amino Acids*, v. 24, p. 281-287, 2002.

GREGOR, A.; RAMPLING, R.; AAPRO, M.; MALMSTRIIM, P.; WHITTLE, I. R.; RYE, R. STEWART, M.; ROBIN, S.; DEMIERRE, B.; IRONside, J. W.; WAHLBY, S.; SMYTH, J. F. Phase II Study of Tauromustine in Malignant Glioma. *Eur J Cancer*, v. 28A, n. 12, p. 1959-1962, 1992.

GUPTA, R. C.; WIN, T.; BITTNER, S. Taurine Analogues; A New Class of Therapeutics: Retrospect and Prospects. *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 2021-2039, 2005.

HANSEN, S. H. The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications.

*Diabetes Metab Res Rev*, v. 17, n. 5, p. 330-346, 2001.

JANEKE, G; SIEFKEN, W; CARSTENSEN, S; BLECK, O; STEINHART, H; HÖGER, P;

WITTERN, C-P; WENCK, H ; STÄB, F; SAUERMAN, G; SCHREINER, V; DOERING, T. :

Role of Taurine Accumulation in Keratinocyte Hydration. *J Invest Dermatol*, v. 121, p. 354-361, 2003.

JUNG, Y. J.; KIM, H. H.; KONG, H. S.; KIM, Y. M. Properties of 5-Aminosalicyl-aurine as a

Colonspecific Prodrug of 5-Aminosalicylic Acid. *Arch Pharm Res*, v. 26, n. 4, p. 264-269, 2003.

LIDLAW, S. A.; DIETRICH, M. F.; LAMTEZAN, M. P.; VARGAS, H. I.; BLOCK, J. B.;

KOPPLE, J. D. Antimutagenic Effects of Taurine in a Bacterial Assay System. *Can Res*, v. 49, p.

6600-6604, 1989.

LINDÉN, I. B.; GOTHÓNI, G.; KONTRO, P.; OJA, S. S. Anticonvulsant Activity of 2-

Phthalimidoethanesulfonamides: New Derivatives of Taurine. *Neurochem Int*, v. 5, n. 3, p. 319-

324, 1983.

LOMBARDINI, J. B.; PROPS, C. Analogues of taurine as inhibitors of the phosphorylation of an

-20K molecular weight protein present in a mitochondrial fraction of the rat retina. *Amino Acids*,

v. 13, p. 115-130, 1997.

LOMBARDINI, J. B. Taurine: retinal function. *Brain Res Rev*, v. 16, p. 151-169, 1991.

LOPES, C. R. L.; D'OCA, C. R. M.; DUARTE, R. C.; KURZ, M. H. S.; PRIMEL, E. G.; CLEMENTIN, R. M.; VILLARREYES, J. A. M.; D'OCA, M. G. M. Síntese de novas amidas graxas a partir da aminólise de ésteres metílicos. *Quim Nova*, v. 33, n. 6, p. 1335-1341, 2010.

LOUZADA, P. R.; LIMA, A. C. P.; MENDONÇA-SILVA, D. L.; NOEL, F.; MELLO, F.G. AND FERREIRA, S. T.: Taurine prevents the neurotoxicity of  $\beta$ -amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders. *The FASEB Journal*, v. 18, p. 511-518, 2004.

MAHER, S. G.; CONDRON, C. E. M.; BOUCHIER-HAYES, D. J.; TOOMEY D. M.: Taurine attenuates CD3/interleukin-2-induced T cell apoptosis in an *in vitro* model of activation-induced cell death (AICD). *Clin Exp Immunol*, v. 139, n. 2, p. 279-286, 2005

MAUGARD, T.; REMAUD-SIMEON, M.; PETRE, D.; MONSAN, P. Lipase-catalysed production of N-oleoyl-taurine sodium salt in non-aqueous medium. *Biotechnol Lett*, v. 19, n. 8, p. 751-753, 1997.

MCKINNEY, M. K.; BANDELL, M.; PATAPOUTIAN, A.; CRAVATT, B. F.: Structure-Based Design of a FAAH Variant That Discriminates between the *N*-Acyl Ethanolamine and Taurine Families of Signaling Lipids. *Biochemistry*, v. 45, n. 30, p. 9007-9015, 2006.

MIZUSHIMA, S.; NARA, Y.; SAWAMURA, M.; YAMORI, Y. Effects of oral taurine supplementation on lipids and sympathetic nerve tone. *Adv Exp Med Biol*, v. 403, p. 645-622, 1996.

MOHRI, K.; OKADA, K.; BENET, L. Z. Stereoselective metabolism of benoxaprofen in rats. Biliary Excretion of Benoxaprofen Taurine Conjugate and Glucuronide. *Drug Metabol Dispos*, v. 26, n. 4, p. 332-337, 1998.

OJA, S. S.; SARANSAARI, P. Pharmacology of Taurine. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, v. 50, p.8-15, 2007.

OLIVE, M. F.; NANNINI, M. A.; OU, C. J.; KOENIG, H. N.; HODGE, C. W. Effects of acute acamprosate and homotaurine on ethanol intake and ethanol-stimulated mesolimbic dopamine release. *Eur J Pharmacol*, v. 467, p. 55-61, 2002.

OLSON, J. E.; MARTINHO, E. J. Regulation of taurine transport in rat hippocampal neurons by hypo-osmotic swelling. *J Neurochem*, v. 96, n. 5, p. 1375-1389, 2006.

SAGHATELIAN, A.; MCKINNEY, M. K.; BANDELL, M.; PATAPOUTIAN, A.; CRAVATT, B. F. A FAAH-Regulated Class of *N*-Acyl Taurines That Activates TRP Ion Channels. *Biochemistry*, v. 45, n. 30, p. 9007-9015, 2006.

SALIMAKI, J.; SCRIBA, G.; PIEPPONEN, T.P.; RAUTOLAHTI, N.; ATHEE, L. The effects of systemically administered taurine and *N*-pivaloyltaurine on striatal extracellular dopamine and

taurine in freely moving rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, v. 368, p. 134-141, 2003.

SAPRONOV, N. S.; KHNYCHENKO, L. K.; POLEVSHCHIKOV, A. V. Effects of New Taurine Derivatives on Primary Immune Response in Rats. *Bull Exp Biol Med*, v. 131, n. 2, p. 174-177, 2001.

SEEBERGER, S.; GRIFFIN, R. J.; HARDCASTLE, I. R.; GOLDING, B. T. A new strategy for the synthesis of taurine derivatives using the „safety-catch“ principle for the protection of sulfonic acids. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 5, p. 132-138, 2006

SIMON, A.; AMMANN, R. A.; WISZNIEWSKY, E. B.; FLEISCHHACK, G.; BESUDEN, M. M. Taurolidine-citrate lock solution (TauroLock) significantly reduces CVAD-associated grampositive infections in pediatric cancer patients. *BMC Infectious Diseases*, v. 102, p. 1-8, 2008.

STIPANUK, M. H.: Role of the liver in regulation of body cysteine and taurine levels: a brief review. *Neurochem Res*, v. 29, n. 1, p. 105-110, 2004.

SUZUKI, T. T.; WADA, T.; SAIGO, K.; WATANABE, K.: Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J*, v. 21, p. 6581-6589, 2002.

UEKI, I.; STIPANUK, M. H. Enzymes of the Taurine Biosynthetic Pathway Are Expressed in Rat Mammary Gland. *J Nutri*, v. 137, n. 8, p. 1887-1894, 2007.



UOZUMI, Y.; ITO, T.; HOSHINO, Y.; MOHRI, T.; MAEDA, M.; TAKAHASHI, K.; FUJIO, Y.; AZUMA, J. Myogenic differentiation induces taurine transporter in association with taurine-mediate cytoprotection in skeletal muscles. *Biochem J*, v. 394, p. 699-706, 2006.

USIFOH, C. O.; LAMBERT, D. M.; WOUTERS, J.; SCRIBA, G. K. E. Synthesis and anticonvulsant activity of N,N-phthaloyl derivatives of central nervous system inhibitory amino acids. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem*, v. 334, p. 323-331, 2001.

WANG, F.; YE, J.H.; KRNJEVIC, K. ; WANG, W.; XIONG, Z. G.; ZHANG, J. Presynaptic glycine receptors on GABAergic terminals facilitate discharge of dopaminergic neurons in ventral tegmental area. *J Neurosci*, v. 24, n. 41, p. 8961-8974, 2004.

WATSON, R. W.; REDMOND, H. P. ; WANG, J. H. ; BOUCHIER-HAYES D. Mechanisms involved in sodium arsenite-induced apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol*, v. 60, n. 5, p. 625-632, 1996.

WHARTON, B. A.; MORLEY, R.; ISAACS, E.B.; COLE, T.J.; LUCAS, A.: Low plasma taurine and later neurodevelopment. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*, v. 89, n. 6, p. 497-498, 2004

WHITEMAN, M.; ROSE, P.; SIAU, J. L.; HALLIWELL, B.: Nitrite-mediated protection against hypochlorous acid-induced chondrocyte toxicity: a novel cytoprotective role of nitric oxide in the inflamed joint? *Arthritis Rheum*, v. 48, n. 11, p. 3140-3150, 2003.

WYATT, E.L., SUTTER, S.H., DRAKE, L. A; Farmacologia Dermatológica. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ª Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007, p. 1519-1521

XIA, J.; NNANNA, I. A.; SAKAMOTO, K. Amino Acid Surfactants: Chemistry, Synthesis, and Properties. In: NNANNA, I. A.; XIA, J. *Protein-Based Surfactants: Synthesis, Physicochemical Properties, and Applications*. New York: Marcel Dekker Inc, 2001, p. 75-122.

ZHANG, M.; IZUMI, I.; KAGAMIMORI, S.; SOKEJIMA, S.; YAMAGAMI, T.; LIU, Z.; QI, B. Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids*, v. 26, n. 2, p. 203-207, 2004.

# ANEXO A – ESQUEMA DE SÍNTESE DA MOLÉCULA DE $\gamma$ -L-GLUTAMILTAURINA

