UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Antichagásicos e leishmanicidas potenciais: estudo das condições de síntese de pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona

Soraya da Silva Santos

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Antichagásicos e leishmanicidas potenciais: estudo das condições de síntese de pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona

Soraya da Silva Santos

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora:

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Soraya da Silva
S237a Antichagásicos e leishmanicidas potenciais: estudo das condições de síntese de pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona / Soraya da Silva Santos. -- São Paulo, 2016.
243p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo. Departamento Farmácia.
Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Leishmania 3. Polímeros sintéticos 4. Doença de Chagas I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

Soraya da Silva Santos

Antichagásicos e leishmanicidas potenciais: estudo das condições de síntese de pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
orientadora/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICO ESTE TRABALHO

A Deus, por me proteger e iluminar sempre o meu caminho.

Agradeço por permitir a conclusão de mais uma fase tão importante na minha vida, por todas as experiências e desafios proporcionados nessa trajetória. Muito obrigada por tudo que já conquistei e peço sua benção para eu possa conquistar muito mais.

À minha família:

Aos meus queridos e amados pais, Alencastro Oliveira Santos e Maria Aparecida da Silva Santos, pelos esforços, exemplos e todos os ensinamentos ao longo da minha vida. Muito obrigada por todo amor, apoio, dedicação, força, torcida e por sempre respeitarem as minhas escolhas. Não tenho palavras para agradecer e descrever o que vocês representam para mim!!!.. Meus queridos, eu tenho muito orgulho de ser filha desse casal tão batalhador. Esta conquista, também, é de vocês.

À minha querida irmã, Vanessa da Silva Santos, minha melhor amiga e companheira, por toda amizade, incentivo, cumplicidade e com quem sempre pude contar em todos os instantes.

Às minhas cachorrinhas, "minha trupe", Bolinha (in memorian) e Lavínia (in memorian). Que saudade eu sinto de vocês... À Vivi e Nina, minhas companheiras caninas que alegram a minha casa todos os dias, "a galera animal", que me acompanha nos momentos de estudo.

Ao meu noivo e companheiro, Leanderson Renato Poli, "meu eterno namorado", por todo amor, respeito, paciência e incentivo. Muito obrigada por sua compreensão nos momentos de ausência e apoio dedicado em todos os momentos durante esses anos.

Muito obrigada por serem a minha base, o meu refúgio e alegrarem a minha vida!

"Família não é uma coisa importante. É tudo!"

Michael James Fox

À minha orientadora e "mãe científica", Professora Titular Elizabeth Igne Ferreira, a quem terei sempre muito carinho e gratidão. Grande exemplo de conduta pessoal e profissional, que foi e é muito mais que orientadora. Agradeço a oportunidade de ter sido sua aluna, por acreditar e lutar por mim nesta trajetória. Muito obrigada pela realização deste sonho, por todo o apoio, amizade e ensinamentos científicos e pessoais ao longo de todos esses anos.

"Ensinar não é transferir conhecimento,
mas criar as possibilidades para a sua
produção ou a sua construção."

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Química da Tulane University, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À FAPESP, pelo auxíílio financeiro.

Ao meu assessor da FAPESP, por todas as sugestões que enriqueceram este estudo.

Ao Professor Associado Scott M. Grayson, por abrir as portas do seu laboratório durante o meu estágio sanduíche. Muito obrigada por todos os ensinamentos, sugestões e discussões científicas, que foram enriquecedoras nesta jornada.

À Profa. Dra. Jeanine Giarolla, amiga e colaboradora direta neste trabalho. Muito obrigada por toda a parceria, incentivo, conselhos, apoio e amizade que transcende ao laboratório.

Aos Professores Dr. Reinaldo Camino Bazito e Dra. Claudete Justina Valduga, pelos ensinamentos e valiosas contribuições no exame de qualificação. Vocês contribuíram muito com esta pesquisa.

Aos professores Dr. Roberto Parise filho e Dra. Carlota Rangel Yagui, pela convivência, ensinamentos e amizade.

Aos Drs. Caroline da Costa Silva, Fabrício Vargas, Marco Aurélio Graça Arribas e Márcio Henrique Zaim, por todas as discussões sintéticas, auxílio e conhecimento, importantes para o trabalho e para minha formação sintética.

Às minhas amigas, Vanessa Almeida Otelo e Andressa Polidoro, por toda amizade e incentivo mesmo de longe. Saudade de vocês...

Aos alunos de iniciação científica Heloisa Fernanda Augusto, Jorge Luiz Alves, Renan Sousa Silva, Stefani Fernanda Silva Figueiredo, Esther Letícia Amorim Ribeiro e Renan Augusto Gomes, que contribuíram muito para a minha formação e no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos colegas de laboratório, Ana Luisa Cadore, Bruna Araújo, Débora Savino, Diego Campos Prieto, Filipe Gomes, Fredson Silva, Guilherme Dutra, Jennifer Midori, João Vítor da Silva, José Domingos, Júlia Kassab, Lorena Paes, Marina Primi, Natanael Segretti, Ricardo Serafim e Rodrigo Vieira Gonzaga, pela ótima convivência, amizade e troca de experiências.

Ao Charles de Lima Brito pela amizade e todo o suporte técnico. À Maria Inês de Almeida Gonçalves, pelo auxílio nas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Aos colegas de laboratório da Tulane University, pelos ensinamentos e colaboração.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Kelma, Bete e David, pelo carinho e amizade, sempre prestativos e atenciosos.

A Vivian Spíer, Eveline Zanetti e Gaby Diaz por terem sido a minha família durante a minha estadia nos Estados Unidos e a todos que contribuíram durante esse momento tão especial.

A todos da minha família e amigos que, de uma forma ou de outra, torceram por mim e colaboraram na realização desta vitória.

A todos vocês, muito obrigada!!!..

"O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar e de correr o risco de viver seus sonhos."

Paulo Coelho

SANTOS, S.S. **Antichagásicos e leishmanicidas potenciais: estudo das condições de síntese de pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona.** 2016. 243p. Tese – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doença de Chagas e a leishmaniose são doenças tropicais supernegligenciadas, que afetam regiões de extrema pobreza. Os fármacos disponíveis para estas duas doenças são escassos, de eficácia limitada, de alta toxicidade e suscitam casos de resistência. OBJETIVO: Considerando-se a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antichagásicos e leishmanicidas, a importância da latenciação no aprimoramento de fármacos/compostos bioativos e a versatilidade de transportadores dendriméricos, o objetivo deste trabalho foi a síntese de pró-fármacos dendriméricos de primeira geração de 3-hidroxiflavona, composto que apresenta potencial atividade tripanomicida e leishmanicida. Desta forma, pretendeu-se obter liberação controlada, melhora da permeabilidade, toxicidade reduzida e aumento da eficácia deste agente bioativo. MATERIAL E MÉTODOS: Para a obtenção desses dendrímeros empregaram-se as abordagens divergente e convergente, compostas por várias etapas de síntese com reações de proteção, desproteção e acoplamentos. RESULTADOS E DISCUSSÃO: A abordagem convergente apresentou problemas sintéticos, devido à instabilidade dos derivados contendo 3-hidroxiflavona nas diferentes condições reacionais e de purificação testadas. No entanto, há indícios da síntese dos pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona, mas esses compostos apresentam-se impuros. Devido a essa instabilidade e a dificuldade de purificação na abordagem convergente, optou-se pela síntese divergente, no qual o composto bioativo é acoplado na etapa final. Os estudos sintéticos mostraram a obtenção dos intermediários puros formados pelos focos centrais propano- e hexano-diamina acoplados ao ácido málico protegido. CONCLUSÃO: Há indicativos da obtenção de pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona, ainda que impuros. As maiores dificuldades encontradas foram a purificação e a estabilidade dos compostos obtidos.

Palavras-chaves: flavonóides, pró-fármacos, latenciação, dendrímeros.

SANTOS, S.S. **Potential antichagasic and leishmanicide compounds: study of synthesis conditions of 3-hydroxyflavone dendrimer prodrugs.** 2016. 243p. Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2016.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chagas' disease and leishmaniasis are super neglected tropical diseases that affect primarily areas of extreme poverty. The drugs available for these diseases are scarce and of limited effectiveness, toxic and rouse resistance. OBJECTIVE: Considering that the development of new antichagasic and leishmanicide agents are urgently needed, the importance of prodrug design to the improvement of drugs and bioactive compounds and the versatility of dendrimers as drug carriers, the objective of this work was the synthesis of dendrimer prodrug of 3-hydroxyflavone, which shows potential antichagasic and leishmanicide activities. Thus, we intended to obtain controlled release, improvement of the permeability, reduction of the toxicity and increase of efficacy of this bioactive agent. MATERIAL AND METHODS: Convergent and divergent approaches have been used to synthesize those compounds. Synthetic steps consist of protection, deprotection and coupling reactions. RESULTS AND DISCUSSION: The convergent approach presented problems due to the instability of the 3-hydroxyflavone derivatives, in different reaction and purification conditions. However, there is evidence of the synthesis of dendrimer prodrugs, though still impure. Due to instability and purification difficulty of intermediate, we performed the divergent synthesis. We obtained the pure intermediates composed by cores propanediamine and hexanediamine coupled to the protected malic acid as spacer group. CONCLUSION: Synthetic studies suggested the synthesis of dendrimer prodrugs, although impure. The greatest difficulties were the purification and the instability of compounds.

Keywords: flavonoid, prodrug, prodrug design, dendrimer.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	02
1.1	Doença de Chagas	02
1.1.1	Agente etiológico	02
1.1.2	Vetor e transmissão	03
1.1.3	Epidemiologia	04
1.1.4	Manifestações clínicas	07
1.1.5	Diagnóstico	10
1.1.6	Quimioterapia	11
1.1.6.1	Fármacos utilizados	11
1.1.6.2	Compostos em estudo	15
1.1.6.2.1	Inibidores da biossíntese de ergosterol	15
1.1.6.2.2	Inibidores de cisteíno-proteases	16
1.1.6.2.3	Inibidores de farnesiltransferase	16
1.1.6.2.4	Complexos de rutênio	17
1.1.7	Vacinas	17
1.2	Leishmaniose	18
1.2.1	Agente etiológico	19
1.2.2	Vetor e transmissão	20
1.2.3	Epidemiologia	21
1.2.4	Diagnóstico	23
1.2.5	Manifestações clínicas	25
1.2.5.1	Leishmaniose tegumentar americana	25
1.2.5.2	Leishmaniose visceral	26
1.2.6	Quimioterapia	27
1.2.6.1	Antimoniais pentavalentes	28
1.2.6.2	Anfotericina B	29
1.2.6.3	Pentamidina	31
1.2.6.4	Miltefosina	31
1.2.6.5	Paromomicina	33
1.2.6.6	Compostos em estudo	34

1.2.6.6.1 Alopurinol..... 34
1.2.6.6.2 Inibidores da síntese de ergosterol..... 34
1.2.6.6.3 Azitromicina..... 35
1.2.6.6.4 Sitamaquina..... 35
1.2.7 Vacinas..... 36
1.3 Produtos naturais como protótipos de fármacos: flavonoides - 3-hidroxiflavona..... 39
1.4 Latenciação..... 42
1.5 Dendrímeros no transporte de fármacos..... 47
2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA..... 55
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 62
3.1 Material..... 62
3.1.1 Reagentes e solventes..... 62
3.1.2 Equipamentos..... 64
3.2 Métodos..... 65
3.2.1 Síntese..... 66
3.2.1.1 Síntese dos espaçantes protegidos (ácido málico e ácido glutâmico protegido)..... 66
3.2.1.2 Síntese dos pró-fármacos dendriméricos – método divergente..... 67
3.2.1.2.1 Síntese do anidrido do AMP..... 67
3.2.1.2.2 Síntese dos intermediários I (IA e IE), partindo do anidrido do AMP (foco central e AMP) 67
3.2.1.2.3 Síntese do intermediário I, partindo do ácido málico protegido (foco central e AMP) – métodos D, E, F, G e H..... 70
3.2.1.2.4 Síntese do pró-fármaco dendrimérico contendo isoniazida como modelo, a partir do intermediário I por aminólise da lactona..... 75
3.2.1.3 Síntese dos pró-fármacos dendriméricos – método convergente..... 76

3.2.1.3.1 Síntese do intermediário II (3-hidroxiflavona e ácido málico protegido)..... 76
3.2.1.3.2 Desproteção do intermediário II, obtenção intermediário III..... 77
3.2.1.3.3 Ligação do intermediário III ao foco central etilenodiamina..... 78
3.2.1.3.4 Ligação do intermediário III ao foco central etilenoglicol..... 78
3.2.1.4 Síntese de pró-fármacos dendriméricos – outras abordagens. 79
3.2.1.4.1 Síntese do intermediário IV (ácido succínico e propanodiamina) – Método O..... 79
3.2.1.4.2 Síntese de pró-fármacos a partir do intermediário IV..... 81
3.2.1.5 Síntese de pró-fármacos dendriméricos derivados dos ácidos 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico (*Bis*MPA) e 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico (*Bis*MBA)..... 83
3.2.1.5.1 Proteção do ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico..... 84
3.2.1.5.2 Proteção do ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico..... 84
3.2.1.5.3 Síntese do anidrido do *Bis*MPAP e *Bis*MBAP..... 85
3.2.1.5.4 Síntese do intermediário *Bis*MBAP e propanodiamina, partindo do anidrido do *Bis*MBAP..... 85
3.2.1.5.5 Síntese do intermediário *Bis*MPAP e focos centrais, partindo do anidrido do *Bis*MPAP..... 86
3.2.1.5.6 Desproteção do intermediário *Bis*MPAP e foco central (intermediários VA e VB)..... 87
3.2.1.5.7 Funcionalização dos agentes bioativos..... 88
3.2.2 Métodos de análise dos compostos obtidos..... 91
3.2.2.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)..... 91
3.2.2.2 Espectrofometria no Infravermelho (IV)..... 91
3.2.2.3 Espectrometria de massas MALDI-ToF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*)..... 91
3.2.2.4 Análise Cromatográfica..... 92
3.2.2.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)..... 92
3.2.2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..... 92
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 94

4.1	Síntese dos agentes espaçantes protegidos.....	94
4.1.1	Síntese do ácido málico protegido.....	94
4.1.2	Síntese do ácido glutâmico protegido.....	99
4.2	Síntese do anidrido do ácido málico protegido.....	100
4.3	Síntese dos pró-fármacos dendriméricos – método divergente.....	106
4.3.1	Síntese dos intermediários I (foco central e AMP), a partir do anidrido do ácido málico protegido.....	107
4.3.1.1	Método A – experimentos A1, A2 e A3.....	108
4.3.1.2	Método B.....	112
4.3.2	Síntese do intermediário IE (núcleo monopentaeritritol), a partir do anidrido do AMP.....	113
4.3.3	Síntese do intermediário I, partindo do ácido málico protegido (foco central e AMP) – métodos D, E, F, G e H.....	118
4.3.3.1	Método D – método do anidrido misto.....	118
4.3.3.2	Método E – utilizando cloretos de acila.....	120
4.3.3.3	Método F, G e H – utilizando agentes condensantes.....	129
4.3.3.4	Método I – síntese do intermediário IA, utilizando DCC, como agente condensante	135
4.3.3.5	Métodos J, L e M – síntese dos intermediários IB, IC e ID, utilizando DCC, como agente condensante.....	141
4.3.4	Síntese do pró-fármaco dendrimérico contendo isoniazida, a partir do intermediário I por aminólise da lactona.....	146
4.4	Síntese dos pró-fármacos dendriméricos – método convergente.....	151
4.4.1	Síntese do intermediário II.....	151
4.4.2	Desproteção do intermediário II, obtenção do intermediário III	156
4.4.3	Ligação do intermediário III ao foco central etilenodiamina.....	160
4.4.4	Ligação do intermediário III ao foco central etilenoglicol.....	162
4.5	Síntese dos pró-fármacos dendriméricos – outras abordagens.....	164

4.5.1 Síntese do intermediário IV (ácido succínico e propanodiamina)..... 164
4.5.1.1 Síntese de pró-fármacos a partir do intermediário IV..... 167
4.5.1.1.1 Método P..... 167
4.5.2 Síntese de pró-fármacos dendriméricos derivados dos ácidos 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico (*Bis*MPA) e 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico (*Bis*MBA)..... 169
4.5.2.1 Proteção dos ácidos 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico e 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico – Síntese dos ácidos benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)propiônico e benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)butírico.. 170
4.5.2.1.1 Proteção do ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico..... 171
4.5.2.1.2 Proteção do ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico..... 174
4.5.2.2 Síntese do anidrido do *Bis*MPAP e *Bis*MBAP..... 177
4.5.2.2.1 Síntese do anidrido do *Bis*MPAP..... 177
4.5.2.2.2 Síntese do anidrido do *Bis*MBAP..... 180
4.5.2.3 Síntese do intermediário *Bis*MBAP e propanodiamina, partindo do anidrido do *Bis*MBAP..... 183
4.5.2.4 Síntese do intermediário *Bis*MPAP e foco central, partindo do anidrido do *Bis*MPAP..... 184
4.5.2.4.1 Síntese do intermediário *Bis*MPAP e propanodiamina..... 185
4.5.2.4.2 Síntese do intermediário *Bis*MPAP e butanodiamina..... 188
4.5.2.4.3 Síntese do intermediário *Bis*MPAP e hexanodiamina..... 192
4.5.2.5 Desproteção por hidrogenólise dos intermediários *Bis*MPAP e foco central..... 194
4.5.2.5.1 Desproteção do intermediário *Bis*MPAP-PDA, obtenção do intermediário *Bis*MPA-PDA..... 194
4.5.2.5.2 Desproteção do intermediário *Bis*MPAP-BTDA, obtenção do intermediário *Bis*MPA-BTDA..... 197
4.5.2.6 Funcionalização dos agentes bioativos..... 200
4.5.2.6.1 Síntese do hemissucinato de 3-hidroxiflavona..... 200
4.5.2.6.2 Síntese do hemissucinato de metronidazol..... 203

4.5.2.6.3 Síntese do intermediário AMP e metronidazol..... 206
4.5.2.6.4 Síntese da hemissucinamida de isoniazida..... 208
5 CONCLUSÕES..... 213
6 PERSPECTIVAS..... 215
7 REFERÊNCIAS..... 217
8 ANEXO I – Instruções para os membros de banca julgadora.. I
9 ANEXO II – Ficha do aluno..... III
10 ANEXO III – Currículo Lattes..... VI

Introdução

"O conhecimento é uma ferramenta, e como todas as ferramentas, o seu impacto está nas mãos de quem o usa."

Dan Brown

1. **INTRODUÇÃO**

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A tripanossomíase americana é, também, conhecida como doença de Chagas em homenagem ao seu descobridor, o médico e pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, que a descobriu em 1909. Carlos Chagas descreveu o agente etiológico, ciclo evolutivo, vetores, animais reservatórios, mecanismo de transmissão, bem como as manifestações clínicas do primeiro caso humano registrado. No entanto, estudos paleoparasitológicos demonstraram a presença do parasita em tecidos de múmias datadas de 9.000 anos atrás, em regiões costeiras do norte do Chile. Esta doença é antropozoonose importante, resultante da infecção causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, tendo insetos triatomíneos como vetores (LESCURE et al., 2010; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; MACHADO et al., 2012; SALOMON, 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; SÁNCHEZ, RAMÍREZ, 2013; GASPAR et al., 2015; URBINA, 2015).

O ano de 2009 marcou o centenário da descoberta da doença e, em reconhecimento a este evento, reuniões científicas foram realizadas para discussão do tema e muitas revistas publicaram opiniões sobre vários aspectos da doença de Chagas (MACHADO et al., 2012). Esta patologia é a infecção parasitária mais grave que acomete o coração (LESCURE et al., 2010; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; SALOMON, 2012).

1.1.1 **Agente etiológico**

Trypanosoma cruzi é um protozoário hemoflagelado do filo *Sarcomastigophora*, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastidae*,* família Trypanosomatidae*,* gênero *Trypanosoma*, subgênero *Schizotrypanum* (RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; SCHMIDT et al., 2014; ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014; GASPAR et al., 2015; MESSENGER, MILES, BERN, 2015; URBINA, 2015).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* é complexo: o protozoário apresenta quatro formas de desenvolvimento no vetor e no hospedeiro reservatório mamífero (tripomastigotas sanguíneos, amastigotas intracelulares, epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos). No triatomíneo, as formas tripomastigotas ingeridas do sangue do hospedeiro ou animal

reservatório mamífero se diferenciam em epimastigotas, que se dividem por divisão binária e, posteriormente, são convertidas a tripomastigotas metacíclicos (forma infectante), que ficam no intestino. Ao picar o hospedeiro, o mosquito defeca e deposita a forma infecciosa na pele. A infecção no mamífero acontece quando a forma metacíclica entra em contato com as mucosas (oral ou nasal) ou com a ferida na pele, incluindo a picada do vetor. Ao invadir o hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos entram nas células hospedeiras (macrófagos, células do músculo estriado e fibroblastos) e diferenciam-se em amastigotas (forma intracelular), que começam a replicação por divisão binária, formando pseudocistos. Quando as células estiverem cheias de amastigotas, estas se diferenciam, novamente, em tripomastigotas e promovem a lise celular. Após a ruptura, os tripomastigotas atingem a corrente sanguínea e podem invadir tecidos adjacentes, principalmente células musculares (tecido cardíaco, liso e esquelético) e células ganglionares. O ciclo é concluído quando tripomastigotas circulantes no sangue do hospedeiro são ingeridos pela picada do vetor (ANDRADE, 1999; COURA, PEREIRA, 2010; FERREIRA et al., 2010; MARIN et al., 2011; SALOMON, 2012; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; MACHADO et al., 2012; COURA, PEREIRA, 2012; NAGAJYOTHI et al., 2012; OSÓRIO et al., 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; SÁNCHEZ, RAMÍREZ, 2013; WHO, 2016a; CHATELAIN, 2015; GASPAR et al., 2015; MESSENGER, MILES, BERN, 2015).

1.1.2 **Vetor e Transmissão**

A principal forma de transmissão ocorre através da picada de insetos hematófagos, os triatomíneos, vulgarmente conhecidos como ”barbeiro”. Os vetores responsáveis pela transmissão da doença de Chagas pertencem ao filo *Arthropoda*, subfilo *Hexapoda*, ordem Hemiptera, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae.* Esta subfamília é representada por 137 espécies descritas, mas apenas sete figuram como principais vetores da doença: *Triatoma infestans* (principal inseto vetor), *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus.* Existem algumas espécies de triatomíneos que apresentam ciclos domiciliares e peridomiciliares nas Américas, o que resulta em maior transmissão humana

(ARGOLO et al., 2008; SALOMON, 2012; LINETZKY et al., 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; HABERLAND et al., 2013; NUNES et al., 2013; MESSENGER, MILES, BERN, 2015).

A forma habitual de transmissão da doença de Chagas está ligada diretamente ao vetor (principal via de transmissão) e estima-se que 41.000 indivíduos sejam infectados pelo mosquito anualmente. Em adição, o parasita também pode ser transmitido por mecanismos não vetoriais como: transfusão sanguínea e de hemoderivados, doação de órgãos, transmissão congênita e contaminação por via oral, devido à ingestão de alimentos contaminados. Mecanismos menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados e passagem através do leite materno. Outra via teoricamente possível, mas extremamente rara, é a transmissão sexual (COURA, PEREIRA, 2010; LESCURE et al., 2010; HERNANDEZ, DUMONTEIL, 2011; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; MACHADO et al., 2012; SALOMON, 2012; NAGAJYOTHI et al., 2012; LINETZKY et al., 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; SÁNCHEZ, RAMÍREZ, 2013; ESCH, PETERSEN, 2013; WHO, 2016a; SCHMIDT et al., 2014; CHATELAIN, 2015; GASPAR et al., 2015; MÉNDEZ et al., 2015; URBINA, 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016). Para evitar a contaminação por transfusão sanguínea e doação de órgãos, nos países endêmicos são obrigatórios exames para determinar a presença de anticorpos contra *T. cruzi* (SCHMIDT et al., 2014; GASPAR et al., 2015).

1.1.3 **Epidemiologia**

A doença de Chagas segue como concreto e impactante problema de saúde pública em todos os países da América Latina e sua distribuição se estende da América do Sul, incluindo Chile e Argentina, até o sul dos Estados Unidos (Figura 1). Esta enfermidade é endêmica em 21 países nas Américas, estimando-se que entre 7 e 8 milhões de indivíduos estejam infectados e em torno de 25 milhões de pessoas sejam expostas à doença. A incidência anual é estimada em 200 mil novos casos, ocorrendo 10 mil óbitos ao ano (MOREL, LAZDINS, 2003; DIAS, 2007; LESCURE et al., 2010; BUCKNER, NAVABI, 2010; HERNANDEZ, DUMONTEIL, 2011; DUMONTEIL et al. 2012; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; MACHADO et al., 2012; SALOMON,

2012; NAGAJYOTHI et al., 2012; LINETZKY et al., 2012; SÁNCHEZ, RAMÍREZ, 2013; PINAZO et al., 2013; ESCH, PETERSEN, 2013; GARCIA et al., 2013; WHO, 2016a; SCHMIDT et al., 2014; CHATELAIN, 2015; GASPAR et al., 2015; MESSENGER, MILES, BERN, 2015; MORILLA, ROMERO, 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016).

Figura 1: Distribuição geográfica da doença de Chagas (COURA, DIAS, 2009).

A doença de Chagas é uma das doenças tropicais mais negligenciadas. De forma geral, está associada à pobreza e à marginalização da zona rural, ocorrendo em locais de péssimas condições de habitação, o que favorece a infestação vetorial. Esta enfermidade atinge, principalmente, populações socialmente excluídas, de baixa expressão política e de origem rural. Além disso, provoca grandes impactos sociais e econômicos na população acometida, pois causa incapacidade laboral (DIAS, 2007; HERNANDEZ, DUMONTEIL, 2011; DUMONTEIL et al. 2012; MACHADO et al., 2012; LINETZKY et al., 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; GARCIA et al., 2013;

MOLINA, 2013; CHATELAIN, 2015; GASPAR et al., 2015; FERREIRA, OLIVEIRA, ANDRICOPULO, 2016).

Atualmente, devido ao processo de urbanização da doença e às correntes migratórias, observaram-se casos de indivíduos infectados em regiões não endêmicas, como Estados Unidos, Canadá (5.000 infectados), Austrália (3.000 infectados), Japão, Espanha, França, Itália, Suécia, Suíça, Inglaterra, entre outros países. Nos países europeus, Espanha e Itália apresentam maior incidência, estimando-se que existam entre 68.000 e 123.000 pessoas infectadas com o parasita. Desta forma, a doença de Chagas é uma doença emergente em países não endêmicos, tornando-se problema para a comunidade internacional (LESCURE et al., 2010; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; GARCIA et al., 2013; SÁNCHEZ, RAMÍREZ, 2013; HABERLAND et al., 2013; SCHMIDT et al., 2014; MESSENGER, MILES, BERN, 2015; CHATELAIN, 2015; MÉNDEZ et al., 2015; MORILLA, ROMERO, 2015; URBINA, 2015). Tendo em vista a situação atual, regiões consideradas não endêmicas como França, Espanha e Reino Unido têm adotado medidas para o controle do parasita em bancos de sangue e de órgãos (ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014).

Em 2009, nos Estados Unidos, estimou-se que, aproximadamente, 300.200 pessoas estivessem infectadas com o parasita, entre 10 e 15% destes com cardiopatia chagásica e a maior concentração no Estado do Texas. Desta forma, Estados Unidos é o sétimo país que apresenta o maior número de infectados. Espécies de triatomíneos contaminadas com *T. cruzi* foram encontradas em toda a metade sul do país, incluindo Texas, Sul da Califórnia, Arizona e Flórida. Até 2007, não eram realizadas triagens quanto ao *T. cruzi* em doadores de sangue. Em 2012, todos os doadores de sangue soropositivos identificados na triagem residiam em áreas que registram a infecção por *T. cruzi* e 80% não tinham histórico de viagem para regiões endêmicas fora dos Estados Unidos (LESCURE et al., 2010; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; MACHADO et al., 2012; SALOMON, 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; SÁNCHEZ, RAMÍREZ, 2013; NUNES et al., 2013; ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014; CHATELAIN, 2015; MÉNDEZ et al., 2015).

No Brasil, a doença de Chagas é a quarta causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias. Estima-se que 2 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo o país com o maior número absoluto de casos (SATANAWAY, ROTH, 2015). A faixa etária mais acometida é compreendida por indivíduos acima de 45 anos, que se concentram nas grandes cidades, especialmente na região sudeste, devido à migração da população para regiões urbanas. Recentemente, ocorreram surtos com a forma aguda da doença e morte por ingestão de formas tripomastigotas dissolvidas em bebidas, como suco de cana e açaí, em que os insetos vetores, silvestres provavelmente, foram triturados durante o preparo ou suas fezes contaminaram o alimento (ARAÚJO, SABROZA, SILVA, 2012; SÁNCHEZ, RAMÍREZ, 2013). A endemia da doença de Chagas é o resultado das alterações produzidas por ação humana no meio ambiente e das desigualdades sociais (COURA, 2007; ARGOLO et al., 2008; COURA, DIAS, 2009; ESCH, PETERSEN, 2013). Muitas vezes, esta doença ocorre em população produtiva, o que afeta o trabalho destes indivíduos e agrava situações sociais, resultando em perda econômica significativa destas populações (NUNES et al., 2013; HABERLAND et al., 2013).

1.1.4 **Manifestações clínicas**

A evolução da doença de Chagas em humanos está relacionada tanto à virulência da estirpe do parasita, quanto à resposta imune do hospedeiro à infecção. Com relação a fatores do hospedeiro, herança genética, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e imunidade têm sido associados com desfechos clínicos distintos da patologia. Esta parasitose sistêmica crônica é potencialmente fatal e apresenta evolução crônica e debilitante (PAHO, 2016; MACHADO et al., 2012; SALOMON, 2012; PEREZ, LYMBERY, THOMPSON, 2014; WHO, 2014; URBINA, 2015). As manifestações clínicas da doença de Chagas podem ser divididas em três fases principais:

Fase aguda - apresenta elevada parasitemia, com duração de até dois meses. Na maioria dos casos é assintomática. Em casos sintomáticos, dependendo do ponto de inoculação, observa-se o chagoma cutâneo (região enrigecida com eritema e edema) ou o “sinal de Romaña” na região dos olhos, caracterizado por edema

bipalpebral unilateral e conjuntivite, devido ao ferimento provocado pela picada do vetor. Além disso, podem ocorrer sintomas inespecíficos como: palidez, cefaleia, mal-estar, febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite, em casos graves. Nesta etapa da doença, a taxa de letalidade varia de 2 a 6% (COURA, PEREIRA, 2010; HERNANDEZ, DUMONTEIL, 2011; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; AFONSO, EBELL, TARLETON, 2012; DUMONTEIL et al., 2012; MACHADO et al., 2012; SALOMON, 2012; NAGAJYOTHI et al., 2012; LINETZKY et al., 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; WHO, 2014; PEREZ, LYMBERY, THOMPSON, 2014; BERN, 2015; CHATELAIN, 2015; MESSENGER, MILES, BERN, 2015; PEREZ, LYMBERY, THOMPSON, 2015; STANAWAY, ROTH, 2015).

Fase intermediária ou latente – caracteriza-se como oligo ou assintomática e pode perdurar por muitos anos (10 a 20). Nesta fase, as formas tripomastigotas não são detectadas no sangue, mas se observa a presença de anticorpos contra *T. cruzi*. A maioria dos pacientes permanece nesta fase durante toda a vida, mas em torno de 20 a 40% dos infectados, após este período de latência, apresentam sintomas cardíacos (miocardiopatia chagásica) ou digestivos, constituindo a fase crônica sintomática (LENNOX et al., 2007; HERNANDEZ, DUMONTEIL, 2011; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; DUMONTEIL et al., 2012; MACHADO et al., 2012; SALOMON, 2012; NAGAJYOTHI et al., 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; NUNES et al., 2013; MOLINA, 2013; CHATELAIN, 2015; MESSENGER, MILES, BERN, 2015; PEREZ, LYMBERY, THOMPSON, 2015; STANAWAY, ROTH, 2015).

Fase crônica - esta é a forma mais importante da doença, em que, geralmente, ocorre reativação após 10 a 30 anos da infecção inicial. Nestes casos, especialmente coração e músculo liso digestivo são atingidos, apresentando diferentes manifestações clínicas (MACHADO et al., 2012; COURA, PEREIRA, 2012; NUNES et al., 2013; MOLINA, 2013; CHATELAIN, 2015; MESSENGER, MILES, BERN, 2015):

a) assintomática (forma indeterminada), que ocorre no início da fase crônica e dura toda a vida na maioria dos pacientes (MACHADO et al., 2012; COURA, PEREIRA, 2012; HABERLAND et al., 2013);

b) cardíaca, que acomete até 30% dos pacientes. O coração é o orgão, frequentemente, mais afetado em indivíduos com doença de Chagas na fase crônica. Nestes casos, podem ocorrer o adelgaçamento das paredes ventriculares, aumento biventricular, aneurismas apicais, arritmias, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca e lesões secundárias. A cardiopatia chagásica crônica varia amplamente em suas manifestações, que vão de alterações eletrocardiográficas assintomáticas a insuficiência cardíaca congestiva, arritmias e/ou eventos tromboembólicos. A insuficiência cardíaca é a principal condição clínica que provoca morte em cerca de 60% dos pacientes com doença de Chagas (LESCURE et al., 2010; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; DUMONTEIL et al., 2012; MACHADO et al., 2012; COURA, PEREIRA, 2012; NAGAJYOTHI et al., 2012; LINETZKY et al., 2012; NUNES et al., 2013; MOLINA, 2013; BERN, 2015; MALIK, SINGH, AMSTERDAM, 2015; MORILLA, ROMERO, 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016);

c) digestiva, que se manifesta com megassíndromes, como megaesôfago e megacólon ou formas mistas (cardíaca associada à digestiva), ocorrendo em até 10% dos pacientes (GUEDES et al., 2012; HERNANDEZ, DUMONTEIL, 2011; DUMONTEIL et al., 2012; MACHADO et al., 2012; COURA, PEREIRA, 2012; NAGAJYOTHI et al., 2012; LINETZKY et al., 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; GULLO et al., 2012; DUMONTEIL et al. 2012; MOLINA, 2013; WHO, 2014; CHATELAIN, 2015; MORILLA, ROMERO, 2015).

A reativação da doença pode acontecer, também, em condições imunossupressoras, como no uso de fármacos imunossupressores, infecção por HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), pacientes transplantados, neoplasias e doenças autoimunes. Em pacientes infectados com HIV, esta enfermidade pode atuar como doença oportunista. As manifestações mais frequentes são meningoencefalite e lesões no Sistema Nervoso Central (SNC), que podem ser confundidas com neurotoxoplasmose e, em menor proporção, surgem as manifestações cardíacas. Os sintomas comumente manifestados são: febre, dor de cabeça, vômitos e convulsões. Há o acometimento cerebral em 80% dos pacientes coinfectados com HIV. Nestes casos, a causa do tropismo cerebral é desconhecida. A reativação em pacientes com HIV ocorre quando a contagem de células CD4 é inferior a 200 células/mL ou 50

células/µL (LESCURE et al., 2010; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; NAGAJYOTHI et al., 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; PINAZO et al., 2013; HABERLAND et al., 2013; ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014; MORILLA, ROMERO, 2015).

1.1.5 **Diagnóstico**

Geralmente, a infecção por *T. cruzi* é controlada pela resposta imune eficaz, mas em caso de falha desta resposta, há o desenvolvimento da doença. No início da infecção os parasitas podem ser detectados no sangue, por observação direta ou por várias técnicas de cultura. Infelizmente, a infecção na fase inicial, muitas vezes, passa despercebida porque os sintomas são inespecíficos ou ausentes. Após a resposta imune ao *T. cruzi* ser estabelecida, a detecção do parasita é muito difícil. Neste momento, o diagnóstico da infecção é baseado, principalmente, na detecção de antígenos anti-*T. cruzi*, através de técnicas sorológicas convencionais, como ensaios de imunofluorescência indireta, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e testes de hemaglutinação indireta. Outros testes, como Western blot, lise de tripomastigota mediada pelo sistema complemento e por proteína recombinante são menos utilizados devido ao elevado custo e à complexidade de realização (AFONSO, EBELL, TARLETON, 2012; COURA, PEREIRA, 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; PINAZO et al., 2013; PEREZ, LYMBERY, THOMPSON, 2014; BERN, 2015; CHATELAIN, 2015; MESSENGER, MILES, BERN, 2015; MORILLA, ROMERO, 2015).

Hemaglutinação indireta - apesar da elevada especificidade e facilidade de aplicação da técnica, a sensibilidade apresenta grande variabilidade. Assim, segundo teste de confirmação deve ser realizado, quando o intervalo de títulos estiver entre 1/40 e 1/80 (COURA, PEREIRA, 2012).

Imunofluorescência indireta – apresenta boa sensibilidade, mas, frequentemente, ocorrem reações cruzadas com outras doenças, especialmente com títulos de 1/40 e 1/80 (COURA, PEREIRA, 2012).

ELISA – tem sensibilidade semelhante à imunofluorescência indireta, com a possibilidade de leitura automática, o que evita a subjetividade e permite a aplicação do

teste para grande número de amostras. É muito utilizado em bancos de sangue (COURA, PEREIRA, 2012).

Western blot - é um excelente teste de confirmação, usado, principalmente, em laboratórios de investigação, pois seu elevado custo inviabiliza o uso em diagnóstico de rotina (COURA, PEREIRA, 2012).

No diagnóstico, o que se buscam são testes rápidos com alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, não há um teste único padrão para o diagnóstico. A OMS (Organização Mundial de Saúde) recomenda o uso de pelo menos duas técnicas com princípios diferentes para a confirmação do diagnóstico, geralmente ELISA e imunofluorescência indireta ou hemaglutinação indireta (AFONSO, EBELL, TARLETON, 2012; COURA, PEREIRA, 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; BERN, 2015; MESSENGER, MILES, BERN, 2015).

1.1.6 **Quimioterapia**

1.1.6.1 Fármacos utilizados

A doença de Chagas foi descoberta há mais de um século (1909) sem que se encontrasse tratamento efetivo. Apenas dois fármacos estão disponíveis para o tratamento: benznidazol e nifurtimox (Figura 2). Estes fármacos foram introduzidos na terapêutica por volta de 1960-1970, mas no Brasil, apenas o benznidazol é disponibilizado para o tratamento. Estes agentes bioativos são efetivos apenas se administrados logo após a contaminação, no início da fase aguda, e sua eficácia diminui de acordo com aumento do tempo de infecção. A taxa média de cura entre casos agudos e recentes é de 80%, porém, na fase crônica os índices variam de 0 a 19,1%. Estudos mostram que, em casos crônicos, estes fármacos são capazes de retardar a evolução da doença (CERECETTO, GONZÁLEZ, 2008; LESCURE et al., 2010; GUEDES et al., 2012; COURA, PEREIRA, 2012; SALOMON, 2012; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; PINAZO et al., 2013; WHO, 2014; PEREZ, LYMBERY, THOMPSON, 2014; BERN, 2015; CHATELAIN, 2015; GASPAR et al. 2015; MALIK, SINGH, AMSTERDAM, 2015; MORILLA, ROMERO, 2015; URBINA, 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016).

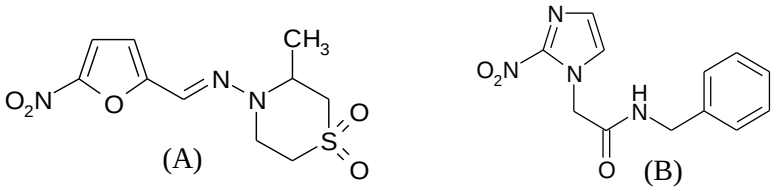


Figura 2: Estrutura (A) nifurtimox e (B) benznidazol.

Benznidazol, derivado 2-nitroimidazólico, é utilizado na dose de 5 a 7,5 mg/kg/dia durante 60 dias. Atua interferindo em metabólitos de DNA, lipídeos e proteínas do parasita. Este fármaco tem como reações adversas: dermatopatia urticariforme, que se caracteriza por erupções pruriginosas e eritematosas, seguidas de descamação (ocorre em 30% dos casos); depressão medular com leucopenia (rara e grave) e polineuropatia (rara, surge a partir da sexta semana); redução do apetite; naúseas; dores abdominais e fraqueza. Estudos demonstraram que o benznidazol é mais eficiente que o nifurtimox para suprimir a parasitemia em casos de infecção crônica (FERREIRA et al., 2010; LESCURE et al., 2010; DUMONTEIL et al., 2012; COURA, PEREIRA, 2012; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; HABERLAND et al., 2013; MOLINA, 2013; WHO, 2014; BERN, 2015; CHATELAIN, 2015; GASPAR et al., 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016).

Nifurtimox, composto 5-nitrofurânico, contraindicado para pacientes com transtornos psiquiátricos ou neurológicos (como convulsões), é menos tolerado que o benznidazol. Nifurtimox é administrado na dose de 7,5 a 10 mg/kg/dia entre 60 e 90 dias. O mecanismo de ação envolve a produção de nitro-ânion, que, na presença de oxigênio, impede o *T. cruzi* de destoxificar os radicais livres. Apresenta efeitos colaterais como: desconforto abdominal (sintoma mais comum), anorexia, perda de peso, enjôos, dor de cabeça, vômitos, insônia e distúrbios de comportamento (LESCURE et al., 2010; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; DUMONTEIL et al., 2012; COURA, PEREIRA, 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; HABERLAND et al., 2013; MOLINA, 2013; BERN, 2015; CHATELAIN, 2015; GASPAR et al., 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016).

Como observado, estas opções terapêuticas apresentam problemas, entre eles: inatividade durante a fase crônica da doença, pois matam apenas os parasitas

extracelulares; graves efeitos colaterais observados entre 30-50% dos indivíduos tratados, 10-20% dos pacientes interrompem o tratamento, devido aos efeitos adversos; requerem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica; grande variação na suscetibilidade do parasita à ação destes compostos e suscitam o aparecimento de parasitas resistentes. Ambos os compostos têm sido principalmente utilizados no tratamento de pacientes agudos e crônicos recentes, nos quais se observam resultados positivos. Entretanto, muitos estudos revelam a baixa eficiência no tratamento de pacientes crônicos. É importante ressaltar que os danos causados pela doença são irreversíveis. Estes medicamentos são contraindicados em gestantes e pacientes com insuficiência renal ou hepática (DIAS, 2007; CERECETTO, GONZÁLEZ, 2008; BUCKNER, NAVABI, 2010; LESCURE et al., 2010; HERNANDEZ, DUMONTEIL, 2011; DUMONTEIL et al., 2012; COURA, PEREIRA, 2012; PEREZ, LYMBERY, THOMPSON, 2014; GASPAR et al., 2015; MORILLA, ROMERO, 2015; URBINA, 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016). Estima-se que cerca de 20% dos pacientes não procuram atendimento e muito mais têm acesso limitado aos serviços de saúde (DUMONTEIL et al., 2012).

Durante o tratamento e após a sua conclusão, os pacientes devem ser monitorados por meio dos seguintes exames: hemograma; avaliação da função hepática; monitoramento de peso e efeitos adversos, como neuropatia periférica (HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; NUNES et al., 2013).

Diante do exposto, existe a necessidade urgente de planejamento de novos fármacos para o tratamento e prevenção da doença de Chagas. Neste contexto, a comunidade de pesquisa acadêmica tem contribuído com grandes esforços para a descoberta de novos fármacos para a terapêutica desta patologia. Como doença negligenciada, não desperta interesse em indústrias farmacêuticas, serviços de saúde pública e outras autoridades para o investimento em atividades de investigação, controle e tratamento. No entanto, nos últimos anos, as indústrias farmacêuticas têm mostrado algum interesse na pesquisa de compostos para este tipo de doença (REITHINGER et al., 2007; CERECETTO, GONZÁLEZ, 2008; BUCKNER, NAVABI, 2010; DUMONTEIL et al., 2012; SALOMON, 2012; PEREZ, LYMBERY, THOMPSON, 2014; GASPAR et al., 2015; MORILLA, ROMERO, 2015). Uma das estratégias

utilizadas na busca por novos medicamentos para as doenças negligenciadas é o reposicionamento de fármacos, com o estudo de medicamentos aplicados para outras indicações terapêuticas (FERREIRA, OLIVEIRA, ANDRICOPULO, 2016). A incidência disseminada da doença em países não endêmicos, como mencionado anteriormente, pode ser uma das causas do aumento, ainda que reduzido, da pesquisa de novos antichagásicos.

Com o intuito de incentivar a pesquisa e desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas criou-se a organização sem fins lucrativos DND*i* (*Drug for Neglected Diseases Initiative*) (CHATELAIN, 2015; GASPAR et al., 2015; GIAROLLA, FERREIRA, 2015). Apesar dos esforços, durante o período entre 1975-2004, dos 1556 novos fármacos aprovados apenas 21 eram destinados às doenças negligenciadas, o que representa 1,3% do total (GIAROLLA, FERREIRA, 2015). Observam-se alguns trabalhos de cooperação como BERENICE (Espanha, França, Brasil e Argentina) e SABIN (Estados Unidos, México, Alemanha e Japão), que têm o objetivo de estimular a pesquisa de alternativas terapêuticas para a doença de Chagas (MORILLA, ROMERO, 2015). Ainda que poucas, surgem iniciativas de algumas indústrias farmacêuticas para apoiar projetos de pesquisa em DN, como por exemplo, projeto da GSK (GlaxoSmithKline) em parceria com universidades do Brasil e da Argentina e a Novartis conjuntamente com universidades americanas e irlandesas (CHATELAIN, 2015; GIAROLLA, FERREIRA, 2015).

1.1.6.2 Compostos em estudo

1.1.6.2.1 *Inibidores da biossíntese de ergosterol*

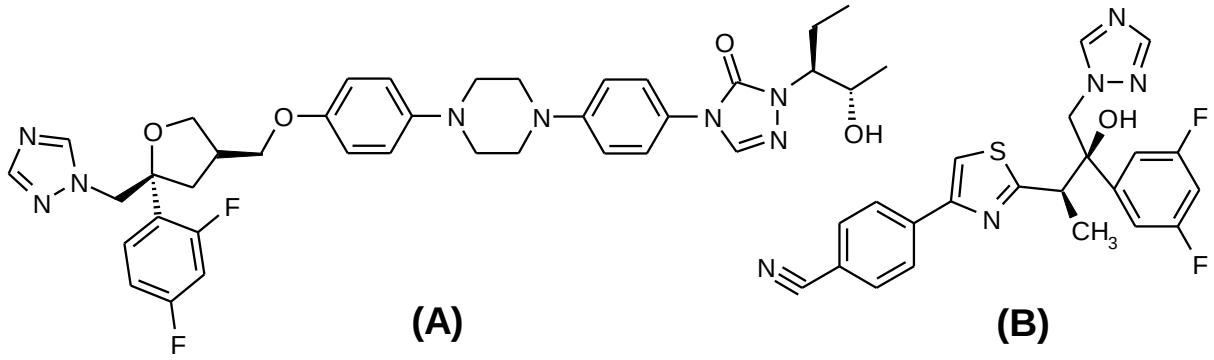


Figura 3: Estrutura (A) posaconazol e (B) ravuconazol.

A biossíntese de ergosterol é um alvo importante deste protozoário. Os azóis inibem a enzima esterol 14-α-desmetilase (CYP51), interferindo na biossíntese de esteróis importantes para a membrana celular (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; CROFT, OLLIARO, 2011; MARIN et al., 2011; GASPAR et al., 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016). Esta enzima é o alvo de antifúngicos azólicos. Muitos estudos *in vitro* mostraram a potente atividade tripanomicida de posaconazol e ravuconazol (Figura 3). No entanto, ravuconazol mostrou atividade limitada em modelo animal. O posaconazol foi uma das moléculas mais promissoras dessa classe, chegou a estudos clínicos de fase II, mas estes mostraram índices terapêuticos falhos, em torno de 80%. Atualmente, estuda-se o uso de inibidores da síntese de ergosterol em associação com outros agentes tripanomicidas (LESCURE et al., 2010; BUCKNER, NAVABI, 2010; GUEDES et al., 2012; COURA, PEREIRA, 2012; RASSI-JÚNIOR, RASSI, REZENDE, 2012; PINAZO et al., 2013; MOLINA, 2013; CHATELAIN, 2015; GASPAR et al., 2015; MORILLA, ROMERO, 2015; URBINA, 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016; FERREIRA, OLIVEIRA, ANDRICOPULO, 2016).

1.1.6.2.2 *Inibidores de cisteíno-proteases*

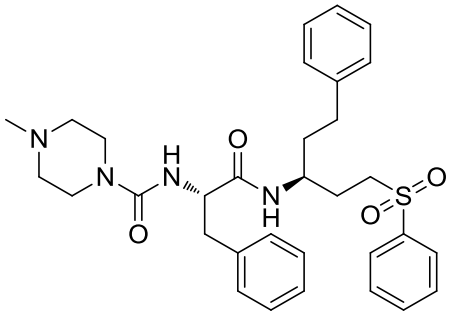


Figura 4: Estrutura do inibidor irreversível da cruzaína K777.

As cisteíno-proteases têm sido implicadas nos processos de: invasão de tecidos, evasão imune e adesão celular. Cruzaína é a principal cisteíno-protease expressada durante a infecção por *T. cruzi*, apresentando atividade proteolítica em todas as fases do ciclo evolutivo e atuando no metabolismo do parasita. Esta enzima é essencial para sobrevivência e infectividade de *T. cruzi* no hospedeiro mamífero e está localizada na membrana do parasita. Nas formas amastigotas apresenta importante atividade no citoplasma da célula hospedeira. Muitos estudos têm investigado inibidores desta enzima. Entre eles, em ensaio pré-clínico avançado encontra-se o derivado vinilsulfona K-777 (Figura 4), inibidor irreversível da cruzaína (BUCKNER, NAVABI, 2010; GUEDES et al., 2012; OSÓRIO et al., 2012; ASSIS et al., 2013; GASPAR et al., 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016; FERREIRA, OLIVEIRA, ANDRICOPULO, 2016).

1.1.6.2.3 *Inibidores de farnesiltransferase*

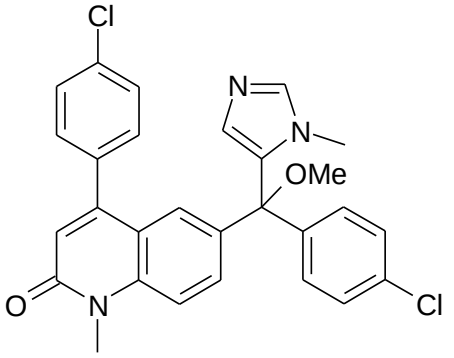


Figura 5: Estrutura de tipifarnibe.

A farnesiltransferase catalisa a ligação covalente entre o grupo farsenila (proveniente do farnesilpirofosfato) e o tiol da cisteína da proteína. Esta enzima está envolvida na biossíntese de esteróis, essencial para a composição de membranas, mitocôndrias e plasma (DIAS et al., 2009; SHIROZU et al., 2014). O fármaco bisfosfonado risedronato, utilizado para o tratamento da osteoporose, foi capaz de inibir essa enzima na forma amastigota. Tipifarnibe (Figura 5), que atua na farnesiltransferase, é um fármaco anticâncer, que apresentou potencial atividade *in vivo* e *in vitro* em escala subnanomolar contra as formas amastigotas, com menor toxicidade que os fármacos de referência (BUCKNER, NAVABI, 2010; GASPAR et al., 2015; BÉRMUDEZ et al., 2016).

1.1.6.2.4 *Complexos de rutênio*

Estudos associaram complexos de rutênio como transportadores de fármacos utilizados (benznidazol) na terapêutica ou em estudo (posaconazol, clotrimazol e cetoconazol) contra a doença de Chagas e estes compostos melhoraram a solubilidade e especificidade ao parasita. Além disso, realizaram-se estudos empregando complexos de rutênio para a liberação de óxido nítrico (NO). O complexo *trans*-$[RuCl([15]aneN_4)NO]^{2+}$, no interior dos macrófagos, liberou NO, que exerceu atividade tripanomicida. Ensaios em camundongos mostraram que o complexo sozinho apresentou taxas de curas parasitológicas de 30%, mas quando associado ao benznidazol os índices atingiram 80% de cura. Em adição, complexos $[Ru(NO)(NH_3)_4isn](BG4)_3$ foram capazes de eliminar amastigotas no músculo cardíaco (BUCKNER, NAVABI, 2010; BÉRMUDEZ et al., 2016).

1.1.7 **Vacinas**

A dificuldade no desenvolvimento de vacinas está relacionada à complexa natureza da doença de Chagas. Muitos esforços estão sendo destinados à procura de vacinas, como alternativa para a quimioterapia, que atuariam tanto na prevenção quanto no retardamento da forma cardíaca da doença (DUMONTEIL *et al*., 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; BEAUMIER et al., 2013; MÉNDEZ et al., 2015; MORILLA, ROMERO, 2015).

A vacinação é uma grande promessa para o controle da doença de Chagas. No entanto, as pesquisas na busca de vacinas têm sido dificultadas devido à possibilidade de agravamento de lesões no miocárdio, por meio da ativação da resposta imunológica. Nos últimos anos, avaliaram-se muitas vacinas com variações de parasitas inteiros, proteínas purificadas e recombinantes, vetores virais e vacinas de DNA. Tentativas com o parasita morto de *T. cruzi* resultaram em modesta proteção contra a infecção (HERNANDEZ, DUMONTEIL, 2011; DUMONTEIL et al., 2012; BEAUMIER et al., 2013; MORILLA, ROMERO, 2015).

Também, testaram-se parasitas atenuados, *T. cruzi* com genes específicos mutados como LYT1, que desempenha papel na infecciosidade do parasita. Estas vacinas apresentaram maior atividade imunogênica, sendo capazes de conferir proteção mais significativa contra infecção. Além disso, investigaram-se vacinas com *T. rangeli,* espécie de parasita não patogênico em humanos. A vacina bivalente é composta por dois antígenos recombinantes de *T. cruzi* (Tc24 e TSA-1) e com receptor do tipo agonista Toll-4 (E6020). Entretanto, todas as abordagens revelaram problemas quanto à segurança e ao escalonamento para produção dessas vacinas (HERNANDEZ, DUMONTEIL, 2011; DUMONTEIL et al., 2012; BEAUMIER et al., 2013).

Entre as vantagens das vacinas é possível destacar: redução da toxicidade, eficácia superior quando associado à quimioterapia, prevenção de complicações cardíacas e uso durante a gestação para prevenção da transmissão congênita (DUMONTEIL et al., 2012).

1.2 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é considerada uma doença tropical supernegligenciada, que afeta regiões de extrema pobreza. O termo leishmaniose determina um grupo de doenças causadas por muitas espécies diferentes de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (SUCRE et al., 1997; SANTOS et al., 2008; AMATO NETO et al., 2008; MACHADO et al., 2009; READY, 2014; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; RODRIGUES et al., 2015). A leishmaniose apresenta diferentes manifestações clínicas, que variam entre a forma assintomática a até três formas clínicas principais (cutânea, mucocutânea

e visceral) (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SINGH, SUNDAR, 2012; READY, 2014; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; GUTIÉRREZ et al., 2016).

Existem evidências de que pessoas sofriam desta doença há 4.000 anos, devido à presença de DNA de *L. donovani* em múmias egípcias. A presença de *Leishmania* foi, também, detectada em lesões faciais em crânios antigos do deserto de Atacama, no Chile. As leishmanias foram observadas pela primeira vez por Cunningham, em 1885, em lesões de pele de pacientes na Índia, mas ele sugeriu que elas fossem fungos (*Mycetozoa)*. A natureza dos protozoários foi determinada em 1898, por Borovsky, em lesões de pele no Turcomenistão. Em 1903, Leishman descobriu parasitas intracelulares em vísceras de um caso fatal de leishmaniose visceral na Índia. No mesmo ano, também na Índia, Donovan fez a mesma observação (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012).

1.2.1 **Agente etiológico**

Esta doença é causada por parasitas da família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastidae*, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* (YONEYAMA et al*.*, 2006; UENO et al*.*, 2009; CAVILLO et al*.*, 2010; READY, 2014). Em seu ciclo evolutivo apresenta duas formas principais: amastigota e promastigota. Promastigota é a forma infecciosa móvel, que apresenta vida extracelular e está presente no intestino de flebotomíneos. A outra forma é a amastigota, que tem vida intracelular obrigatória em tecidos de hospedeiros mamíferos e é encontrada em fagolisossomos, principalmente nos macrófagos (YONEYAMA et al., 2006; SALEM, WERBOVETZ, 2006; FARIA et al., 2011; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; DORLO et al., 2012; MURRAY, 2012; GRIENSVEN, DIRO, 2012; ESCH, PETERSEN, 2013).

O flebotomíneo, por meio da picada, inocula promastigotas infectantes no mamífero (reservatório). Os promastigotas são fagocitados pelas células fagocitárias, nas quais se transformam em amastigotas. Nesta forma, sobrevivem e se multiplicam no interior dos vacúolos fagocíticos, promovendo o rompimento celular e a liberação de novos amastigotas no sangue, que serão fagocitados por outras células. Assim, ocorre a disseminação e contaminação das células do sistema retículo-endotelial em vários tecidos, como baço, medula óssea, fígado e linfonodos. O vetor é infectado através da

alimentação, quando ingere o parasita do hospedeiro (GRIENSVEN, DIRO, 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; SAVOIA, 2015; GUTIÉRREZ et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016).

No organismo do hospedeiro vertebrado, o parasito infecta as células fagocitárias (neutrófilos, monócitos e macrófagos) e células dendríticas. Os macrófagos são a principal célula para o desenvolvimento da *Leishmania* no hospedeiro mamífero (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; DORLO et al., 2012; READY, 2014; GUTIÉRREZ et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016).

Cerca de 20 espécies de *Leishmania* foram identificadas como capazes de transmitir e desencadear diferentes manifestações clínicas da leishmaniose (SALEM, WERBOVETZ, 2006; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; DORLO et al., 2012; READY, 2014; GUTIÉRREZ et al., 2016), como segue:

Cutânea - causada por *L. mexicana* (América Central e do Sul), *L. tropicana* (países do Oriente) e *L. major* (África e Ásia). No Brasil, o gênero que provoca este tipo de manifestação é a *L. braziliensis*. Outras espécies que, também, podem provocar a forma cutânea são: *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis* (SHARMA, SINGH, 2008; ROMERO, MORILLA, 2008; EL-ON, 2009; GONZÁLEZ et al., 2010; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; DORLO et al., 2012; BRITO et al., 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015);

Mucocutânea – o principal agente etiológico é a *L. braziliensis* (BRITO et al., 2012);

Visceral ou calazar - causada principalmente pela *Leishmania donovani,* mas também pode ser provocada por *L. infatum* (África e Ásia) e *L. chagasi* (Américas) (TEMPONE et al., 2004; ROMERO, BOELAERT, 2010; DORLO et al., 2012; AEBISCHER, 2014; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

1.2.2 **Vetor e transmissão**

A principal forma de transmissão dos parasitas ocorre através da picada de flebotomíneos. Os vetores que promovem a transmissão do parasita são mosquitos hematófagos do gênero *Phlebotomus*, responsável pela transmissão da doença na

Ásia, e o gênero *Lutzomyia*, na América (CHAPPUIS et al., 2007; FRÉZARD, DEMICHELI, RIBEIRO, 2009; AMORA et al., 2009; SINGH, SUNDAR, 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; SRIVASTAVA et al., 2016). Aproximadamente 30 espécies de flebotomíneos são responsáveis pela transmissão da leishmaniose (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; GRIENSVEN, DIRO, 2012).

As fêmeas do gênero *Lutzomyia* medem de 2 a 3 milímetros e são os vetores responsáveis pela transmissão da doença. Este mosquito possui hábitos vespertinos e matutinos, períodos em que apresenta maior atividade (MAURER, DONDJI, STEBUT, 2009; PAILA, SAHA, CHATTOPADHYAY, 2010; ROMERO, BOELAERT, 2010; SEN, CHATTERJEE, 2011; NAGILL, KAUR, 2011; READY, 2014).

Outro mecanismo de transmissão possível é a transmissão direta, ou seja, sem flebotomíneos. Apesar da transmissão pelo mosquito ser a mais comum, a contaminação pode ocorrer, também, por transplante de órgãos, transmissão congênita, transfusão sanguínea e por compartilhamento de seringas entre usuários de drogas (SERVICE et al., 2006; MACHADO et al., 2009; ROMERO, BOELAERT, 2010; GRIENSVEN, DIRO, 2012).

1.2.3 **Epidemiologia**

A leishmaniose é um grande problema de saúde pública, amplamente distribuída no mundo, prevalente na África, América Latina, Ásia, Bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio. A distribuição geográfica desta patologia é dividida em Velho e Novo Mundo (Figura 6). É doença endêmica em áreas tropicais, subtropicais, incluindo Sul da Europa, desde florestas tropicais nas Américas aos desertos da Ásia. Oitenta e oito países são acometidos por esta enfermidade, dos quais 72 estão em desenvolvimento, com cerca de 350 milhões de pessoas sob o risco de adquirir a doença. A incidência mundial está aumentando e é uma das doenças consideradas pela OMS como extremamente negligenciada, assim como a doença de Chagas (SHARMA, SINGH, 2008; LINDOSO, LINDOSO, 2009; ALAKURTTI et al., 2010; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SINGH, SUNDAR, 2012; BADIEE et al., 2013; ESCH, PETERSEN, 2013; WHO, 2016b; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; GUTIÉRREZ et al., 2016; OKWOR, UZONNA, 2016).

A prevalência mundial estimada das leishmanioses é de 12 milhões de casos. O número preciso de casos da doença é desconhecido devido à subnotificação, pois a notificação compulsória ocorre em apenas 40 dos 88 países endêmicos. Estima-se que ocorram, anualmente, entre 1 e 2 milhões de novos casos e aproximadamente 200.000 óbitos. Cinco países concentram 90% dos casos: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (GACHET et al., 2010; CAVILLO et al., 2010; WHO, 2016b; GUTIÉRREZ et al., 2016). As mudanças climáticas, desmatamento, urbanização desordenada, más condições socioeconômicas (pobreza, falta de saneamento básico, analfabetismo e desnutrição), migração de pessoas para regiões endêmicas e imunossupressão, como a coinfecção com o vírus HIV, são fatores que favorecem a expansão e propagação da leishmaniose (LINDOSO, LINDOSO, 2009; MARZOCHI et al., 2009; LACKOVIC et al*.,* 2010; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; SAVOIA, 2015; OKWOR, UZONNA, 2016).

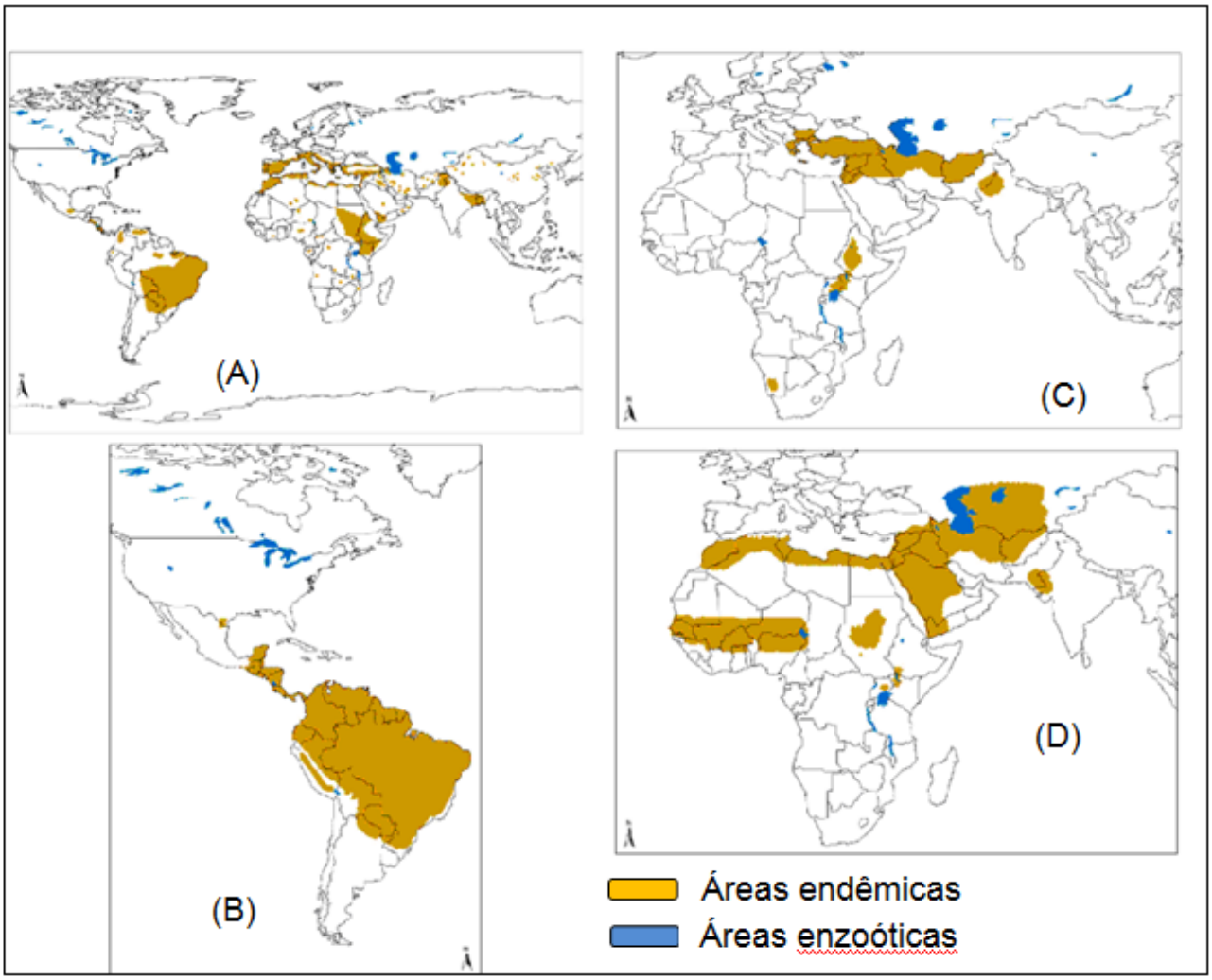


Figura 6: Distribuição geográfica da (A) leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo, (B) leishmaniose tegumentar no Novo Mundo, (C) leishmaniose cutânea no Velho Mundo causada por *L. aethiopica* e espécies afins e (D) leishmaniose cutânea no Velho Mundo provocada por *L. major*.

Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html (2016c)

1.2.4 **Diagnóstico**

O diagnóstico é baseado em aspectos clínicos como histologia da lesão, detecção e isolamento de parasitas nas feridas, por meio de biópsia (REZVAN, MOAFI, 2015; SAVOIA, 2015). Dentre as técnicas utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose destacam-se: ensaios de microscopia, cultura de células, imunodetecção e métodos baseados em DNA (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SRIVIDYA et al., 2012).

Microscopia e coloração de Giemsa ou hematoxilina e eosina - é um dos primeiros métodos de detecção e quantificação de muitos patógenos, incluindo as *Leishmanias*. Este método permite a observação e a contagem direta de amastigotas do parasita. O exame histológico de biópsias pode fornecer informações sobre a carga parasitária, infiltração em diferentes tipos de células, formação de granulomas e outras mudanças decorrentes da invasão do parasita nos tecidos. Na microscopia eletrônica, é possível observar a interação entre parasitas e macrófagos. Esta técnica é trabalhosa, demorada e com baixa sensibilidade, mas apresenta baixo custo e é altamente específica, pois permite a visualização direta do parasita (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SRIVIDYA et al., 2012; GRIENSVEN, DIRO, 2012; SAVOIA, 2015).

Meios de cultura - este método inclui o isolamento e cultivo de *Leishmania* a partir de células e tecidos. Desta forma, os parasitas se multiplicam e, posteriormente, seus números são avaliados após vários dias de incubação em meio de cultura. Este método, juntamente com os ensaios de microscopia, pertence às primeiras técnicas desenvolvidas para a estimativa da carga parasitária no organismo do hospedeiro infectado. Esta técnica tem como desvantagens ser laboriosa, demorada e dependente de condições estéreis (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SRIVIDYA et al., 2012).

Ensaios para detectar o DNA do parasita - estes ensaios foram desenvolvidos para detectar a presença de diferentes regiões de DNA do parasita em amostras clínicas. Estas técnicas atuam com os seguintes propósitos: detectar a presença de *Leishmania,* determinar a carga parasitária em células e tecidos, identificar a espécie do parasita e fornecer diagnóstico preciso. Dentre estas técnicas, destacam-se PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e PCR-ELISA, utilizados para detecção e quantificação dos agentes patogênicos. Estes métodos são rápidos, adequados para fins de investigação, especialmente em muitas amostras, altamente sensíveis e específicos (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SRIVIDYA et al., 2012; GRIENSVEN, DIRO, 2012; REZVAN, MOAFI, 2015; SAVOIA, 2015).

Testes baseados na resposta imune - ELISA (Ensaio imunoenzimático) baseia-se na detecção indireta de parasitas no hospedeiro infectado por identificação de antígenos de *Leishmania* ou anticorpos, usando formas promastigotas lisadas do

parasita. Os testes sorológicos são raramente utilizados para detecção de leishmaniose cutânea e mucocutânea, mas são comumente usados em casos de leishmaniose visceral (GRIENSVEN, DIRO, 2012; SAVOIA, 2015).

Os testes rápidos são métodos não invasivos, que determinam a presença de anticorpos para *Leishmania* no sangue, soro ou urina. Estes ensaios são disponíveis comercialmente, precisos, estáveis, de fácil utilização, processamento mínimo e rápidos resultados. A principal desvantagem é a dependência da resposta imunológica do indivíduo, o que pode gerar discrepâncias no diagnóstico e a presença de amostras falso-negativas. Apesar disto, estes testes são valiosos nas investigações de campo (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SRIVIDYA et al., 2012).

Teste de pele, de Montenegro - consiste na administração intradérmica do antígeno de *Leishmania*, seguida da medição do endurecimento local. Pessoas que já tiveram contato com o parasita apresentam reação de hipersensibilidade, caracterizada por eritema e endurecimento no local de aplicação (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012).

1.2.5 **Manifestações clínicas**

A progressão da doença depende da complexa interação entre parasita e hospedeiro, sendo os fatores que podem influenciar na evolução: as espécies de *Leishmania* envolvidas, virulência parasitária, estado imunológico e nutricional do hospedeiro, idade, fatores genéticos, vetor e fatores ambientais e sociais. Esta é uma enfermidade com amplo espectro e pode ser classificada em três manifestações clínicas principais. A infecção pode permanecer latente por até 30 anos (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; GRIENSVEN, DIRO, 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; SAVOIA, 2015):

1.2.5.1 Leishmaniose tegumentar americana

A leishmaniose tegumentar americana é endêmica em mais de 70 países, com estimativa de 1,5 a 2 milhões de novos casos a cada ano. Os principais países acometidos são: Afeganistão, Arábia Saudita, Brasil, Irã, Peru e Síria (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; WHO, 2016b). Esta doença é complexa, apresentando

diferentes características clínicas e epidemiológicas e pode ser subdividida em (BRITO et al., 2012):

Cutânea – é a forma mais comum da doença, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões ulcerosas e escamosas na pele (face, braços e pernas), que podem ser localizadas ou difusas, perduram por vários meses e, na maioria dos casos, são resolvidas pela atividade de células T. A cura ocorre por reepitelização, com a formação de cicatrizes, muitas vezes, desfigurantes (SHARMA, SINGH, 2008; ROMERO, MORILLA, 2008; EL-ON, 2009; GONZÁLEZ et al., 2010; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015);

Mucocutânea – esta forma de leishmaniose é causada pela reativação de infecção latente, após a lesão cutânea primária, embora em alguns casos não haja histórico de infecção primária. Os principais locais de acometimento são o septo nasal e a região orofaríngea (SERVICE et al., 2006; AMATO et al., 2007). Esta forma da doença pode causar lesões terrivelmente mutilantes das partes moles do nariz, lábios, palato mole, que tendem a se estender para as áreas adjacentes (MARKELL, JOHN, KROTOSKI, 2003; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; DORLO et al., 2012; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015);

1.2.5.2 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é doença endêmica em mais de 60 países. Anualmente, estima-se que ocorram cerca de 400.000 novos casos e 40.000 mortes por LV. Entretanto, 90% desses novos casos ocorrem nos seguintes países: Índia, Bangladesh, Nepal, Brasil, Etiópia, Sudão do Sul e Sudão (SINGH, SUNDAR, 2012; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SRIVIDYA et al., 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; WHO, 2016b; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015). No Brasil, são relatados cerca de 3.000 casos de LV ao ano (MELO, FORTALEZA, 2013).

A forma visceral, também conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença, que, se não tratada, apresenta taxa de mortalidade de quase 100%. É a doença parasitária mais mortal depois da malária. O tempo de incubação varia de 2 a 6 meses, mas este período pode ser de semanas a anos e tem como alvo órgãos viscerais. Caracteriza-se, clinicamente, por febre alta com calafrios de mais de duas

semanas, fadiga, perda de apetite, abdômen edemaciado devido à hepatoesplenomegalia, anemia, hemorragias, emagrecimento progressivo evidente, mucosas descoradas, manifestações intestinais (diarréia) e respiratórias (tosse) (TEMPONE et al., 2004; CHAPPUIS et al., 2007; ROMERO, BOELAERT, 2010; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SRIVIDYA et al., 2012; GRIENSVEN, DIRO, 2012; SINGH, SUNDAR, 2012; AEBISCHER, 2014; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; SAVOIA, 2015).

A leishmaniose dérmica pós-calazar ocorre devido à persistência dos parasitas após o tratamento da LV causada por *L. donovani*. Esta condição clínica é caracterizada por proliferação progressiva, que resulta em erupções cutâneas eritematosas na região perinasal, podendo progredir para placas e nódulos, disseminando para ombros, tronco e extremidades. No Sudão é muito comum a ocorrência após 6 meses de tratamento do calazar (entre 50% e 60% dos casos). Na Índia é menos frequente (de 5% a 10% dos casos) e ocorre após anos do tratamento. Excepcionalmente, surgem casos de pacientes sem histórico da forma visceral (GRIENSVEN, DIRO, 2012; BEAUMIER et al., 2013; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

A leishmaniose é uma doença oportunista importante em pacientes coinfectados com HIV. A AIDS tem influenciado significativamente as manifestações clínicas e o desenvolvimento de calazar. Em contrapartida, a forma visceral acelera a progressão do HIV, aumentando a replicação viral. No sul da Europa, estima-se que entre 25-70% dos casos de leishmaniose visceral estejam associados a infecção com o HIV. No noroeste da Etiópia, a prevalência de HIV entre pacientes com leishmaniose visceral varia de 20% a 30% (GRIENSVEN, DIRO, 2012; ESCH, PETERSEN, 2013; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

1.2.6 **Quimioterapia**

A OMS e o Ministério da Saúde do Brasil recomendam os antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina (Figura 7), como fármacos de primeira escolha contra todas as formas de leishmaniose. Entre os fármacos considerados de segunda escolha estão anfotericina B, pentamidina e paromomicina (MAYRINK et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2010; KOBETS, GREKOV,

LIPOLDOVÁ, 2012; GRIENSVEN, DIRO, 2012; MELO, FORTALEZA, 2013; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; GUTIÉRREZ et al., 2016).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) fornece gratuitamente os medicamentos: antimoniato de meglumina, desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossômica (MELO, FORTALEZA, 2013).

Atualmente, não há vacina disponível e os fármacos utilizados na terapêutica da leishmaniose apresentam diversos problemas, incluindo tratamentos prolongados, elevada toxicidade, baixa eficácia, problemas farmacocinéticos, além de suscitar o aparecimento de resistência. Outro problema enfrentado é a carência de investimento financeiro para a pesquisa de fármacos no combate desta doença. Tais fatos ressaltam a necessidade de desenvolvimento de terapias inovadoras e alternativas para o controle e terapêutica da leishmaniose (DENNY et al., 2006; SALEM, WERBOVETZ, 2006; SCHRIEFER, WILSON, CARVALHO, 2008; TEMPONE et al., 2010; SINGH, SUNDAR, 2012; BADIEE et al., 2013; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; GUTIÉRREZ et al., 2016).

1.2.6.1 Antimoniais pentavalentes

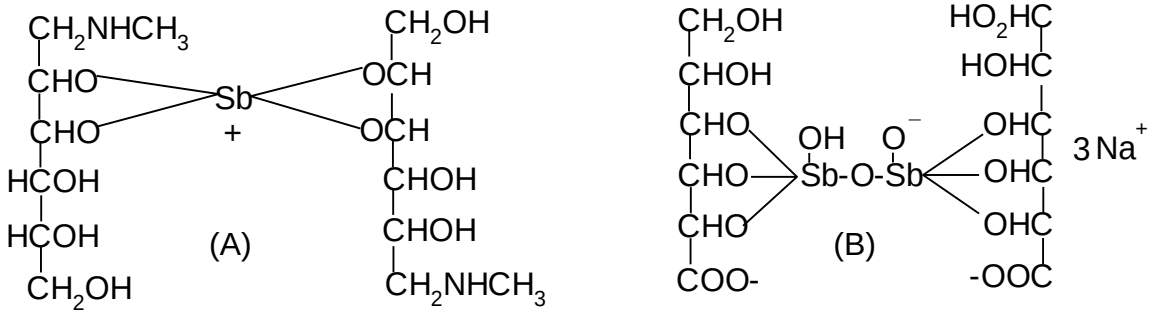


Figura 7: Estrutura (A) antimoniato de meglumina e (B) estibogluconato de sódio.

Atualmente, existem dois antimoniais em uso clínico, ambos pentavalentes (SbV): o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio (Figura 7). Estes agentes terapêuticos são utilizados desde meados de 1930. Estes compostos são pró-fármacos, que, no organismo, são convertidos pelo sistema glutationa às formas trivalentes biologicamente ativas (SbIII). Após ativação, eles interferem na glicólise, no metabolismo oxidativo de ácidos graxos, equilíbrio de tripanotiona e na DNA topoisomerase tipo I. Estes agentes terapêuticos são utilizados no tratamento de todas

as formas de leishmaniose. No entanto, a eficácia difere de acordo com a manifestação clínica e muitos casos de resistência estão surgindo. Na Índia, os antimoniais pentavalentes não são mais utilizados, devido à falta de resposta terapêutica em pacientes infectados com *L. donovani*. Estes fármacos são contraindicados para gestantes e apresentam muitos efeitos adversos, entre eles, artralgia, mialgia, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatite, pancreatite, náuseas e vômitos (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; DORLO et al., 2012; GRIENSVEN, DIRO, 2012; MURRAY, 2012; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

O *antimoniato de meglumina (Glucantime®)* é utilizado na dose de 15–20 mg/kg/dia, por 20 a 40 dias, de acordo com a indicação, por via intravenosa ou intramuscular. Vale ressaltar que as aplicações intramusculares são dolorosas e podem formar abscessos frios, além do risco de infecção secundária. Os efeitos colaterais sistêmicos exigem supervisão médica (TAVARES, 2001; FRÉZARD, DEMICHELI, RIBEIRO, 2009; MALTEZOU, 2010; MELO, FORTALEZA, 2013; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

O *estibogluconato de sódio (Pentostam®)* é menos tóxico que os antimoniais mais antigos, sendo o mais eficaz entre os fármacos disponíveis para o tratamento de leishmaniose. A dose recomendada é de 20 mg/kg/dia, durante 28-30 dias, por via intravenosa ou intramuscular (TAVARES, 2001; MARKELL, JOHN, KROTOSKI, 2003; MALTEZOU, 2010; MURRAY, 2012; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

1.2.6.2 Anfotericina B

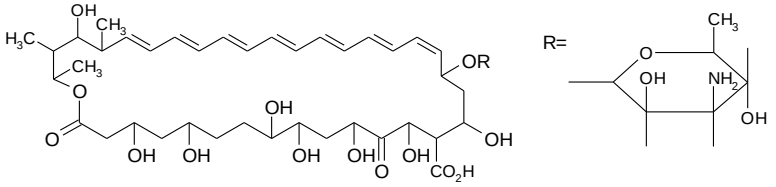


Figura 8: Estrutura da anfotericina B.

A anfotericina B (Figura 8) é macrolídeo antifúngico, introduzido no início dos anos 1960. Este composto induz a formação de poros na membrana celular do parasita

e tem boa atividade leishmanicida. É um antibiótico poliênico isolado de *Streptomyces nodosus*. A atividade leishmanicida de anfotericina B é atribuída à afinidade seletiva pelo ergosterol (esterol que constitui a membrana plasmática da *Leishmania,* homólogo ao colesterol, mas é específico do parasita). Na membrana há a formação de poros aquosos, que por ação osmótica provocam a lise celular. As desvantagens da anfotericina B são: baixa solubilidade aquosa, o que influencia a biodisponibilidade e toxicidade, e administração parenteral por infusão lenta (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; LAGE et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 2016). Nos países em que foram observados casos de resistência aos antimoniais pentavalentes, a anfotericina B é utilizada como tratamento de primeira escolha, com taxas de cura entre 90-95%. No entanto, existem relatos de resistência a este fármaco (MELO, FORTALEZA, 2013; SUNDAR, SINGH, SINGH, 2014; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

Os efeitos tóxicos do desoxicolato de anfotericina B foram reduzidos com o advento das formulações lipídicas do fármaco. Três formulações lipídicas de anfotericina B são comercialmente disponíveis: lipossômica, complexo lipídico e dispersão coloidal. A dose de anfotericina B lipossômica recomendada é de 2,5 mg/kg/dia durante 20 dias. Neste contexto, a anfotericina B lipossômica é a melhor opção para o tratamento de coinfectados com o HIV. As formulações lipídicas podem ser especialmente úteis a pacientes que não respondem ao tratamento antimonial ou que não conseguem tolerar os cursos prolongados do tratamento parenteral. No entanto, o alto custo desta apresentação farmacêutica dificulta o uso em populações carentes que, em geral, são as mais acometidas por essa doença (TRACY et al., 2003; PALUMBO, 2008; CROFT, OLLIARO, 2011; TIUMAN et al., 2011; MURRAY, 2012; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; DORLO et al., 2012; GRIENSVEN, DIRO, 2012; MURRAY, 2012; SUNDAR, SINGH, SINGH, 2014; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; LAGE et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 2016; OKWOR, UZONNA, 2016).

1.2.6.3 Pentamidina

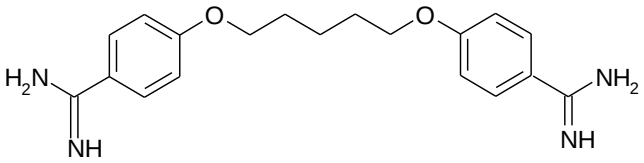


Figura 9: Estrutura da pentamidina.

A pentamidina (Figura 9) é uma diamidina aromática, de administração intravenosa. Este fármaco é ainda utilizado devido à sua estabilidade, solubilidade em água e menor toxicidade comparada aos demais fármacos desta classe. A pentamidina é recomendada como fármaco de segunda escolha, devido aos efeitos adversos provocados. No Peru, estudos em pacientes infectados com *L. braziliensis*, pentamidina apresentou baixa taxa de cura (35%). É utilizada como alternativa aos pacientes que não respondem ao tratamento com antimoniais ou formulações lipídicas de anfotericina B. É contraindicada para pacientes com nefropatias, diabetes mellitus, hipoglicemia e cardiopatias. O mecanismo de ação é desconhecido, mas a hipótese aventada está relacionada à ligação ao DNA, provocando interferência na síntese proteica (COELHO, TOSI, COTRIM, 2004; TEMPONE et al., 2004; SERVICE et al., 2006; TIUMAN et al., 2011; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; PORCHEDDU, GIACOMELLI, DE LUCA, 2012; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; GUTIÉRREZ et al., 2016).

1.2.6.4 Miltefosina

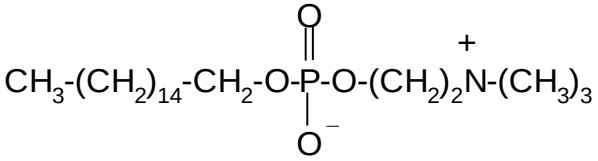


Figura 10: Estrutura da miltefosina.

Na Índia, em 2002, a miltefosina (Figura 10) foi licenciada para a terapêutica da LV. É o fármaco de primeira escolha para o tratamento de calazar na Índia, Nepal e Bangladesh. Atualmente, este fármaco, também, está licenciado para o tratamento da leishmaniose na Alemanha e Colômbia (GRIENSVEN, DIRO, 2012; READY, 2014; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; SAVOIA, 2015).

Miltefosina (Impavidow®), derivado hexadecilfosfocolina (Figura 10), foi originalmente desenvolvido como fármaco com atividade antitumoral. Estudos mostraram alta atividade contra *Leishmania*, apresentando bons resultados para o tratamento em crianças e em pacientes resistentes aos fármacos disponíveis. É o primeiro e único fármaco leishmanicida de uso oral. A dose recomendada em monoterapia é de 2,5 mg/kg/dia durante 28 dias (SANTOS et al., 2008; TEMPONE et al., 2010; MALTEZOU, 2010; TIUMAN et al., 2011; DORLO et al., 2012; GRIENSVEN, DIRO, 2012; MURRAY, 2012; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

A farmacocinética de miltefosina é caracterizada, principalmente, pela longa meia-vida no organismo, o que pode resultar em acúmulo do fármaco e o desenvolvimento de resistência. Muitas pesquisas estão analisando diferentes estratégias de terapia combinada. Os efeitos adversos apresentados pela miltefosina incluem: distúrbios gastrointestinais como vômitos, diarréia e toxicidade renal. Outro fator limitante na utilização desse fármaco é o alto custo (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; DORLO et al., 2012; SUNDAR, SINGH, SINGH, 2014; SAVOIA, 2015).

Este agente terapêutico mostrou atividade contra promastigotas de *L. donovani,* causando a morte delas por apoptose. O mecanismo de ação ainda não é bem definido, mas sabe-se que atua em enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, bloqueando a síntese e alterando a composição da membrana do parasita, provocando apoptose. Pesquisas mostram este fármaco como promissor para o tratamento da leishmaniose, porém mais estudos são necessários para verificar sua eficiência no combate às espécies de *Leishmania* existentes no Brasil. O uso de miltefosina não é recomendado para gestantes e lactantes, devido aos seus efeitos teratogênicos. A miltefosina vem sendo estudada como alternativa para o tratamento de pacientes coinfectados com HIV (SANTOS et al., 2008; EL-ON, 2009; ALAKURTTI et al., 2010; CROFT, OLLIARO, 2011; MURRAY, 2012; DORLO et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2016).

1.2.6.5 Paromomicina

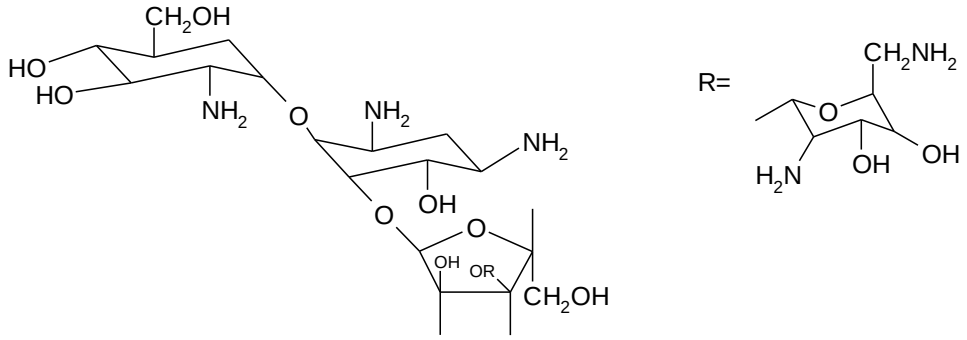


Figura 11: Estrutura da paromomicina.

Paromomicina (Figura 11), também chamada de aminosidina, é um antibiótico aminoglicosídico, isolado de culturas de *Streptomyces rimosus* na década de 1960, estruturalmente relacionado com a neomicina. Tem-se mostrado eficaz em alguns casos de LV e cutânea, em monoterapia e em terapia combinada. É utilizada em casos de resistência aos outros tratamentos, apesar da toxicidade ao hospedeiro. A dose recomendada no tratamento é de 20 mg/kg/dia, por via intramuscular, durante 20 dias consecutivos. Apresenta efeitos adversos como: aumento de transaminases hepáticas, nefrotoxicidade, desconforto gastrointestinal, diarréia e ototoxicidade, podendo causar surdez irreversível. Este fármaco é contraindicado na gravidez. Seu mecanismo de ação é desconhecido, mas se acredita que atue na síntese protéica e na alteração da fluidez e permeabilidade da membrana do parasita (TRACY et al., 2003; SANTOS et al., 2008; AMATO NETO et al., 2008; MALTEZOU, 2010; TIUMAN et al., 2011; GRIENSVEN, DIRO, 2012; SUNDAR, SINGH, SINGH, 2014; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; SAVOIA, 2015; GUTIÉRREZ et al., 2016).

1.2.6.6 Compostos em estudo

1.2.6.6.1 *Alopurinol*

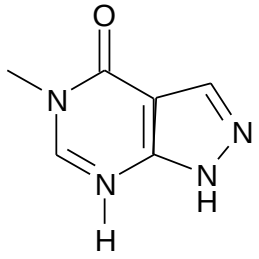
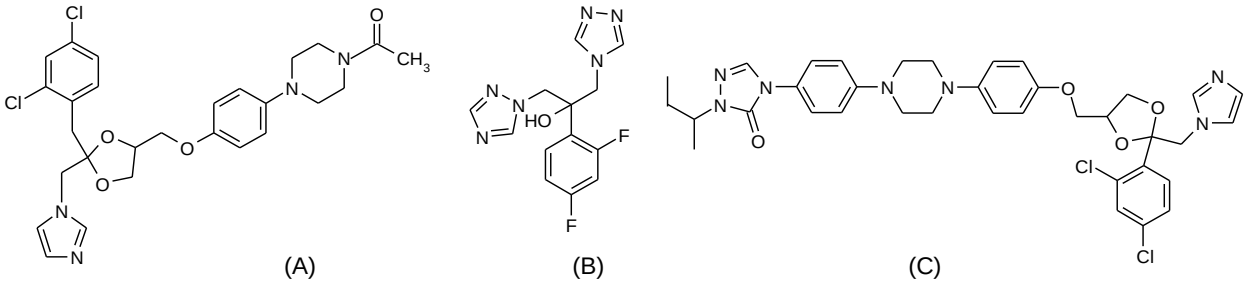


Figura 12: Estrutura do alopurinol.

Composto sintetizado em meados da década de 1950. O alopurinol, análogo de purina (Figura 12), é inibidor da enzima xantina oxidase, que vem sendo avaliado para o tratamento da leishmaniose. A *Leishmania* não tem essa enzima, mas o parasita metaboliza o alopurinol em um análogo de nucleotídio de adenosina, que é incorporado ao RNA do protozoário. Quando isto acontece, a síntese protéica é interrompida. No entanto, quando utilizado isoladamente para o tratamento de leishmaniose causada por *L. panamensis* e *L. braziliensis*, este fármaco apresentou taxa de cura de 33% (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

1.2.6.6.2 *Inibidores da síntese de ergosterol*



(A) (B) (C)

Figura 13: Estrutura (A) cetoconazol, (B) fluconazol e (C) itraconazol.

Inicialmente concebidos para a terapia de infecções fúngicas, estudos mostraram atividade contra a leishmaniose. Estes fármacos inibem a enzima 14-α-desmetilase, responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol durante a síntese da membrana celular. Desta forma, há o aumento da permeabilidade da membrana da

Leishmania (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SINGH, SUNDAR, 2012; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

Alguns fármacos estão em estudo para administração oral, como cetoconazol, itraconazol e fluconazol (Figura 13), isoladamente ou em combinação, e têm apresentado níveis variáveis de eficácia oral (REITHINGER et al., 2007; EL-ON, 2009; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

1.2.6.6.3 *Azitromicina*

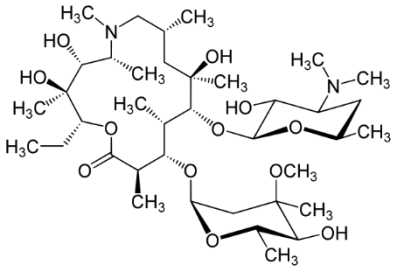


Figura 14: Estrutura da azitromicina.

A azitromicina (Figura 14) é um antibiótico de amplo espectro utilizado para o tratamento de várias infecções bacterianas. Este fármaco mostrou atividade contra *L. amazonensis, L. braziliensis, L. chagasi in vitro*. Entretanto, o mecanismo de sua ação antiparasitária é desconhecido. Além disso, como outros agentes terapêuticos, a azitromicina mostrou baixas taxas de cura (45,5%) durante o tratamento de leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012).

1.2.6.6.4 *Sitamaquina*

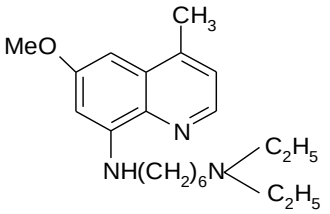


Figura 15: Estrutura da sitamaquina.

Sitamaquina (Figura 15) foi primeiramente sintetizada como agente antimalárico. É análogo das 8-aminoquinolinas, administrado por via oral, com meia-vida de 26 horas e está em ensaios clínicos de fase II. Apresenta maior biodisponibilidade que a miltefosina, mostrando-se promissor para o tratamento da LV. Acredita-se que atue na cadeia respiratória, provocando estresse oxidativo e promovendo apoptose do protozoário. Apresenta como efeitos adversos: dor abdominal, dor de cabeça e efeitos renais graves (CROFT, OLLIARO, 2011; TIUMAN et al., 2011; SUNDAR, SINGH, SINGH, 2014; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015).

1.2.7 **Vacinas**

O conceito de vacina contra a leishmaniose é sustentado pela observação de que a maioria dos pacientes recuperados da infecção apresenta imunidade tardia ao parasita (BEAUMIER et al., 2013). Diferentes tipos de vacinas têm sido testados contra a leishmaniose, utilizando parasitas virulentos, atenuados, espécies não patogênicas, parasitas inteiros mortos, subunidades de protozoários, vacinas de DNA, componentes de transmissão do vetor, como a saliva. As vacinas aprovadas são indicadas ao combate da leishmaniose canina (Leishmune®, Leishtec® e CaniLeish®) (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SINGH, SUNDAR, 2012; BADIEE et al., 2013; JAIN, JAIN, 2015).

Da mesma forma que acontece com os fármacos, não há um mercado lucrativo que incentive o desenvolvimento da vacina contra a leishmaniose pelas grandes indústrias. A pesquisa dessas vacinas é impulsionada e desenvolvida por entidades sem fins lucrativos, como por exemplo, universidades e institutos de pesquisa (BEAUMIER et al., 2013; JAIN, JAIN, 2015).

Parasitas vivos – popularmente conhecida como "leishmanização", foi desenvolvida em 1940 contra a forma cutânea e utilizada em vários países. Atualmente, o seu uso é limitado ao Uzbequistão. A sua utilização foi interrompida devido à falta de segurança. Esta vacina é composta por parasitas vivos virulentos ou atenuados de *L. major*. Estes eram inoculados na pele e, desta forma, induziam infecção leve com subsequente imunidade (NAGILL, KAUR, 2011; KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SINGH, SUNDAR, 2012; BADIEE et al., 2013; BEAUMIER et al., 2013;

AEBISCHER, 2014; REZVAN, MOIFA, 2015; JAIN, JAIN, 2015; SRIVASTAVA et al., 2016).

Até 1989, países da União Soviética, Irã, Israel, Turcomenistão e Uzbequistão vacinaram milhares de pessoas por meio da leishmanização. Muitas pessoas desenvolveram grandes lesões incontroláveis, portanto, por estas razões esta técnica foi abandonada (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; BADIEE et al., 2013; AEBISCHER, 2014; JAIN, JAIN, 2015).

Parasitas não-patogênicos **-** estudos avaliaram o uso de espécie não patogênica em seres humanos, para indução de imunidade protetora. Breton e colaboradores (2005) investigaram o potencial de *L. tarentolae* de lagarto, espécie não patogênica para seres humanos e outros mamíferos, mas que expressa genes importantes para virulência do protozoário. Eles descobriram que uma única injeção intraperitoneal de *L. tarentolae* provoca resposta imunológica protetora contra a forma infecciosa de *L. donovani* em ratos, promovendo diminuição da carga parasitária no baço e fígado. Esta vacina continua em investigação (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012).

Parasitas atenuados **–** corresponde à redução da virulência do agente patológico, para indução da resposta imune protetora, sem causar os efeitos graves da doença. Nestes casos, as *Leishmanias* foram irradiadas com radiação γ, o que provocou alterações químicas e genéticas no parasita. Em modelos animais, estes parasitas induziram imunidade protetora. No entanto, esta técnica necessita de melhor investigação para definir questões de seguranças e, também, o tipo de alteração provocada no protozoário (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; BEAUMIER et al., 2013; JAIN, JAIN, 2015; SRIVASTAVA et al., 2016).

Parasitas mortos - vacina composta por agentes patogênicos mortos, em que estes são cultivados em cultura e, em seguida, mortos pelo calor. A vantagem dessas vacinas é a segurança e o baixo custo. Entretanto, a análise de eficácia com vacinas preparadas por esta técnica mostrou que estas não conferem proteção significativa aos humanos (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; BADIEE et al., 2013; JAIN, JAIN, 2015; SRIVASTAVA et al., 2016).

Subunidades do parasita – nesta situação, utilizaram-se epítopos capazes de aumentar a resposta imune. Desta forma, com esta técnica são selecionadas as

proteínas epítopas, que induzam a resposta imune do hospedeiro contra o patógeno (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012).

Frações de Leishmania (Leishmune®) – esta vacina é constituída por fração glicoprotéica purificada de *L. donovani*, denominada ligante manose fucose (FML), presente na superfície de promastigotas de *Leishmania* (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; JAIN, JAIN, 2015; SRIVASTAVA et al., 2016).

Proteínas definidas – uso da glicoproteína 63 (gp63) testada para o desenvolvimento de vacina contra *L. major*. A gp63 é uma metaloprotease, que promove a absorção de promastigotas do parasita pelos macrófagos no hospedeiro mamífero. Esta vacina apresentou variabilidade na atividade, entre a proteção e as manifestações exacerbadas. Na busca da vacina, outra proteína que vem sendo estudada é a KMP-11, presente na membrana de *L. donovani* (KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SUNDAR, SINGH, SINGH, 2014; REZVAN, MOIFA, 2015; JAIN, JAIN, 2015).

Vacinas de DNA recombinante – consistem na injeção direta de DNA de plasmídeo, que pode promover a biossíntese de proteínas endógenas e resposta imunológica específica. Os resultados com esta técnica mostraram proteção parcial em ratos. As vacinas de DNA são de fácil produção e administração, estáveis e muito imunogênicas, o que facilitaria a produção em grande escala. Estas vacinas são capazes de elucidar a imunidade produzida pelas células T CD4 e CD8 (NAGILL, KAUR, 2011; BADIEE et al., 2013; BEAUMIER et al., 2013; JAIN, JAIN, 2015; SRIVASTAVA et al., 2016).

Componentes de transmissão – são vacinas, constituídas por antígenos da glândula salivar de flebotomíneos, pois a saliva contém muitas substâncias farmacologicamente ativas capazes de induzir respostas inflamatórias e imunológicas (BADIEE et al., 2013; BEAUMIER et al., 2013).

Apesar de muitos estudos realizados e das muitas razões para acreditar que o desenvolvimento de vacina eficaz contra a leishmaniose é viável, não há uma vacina disponível contra qualquer forma de leishmaniose em seres humanos. Muitos fatores limitam o progresso no desenvolvimento desta vacina, entre eles: custos, complexidade antigênica, variabilidade, segurança e os diferentes tipos de resposta imunológica

(KOBETS, GREKOV, LIPOLDOVÁ, 2012; SINGH, SUNDAR, 2012; BADIEE et al., 2013; AEBISCHER, 2014; ELMAHALLAWY, AGIL, 2015; JAIN, JAIN, 2015; SRIVASTAVA et al., 2016).

Um dos principais desafios para o tratamento da doença de Chagas e da leishmaniose é o fato de o parasita infectar macrófagos e se manter na forma intracelular. Neste contexto, os fármacos tradicionais enfrentam dificuldades para penetrar no interior dessas células e matar o patógeno. Recentemente, a associação de agentes leishmanicidas com nanotransportadores tem emergido como abordagem promissora para favorecer a penetração do fármaco nos macrófagos. O uso da nanotecnologia para o tratamento dessas doenças tem demonstrado resultados promissores como alternativas terapêuticas (GUTIÉRREZ et al., 2016).

1.3 PRODUTOS NATURAIS COMO PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS: FLAVONÓIDES – 3-HIDROXIFLAVONA

Os produtos naturais continuam sendo fonte importante de inspiração para o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos, particularmente compostos utilizados para o tratamento de doenças infecciosas. No período de 1981 a 2002, das 162 novas entidades químicas aprovadas como fármacos anti-infecciosos pelas agências reguladoras 99 (61%) eram candidatos a fármacos de origem natural (análogo semissintético, sintético ou o próprio composto natural). As pesquisas com produtos naturais que apresentam atividade tripanomicida e leishmanicida promoveram novo impulso no planejamento de novos compostos bioativos para as doenças negligenciadas (SALEM, WERBOVETZ, 2006; MUZITANO et al., 2006; MARIN et al., 2011; GRECCO et al., 2012; LAGE et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015).

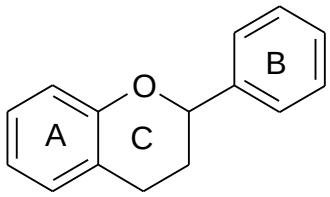


Figura 16: Estrutura base dos flavonóides.

Estruturalmente, flavonóides constituem o maior grupo de compostos fitoquímicos polifenólicos, com 15 átomos de carbono em sua estrutura básica, possuindo um núcleo flavona com dois anéis aromáticos – A e B, interligados por um anel pirano (Figura 16). A forma glicosídica permite melhor absorção intestinal e biodisponibilidade destes compostos. Representam uma das maiores e diversificadas classes de metabólitos secundários de plantas, presentes em vegetais, frutas e bebidas e, portanto, são importantes componentes da dieta diária (LOPES et al., 2000; ENGELMANN, HUTCHESON, CHENG, 2005; TADESMIR et al., 2006; MARIN et al., 2011; LAGE et al., 2015; BEER et al., 2016).

Os flavonóides são conhecidos por apresentarem muitas propriedades benéficas à saúde humana, em razão das interações com alvos celulares. Muitos destes compostos apresentam atividades antioxidantes, antirradicais livres, antiparasitárias, antiinflamatórias, antivirais e anticancerígenas (PIETRO et al., 2002; MARIN et al., 2011; LAGE et al., 2015; BEER et al., 2016).

Estudos mostraram que alguns flavonóides e seus derivados exercem significativa atividade sobre o crescimento *in vitro* de *Leishmania* sp. e *T. cruzi*. Desta forma, muitos desses flavonóides são fortes candidatos para aplicações futuras na terapia combinada para o combate a essas infecções. Entretanto, de maneira geral, poucos estudos têm investigado as propriedades leishmanicida e tripanomicida desta classe de compostos polifenólicos (MUZITANO et al., 2006; GRECCO et al., 2010; MARIN et al., 2011; SILVA, MAQUIAVELI, MAGALHÃES, 2012; GRECCO et al., 2012; LAGE et al., 2015; BEER et al., 2016). As chalconas, que são precursores metabólicos dos flavonóides, também, têm demonstrado atividade leishmanicida com baixa citotoxicidade (SHIVAHARE et al., 2014; MELLO et al., 2014).

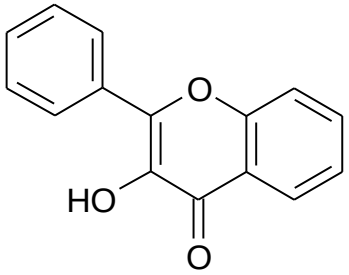


Figura 17: Estrutura da 3-hidroxiflavona.

Estudo realizado por Tasdemir e colaboradores (2006) avaliou a atividade tripanomicida e leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de uma série de flavonóides. A 3-hidroxiflavona (Figura 17) apresentou potente atividade antiparasitária *in vitro* com mínima ou nenhuma citotoxicidade. Neste estudo, este flavonóide demonstrou interessante atividade anti-*T. cruzi*, com IC_{50}= 7,7 µg/mL. Além disso, o mesmo composto mostrou promissora atividade leishmanicida com IC_{50} de 2,94 µM, comparável com o padrão miltefosina, IC_{50} 2,72 µM. No entanto, os ensaios *in vivo* mostraram nula ação antiparasitária. Os autores levantaram dois pontos que podem ter prejudicado a atividade biológica deste flavonóide: baixa biodisponibilidade e a rápida biotransformação (através das reações do metabolismo de metilação, conjugação com sulfato e glicuronidação) que esse composto pode sofrer. Neste sentido, a metabolização da hidroxila presente na estrutura da 3-hidroxiflavona pode acarretar a eliminação precoce do agente bioativo. Essas características indesejáveis indicam a necessidade de otimização e desenvolvimento de transportadores e sistemas de distribuição destes compostos capazes de melhorar a biodisponibilidade e reduzir a rápida eliminação que o flavonóide sofre. Assim, sistemas de transporte de fármacos, como o uso de dendrímeros, podem favorecer a atividade antiparasitária *in vivo* de flavonóides, promovendo liberação controlada e, também, melhorando a biodisponibilidade desses agentes bioativos. Estas evidências mostram que compostos polifenólicos são potenciais candidatos e apresentam promissora atividade para o tratamento da doença de Chagas e leishmaniose.

O parasita *Leishmania* apresenta em sua superfície uma proteína de membrana, que foi identificada como transportador intracelular de ferro (LIT1). Esta desempenha papel importante no transporte de ferro para os parasitas, essencial para a replicação destes dentro dos macrófagos. Estudos sugerem que limitar o acesso do protozoário ao ferro é uma estratégia que inibe o processo evolutivo de *Leishmania*. A redução de ferro, proveniente de fontes externas, promove defeito na via de biossíntese do grupo heme, importante para o crescimento e a multiplicação do parasita. Estudos *in vitro* com flavonóides indicaram a interação destes com íons metálicos por ligação de hidrogênio, demonstrando forte afinidade com o ferro. A quelação do ferro tem sido aventada como ferramenta útil no controle da leishmaniose em condições *in vitro*. Estudos

demonstraram atenuação do crescimento de promastigotas com o uso de agentes quelantes, como a 3-hidroxiflavona. Este flavonóide apresentou promissora atividade leishmanicida *in vitro* com mínima ou nenhuma citotoxicidade (TASDEMIR et al., 2006; ENGELMANN, HUTCHESON, CHENG, 2005; SEN et al., 2005, 2008).

Pesquisas mostram que os flavonóides, dentre estes a 3-hidroxiflavona, promovem alteração na estrutura da mitocôndria do parasita, devido a modificações no DNA mitocondrial e redução da produção de ATP (FIDALGO, GILLE, 2011). Com relação à doença de Chagas, alguns estudos mostram que a atividade tripanomicida dos flavonóides pode estar relacionada à ação inibitória de cisteíno-proteases, como a cruzaína (ASSIS et al., 2013). Desta forma, existem várias hipóteses aventadas sobre o mecanismo de ação de flavonóides frente aos parasitas dessas doenças negligenciadas (GUINÉZ et al., 2015).

1.4 LATENCIAÇÃO

Em 1958, Adrien Albert propôs o termo pró-fármaco pela primeira vez para determinar compostos que sofrem biotransformação antes de promover o efeito farmacológico (HSIEH, FENG, FANG, 2009; PATIL, SHIROTE, 2011; ZAWILSKA, WOJCIESZAK, OLEJNICZAK, 2013). Em 1959, Harper introduziu o termo latenciação de fármacos para o processo de obtenção de pró-fármacos (KOROLKOVAS, 1988). A definição clássica desse processo consiste na ligação do fármaco a um transportador, através de ligação biorreversível, tornando o composto farmacologicamente inativo. No organismo, mediante ataque químico ou enzimático, o fármaco, ou composto bioativo, é convertido no fármaco matriz, antes ou após alcançar o local de ação (Figura 18) (ALBERT, 1958; TESTA, 2004; CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005; MAHATO, TAI, CHENG, 2011; PATIL, SHIROTE, 2011; CHOI-SLEDESKI, WERMUTH, 2015; CLAS, SANCHEZ, NOFSINGER, 2014; DA, 2014; GIANG, BOLAND, POON, 2014; MURA et al., 2015; SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016; NICOLAS, 2016).

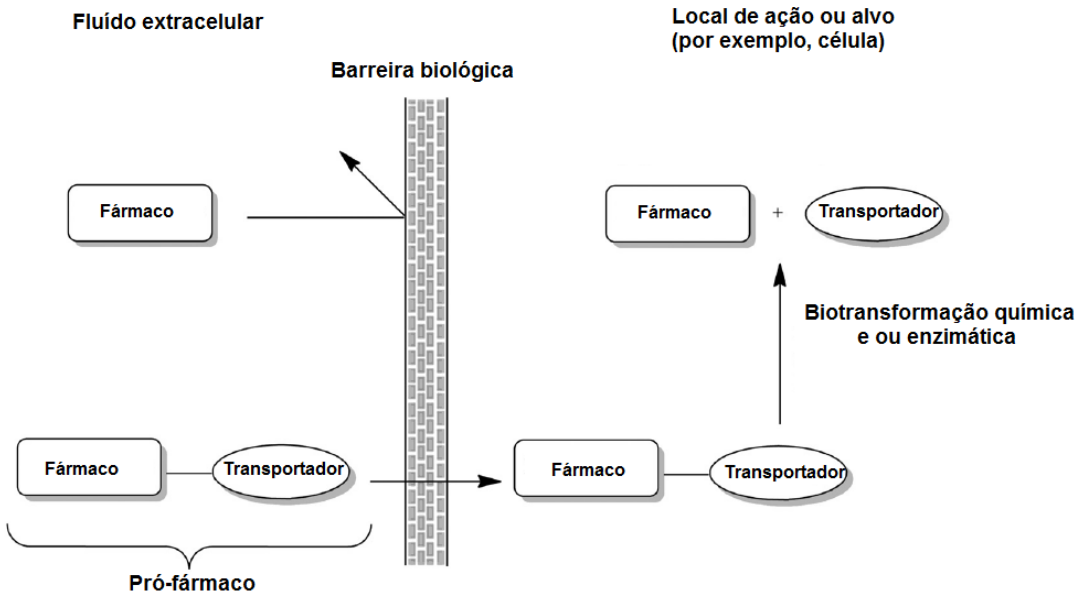


Figura 18: Representação esquemática sobre o conceito clássico de pró-fármaco (HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011).

A latenciação é um método poderoso e versátil, que pode ser aplicado à vasta gama de fármacos matriz. A obtenção de fármacos latentes tem por objetivo aperfeiçoar propriedades físico-químicas, envolvidas nas fases farmacêuticas e farmacocinéticas de compostos bioativos, podendo interferir, indiretamente, na fase farmacodinâmica. Assim, a latenciação tem o intuito de superar problemas como: baixa biodisponibilidade (solubilidade e permeabilidade), biotransformação precoce (eliminação pré-sistêmica, por exemplo), ação rápida, através de liberação controlada, elevada toxicidade, baixa seletividade, pois podem conter grupos que direcionem o fármaco ao local de ação, instabilidade química, características organolépticas indesejáveis, além de possibilitar a formulação destes agentes (CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005; RAUTIO et al., 2008; HSIEH, FENG, FANG, 2009; JANA, MANDLEKAR, MARATHE, 2010; FÉRRIZ, VINŠOVÁ, 2010; MAHATO, TAI, CHENG, 2011; PATIL, SHIROTE, 2011; MAZZAFERRO, BOUCHEMAL, PONCHEL, 2013; CHOI-SLEDESKI, WERMUTH, 2015; LUO et al., 2014; DA, 2014; GIANG, BOLAND, POON, 2014; CLAS, SANCHEZ, NOFSINGER, 2014; ZHOU, SUN, ZHANG, 2014; MURA et al., 2015; TASHIMA, 2015; ZARO, 2015; NICOLAS, 2016; MENG et al., 2016; JORNADA et al., 2016).

Alguns critérios são importantes e devem ser considerados durante o planejamento de pró-fármacos: existência de grupos funcionais na molécula matriz capazes de sofrer derivatização; existência de mecanismos e/ou sistemas no organismo humano capazes de bioativar o pró-fármaco, como por exemplo, enzimas; facilidade e simplicidade de síntese e purificação; estabilidade química; regeneração, *in vivo*, do composto bioativo em quantidades ideais para atividade biológica; menor toxicidade que o agente bioativo de partida. Dessa forma, com a latenciação é possível atingir diversos objetivos, mediante a escolha de transportadores adequados, que, via de regra, devem ser: desprovidos de atividade biológica, biodegradáveis, não apresentar toxicidade ou antigenicidade intrínseca, baixo custo, não acumular no organismo e apresentar grupos funcionais para ligação química com o fármaco/composto bioativo (FRIIS, BUNDGAARD, 1996; CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005; PATIL, SHIROTE, 2011; CHOI-SLEDESKI, WERMUTH, 2015; KARAMAN, 2013; ZAWILSKA, WOJCIESZAK, OLEJNICZAK, 2013; BIASUTTO, ZORATTI, 2014; MURA et al., 2015; DRAGOJEVIC, RYU, RAUCHER, 2015).

De acordo com Wermuth (1984), os fármacos latentes podem ser classificados em pró-fármacos e fármacos dirigidos. Os pró-fármacos são subdivididos em:

Pró-fármacos clássicos são substâncias que envolvem a ligação do fármaco a um transportador, promovendo a melhoria da atividade terapêutica por meio de alterações farmacocinéticas, em geral, como biodisponibilidade. Proporcionam, também, a diminuição da toxicidade, prolongamento da ação, aumento da seletividade, mediante a escolha de transportador adequado (TESTA, CALDWELL, 1996; CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005; TESTA, KRÄMER, 2009; VERMA et al., 2009; MAZZAFERRO, BOUCHEMAL, PONCHEL, 2013; JORNADA et al., 2016).

Bioprecursores são pró-fármacos que não têm transportador, mas são biotransformados *in vivo* por ação de diferentes sistemas enzimáticos. Estes pró-fármacos são substratos para as enzimas que os metabolizam, ocorrendo, assim, a conversão no composto ativo. Os pró-fármacos bioprecursores dependem de reações oxidativas ou redutivas para a ativação (JANA, MANDLEKAR, MARATHE, 2010; PATIL, SHIROTE, 2011; KARAMAN, 2013; MAZZAFERRO, BOUCHEMAL, PONCHEL, 2013; JORNADA et al., 2016).

Pró-fármacos mistos são compostos que possuem, ao mesmo tempo, características de pró-fármacos clássicos e de bioprecursores. Constituem-se em moléculas biologicamente inertes, que requerem várias etapas para a sua conversão à forma ativa, permitindo a liberação do fármaco em um sítio ou órgão específico. Desta forma, estes compostos são convertidos em múltiplos locais, em etapas paralelas ou sequenciais. Nesses, por exemplo, o transportador deve ser biotransformado por sistemas oxidativos ou redutivos e, em seguida, o fármaco/composto bioativo é liberado do transportador. Sistema importante dessa classe é o CDS – *Chemical Delivery System* (BREWSTER, BODOR, 1994; CHUNG et al., 2005; JANA, MANDLEKAR, MARATHE, 2010; CHOI-SLEDESKI, WERMUTH, 2015; MAZZAFERRO, BOUCHEMAL, PONCHEL, 2013; JORNADA et al., 2016).

Pró-fármacos recíprocos são compostos em que o transportador e o fármaco/composto bioativo matriz apresentam atividade biológica, permitindo, assim, sinergismo de ação por dupla ou única atividade por mecanismos distintos (SINGH, SHARMA, 1994; MAZZAFERRO, BOUCHEMAL, PONCHEL, 2013; JORNADA et al., 2016).

Fármacos dirigidos são formas latentes concebidas para ter seletividade a alvos específicos, como enzimas ou receptores. Os fármacos dirigidos têm como objetivo transportar o composto ativo ao local de ação e, consequentemente, há o aumento da eficácia e redução dos efeitos adversos em outras regiões do organismo. Para o uso desta abordagem é extremamente necessário o conhecimento de características moleculares e funcionais do alvo de interesse (HSIEH, FENG, FANG, 2009; JANA, MANDLEKAR, MARATHE, 2010; FÉRRIZ, VINŠOVÁ, 2010; MAHATO, TAI, CHENG, 2011; PATIL, SHIROTE, 2011; KARAMAN, 2013; MAZZAFERRO, BOUCHEMAL, PONCHEL, 2013; JORNADA et al., 2016).

Os pró-fármacos podem ser preparados através da obtenção de ésteres, amidas, carbonatos, carbamatos, fosfatos, oximas e iminas, entre outras funções (RAUTIO et al., 2008; JORNADA et al., 2016). Dentre as funções possíveis para o planejamento de pró-fármacos serão destacados ésteres e amidas, pois são as funções orgânicas utilizadas neste estudo.

Pró-fármacos do tipo éster são os mais comumente utilizados na terapêutica e estes correspondem a, aproximadamente, 50% dos fármacos latentes comercializados. Nestes casos, o pró-fármaco sofre ativação por hidrólise química ou enzimática para liberação do fármaco/composto bioativo. A clivagem enzimática é realizada por esterases sanguíneas ou hepáticas. As enzimas responsáveis pela ruptura são: carboxilesterases, acetilcolinesterases, butirilcolinesterases e arilesterases. Muitos pró-fármacos são obtidos através do uso de polímeros que, por exemplo, podem aumentar a solubilidade e prolongar o tempo de ação (HATFIELD et al., 2008; JANA, MANDLEKAR, MARATHE, 2010; FÉRRIZ, VINŠOVÁ, 2010; MAHATO, TAI, CHENG, 2011; CHUNG, BOSQUESI, SANTOS, 2011; PATIL, SHIROTE, 2011; KARAMAN, 2013; ZAWILSKA, WOJCIESZAK, OLEJNICZAK, 2013; ZARO, 2015).

As amidas são utilizadas com menor frequência em pró-fármacos, devido à sua maior estabilidade *in vivo*. A ligação amida é geralmente hidrolisada por amidases como, proteases e peptidases (HATFIELD et al., 2008; FÉRRIZ, VINŠOVÁ, 2010; JANA, MANDLEKAR, MARATHE, 2010; MAHATO, TAI, CHENG, 2011; CHUNG, BOSQUESI, SANTOS, 2011; PATIL, SHIROTE, 2011; KARAMAN, 2013).

O pró-fármaco ideal deve ter as seguintes características: nenhuma atividade, estabilidade química em diferentes pH, solubilidade nos fluídos corpóreos e boa absorção (JANA, MANDLEKAR, MARATHE, 2010).

Além das vantagens já mencionadas, a latenciação permite, também, a economia de tempo e recursos no desenvolvimento de novos fármacos, a reintrodução de fármacos retirados do mercado por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novos fármacos antes que sejam lançados na terapêutica (CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005; CHOI-SLEDESKI, WERMUTH, 2015; JORNADA et al., 2016). Esse processo de modificação molecular vem sendo amplamente utilizado na terapêutica, tornando-se uma das principais ferramentas para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Atualmente, observa-se aumento considerável no número de trabalhos desenvolvidos com pró-fármacos em patentes, publicados em periódicos, em estudos clínicos e em medicamentos comercializados. Entre 2010 e 2012, aproximadamente 10% de todos os medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico eram pró-fármacos. Em 2009, 15% dos 100 fármacos mais vendidos

(*blockbusters*) de baixa massa molecular foram classificados como pró-fármacos. Em 2008, os pró-fármacos corresponderam a 33% dos fármacos aprovados pelo FDA (STELLA, NTI-IADDAE, 2007; RAUTIO et al., 2008; MÜLLER, 2009; HSIEH, FENG, FANG, 2009; HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011; ZAWILSKA, WOJCIESZAK, OLEJNICZAK, 2013; CLAS, SANCHEZ, NOFSINGER, 2014; JORNADA et al., 2016). Chung e colaboradores, em 2008 e 2011, publicaram estudos mostrando a utilização da latenciação no planejamento de fármacos para doenças negligenciadas e extremamente negligenciadas.

1.5 DENDRÍMEROS NO TRANSPORTE DE FÁRMACOS

Em 1978, Vöglte propôs a síntese e aplicação biológica de polímeros dendríticos através de síntese divergente. Nesta abordagem, os núcleos eram polifuncionais e reagiam com unidades monoméricas. Com esta estratégia, obtiveram-se dendrímeros imperfeitos e de pequenas gerações (QUADIR, HAAG, 2012).

Dendrímero constitui uma nova classe de materiais poliméricos, criados em 1979, pela equipe de investigação de Donald Tomalia, sendo o primeiro deles o dendrímero de poliamidoamina (PAMAM). A palavra dendrímero tem origem grega: *dendron* significa “árvore” ou “ramos” e *meros* significa “parte” (FISHER, VÖGTLE, 1999; ESFAND, TOMALIA, 2001; McNERNY et al., 2009; WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; WANG, QUÉLÉVER, PENG, 2012; KANNAN et al., 2014; ARSENEAULT, WAFER, MORIN, 2015; AHMED et al., 2016). Atualmente, o dendrímero de PAMAM é o mais utilizado em aplicações biomédicas, mas na literatura também estão descritos os dendrímeros de: polipropilenoiminas (PPI), polilisinas (PLL), poliésteres (PGLSA-OH e *Bis*MPA), poliamidas, dendrímeros à base de fósforo e triazina. Os dendrímeros de PAMAM (Starburst®) e PPI (Astramol®) estão disponíveis comercialmente (FISHER, VÖGTLE, 1999; ESFAND, TOMALIA, 2001; McNERNY et al., 2009; WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; KANNAN et al., 2014; LIU, TEE, CHIU, 2015).

Os dendrímeros (Figura 19) são polímeros sintéticos versáteis, bem definidos, extremamente ordenados, globulares, de tamanhos nanoméricos (10 a 30 Á), com grande número de grupos funcionais reativos e espaços interiores protegidos,

características que os tornam interessantes para aplicação biológica (MONTANARI et al., 1998; PILLAI, PANCHAGNULA, 2001; KAUR et al., 2014; KANNAN et al., 2014; SCHCHARBIN et al., 2014; ARSENEAULT, WAFER, MORIN, 2015; LIU, TEE, CHIU, 2015; LEIRO et al., 2015; WANG et al., 2016). Dendrímeros diferem dos polímeros clássicos em: ramificações simétricas e regulares, funcionalização terminal e multivalência, monodispersão ou baixa polidispersão e estrutura muito ramificada. Estas propriedades permitem a obtenção de estruturas controladas com uniformidade molecular, superfície multifuncional e massa molecular única, propriedades interessantes para aplicação destes como transportadores no planejamento de fármacos. Podem ser divididos em três partes: superfície com elevado número de sítios reativos, camada de ligações repetidas partindo do centro (cavidade interna) e o foco central ou núcleo (TOMALIA et al., 1985; LIU, FRÉCHET, 1999; McNERNY et al., 2009; WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; GARDIKIS et al., 2012; KAMINSKAS et al., 2012; WANG, QUÉLÉVER, PENG, 2012; YAVUZ, PEHLIVAN, ÜNLÜ, 2013; KANNAN et al., 2014; SCHCHARBIN et al., 2014; PARAT et al., 2015; WU et al., 2015; ARSENEAULT, WAFER, MORIN, 2015; LIU, TEE, CHIU, 2015; SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016; AHMED et al., 2016; MENG et al., 2016).

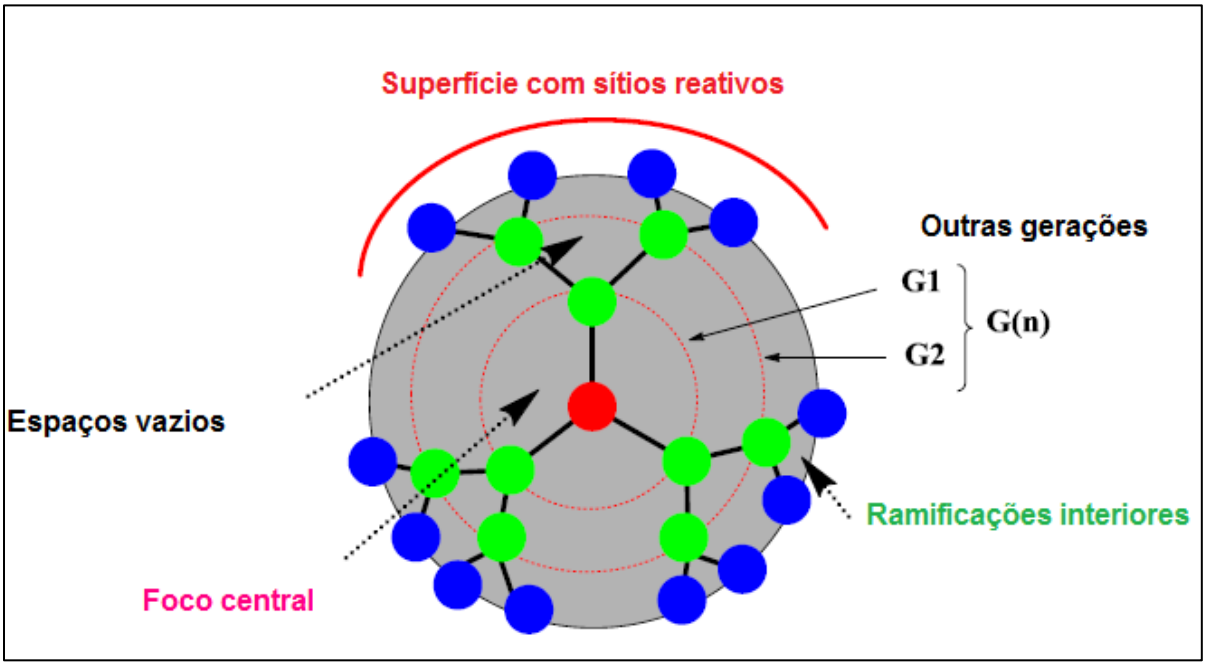


Figura 19: Representação esquemática de um dendrímero (MIGNANI et al., 2013).

Estas moléculas crescem a partir de um núcleo (designado geração 0) e cada conjunto de unidades monoméricas adicionadas é designado por geração. Esta adição torna cada geração mais ramificada que a anterior até se obter estrutura globular e densa. Existem dendrímeros até a décima geração, mas a partir da sétima geração observa-se grande impedimento estérico entre as ramificações, o que reduz o rendimento na síntese desses compostos. As estruturas dendríticas podem ser sintetizadas quimicamente por dois métodos principais: o convergente e o divergente (TOMALIA et al., 1985; KAMINSKAS et al., 2012; YAVUZ, PEHLIVAN, ÜNLÜ, 2013).

O método convergente se inicia com a síntese das ramificações, ou seja, da periferia do dendrímero através de fragmentos denominados *dendrons*, que, posteriormente, são ligados ao núcleo para a obtenção do dendrímero. Este método permite a obtenção de polímeros menos imperfeitos, ou seja, com baixa polidispersão (ESFAND, TOMALIA, 2001; WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; YAVUZ, PEHLIVAN, ÜNLÜ, 2013; LIU, TEE, CHIU, 2015).

O método divergente consiste no crescimento a partir de um foco central, em que as ramificações são justapostas através de etapas sintéticas repetitivas. Este método é caracterizado por reações que ocorrem por aumento do número de sítios, como se o dendrímero estivesse sendo construído “de dentro para fora”, até se obter o polímero desejado (ESFAND, TOMALIA, 2001; WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; YAVUZ, PEHLIVAN, ÜNLÜ, 2013; KANNAN et al., 2014; WU et al., 2015; LIU, TEE, CHIU, 2015).

Os dendrímeros pertencem a um importante grupo de nanotransportadores, devido às suas características de baixa polidispersão, hidrofilicidade, lipossolubilidade, tamanho da partícula, elevado grau de funcionalidade, tamanho, forma e biocompatibilidade. Estes compostos podem melhorar as propriedades fisíco-químicas (solubilidade), farmacocinéticas (tempo de distribuição, liberação controlada e biodisponibilidade) e, consequentemente, de forma indireta, farmacodinâmicas de fármacos. Os dendrímeros são capazes de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, devido às interações estabelecidas entre o fármaco e o dendrímero, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas. Além disso, estes compostos podem proporcionar proteção ao fármaco contra degradação, maior

estabilidade aos agentes bioativos, aumento da eficácia e redução da toxicidade (LIU, FRÉCHET, 1999; D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005; MEDINA, EL-SAYED, 2009; ASTRUC, BOISSELIER, ORNELAS, 2010; JAIN et al., 2010; WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; GARDIKIS et al., 2012; MIGNANI et al., 2013; WU et al., 2015; LIU, TEE, CHIU, 2015; MENG et al., 2016; SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016; AHMED et al., 2016; WANG et al., 2016). Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com a utilização de dendrímeros nas áreas química, biológica, nanotecnológica, de novos materiais, engenharia e eletrônica. Estes compostos apresentam outras aplicações no desenvolvimento de agentes de imagem para diagnóstico em Ressonância Magnética Nuclear, biossensores, terapia fotodinâmica e gênica (WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; KESHARWANI et al., 2011; QUADIR, HAAG, 2012; KAMINSKAS et al., 2012; KANNAN et al., 2014). Alguns autores referem os dendrímeros como proteínas artificiais, devido às semelhanças de tamanho, estrutura globular e tridimensional. No entanto, as proteínas são constituídas por diferentes interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e de dissulfeto, enquanto o dendrímero é constituído, principalmente, por ligações covalentes entre o núcleo e as ramificações. Neste contexto, os dendrímeros de polilisina têm potencial para apresentar propriedades físico-químicas semelhantes às peptídeos (KAMINSKAS et al., 2012; YAVUZ, PEHLIVAN, ÜNLÜ, 2013; KANNAN et al., 2014; AHMED et al., 2016).

Os fármacos podem interagir com o transportador dendrimérico por meio de: ligação covalente à superfície do dendrímero; interação com a malha dendrimérica através de um agente espaçante; os *dendrons* podem ser construídos com o composto bioativo; fármacos encapsulados na estrutura dendrimérica (cavidade interna) interagindo por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Normalmente, os fármacos ligados covalentemente na superfície do dendrímero estão na forma de pró-fármacos (KLAJNERT, BRYSZEWKA, 2001; D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005; CHENG, et al., 2007; WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; WANG, QUÉLÉVER, PENG, 2012; MIGNANI et al., 2013; KAUR et al., 2014; LIU, TEE, CHIU, 2015; NICOLAS, 2016; SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016; AHMED et al., 2016). Ramificações construídas com fármacos, promovendo aumento exponencial do composto ativo a cada geração do dendrímero, com ligações lábeis que,

em condições fisiológicas liberam o composto ativo, foram descritas no pedido de patente de Ferreira e Giarolla (2008). Para o uso destas moléculas no planejamento de fármacos como transportadores é importante levar em consideração a biopermeabilidade macroscópica apresentada por estes compostos, sendo que dendrímeros de menores gerações apresentam maior permeabilidade e menor toxicidade (BOAS, HEEGAARD, 2004).

Estudos revelaram que a liberação controlada do dendrímero está relacionada ao número de gerações. Desta forma, gerações mais elevadas promovem liberação mais lenta do fármaco. Na comparação da liberação e toxicidade sistêmica entre dendrímero ligado covalentemente ao fármaco e o composto ativo encapsulado no polímero, o primeiro mostrou liberação superior e mais lenta (controlada) e, também, menor toxicidade que o segundo caso. A peguilação de dendrímeros promoveu aumento da solubilidade e melhor perfil de liberação (WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; YAVUZ, PEHLIVAN, ÜNLÜ, 2013).

Peptidodendrímeros são aqueles que contêm peptídeos ou aminoácidos na superfície ou incorporados nas ramificações. Estes polímeros desempenham relevante papel em diversas áreas biomédicas e podem permitir a obtenção de sistemas mais seguros para o transporte de fármacos, pois são mais solúveis, podem ser absorvidos pelas células e menos tóxicos que os análogos poliméricos lineares. Tais compostos combinam as propriedades de dendrímeros orgânicos, como multivalência, e características de peptídeos e proteínas, como catálise e suscetibilidade à degradação por proteases (NANJWADE et al., 2009; REYMOND, DARBRE, 2012; YAVUZ, PEHLIVAN, ÜNLÜ, 2013).

O produto farmacêutico mais próximo de chegar ao mercado é a formulação intravaginal VivaGel® (Starpharma), em final de ensaios clínicos. Esta preparação é composta por dendrímero microbicida de polilisina de geração 4 aniônico, sendo que o próprio dendrímero é o composto com atividade terapêutica. Este produto é indicado para o tratamento de infecções vaginais tópicas (McNERNY, LEROUEIL, BAKER, 2010; WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; MIGNANI et al., 2013; KANNAN et al., 2014; SCHCHARBIN et al., 2014; LEIRO et al., 2015).

A respeito das formas de administração, estes compostos, como transportadores de fármacos, estão em investigação para ministração pelas vias parenteral (intravenosa, transdérmica e subcutânea, principalmente), oral, ocular, intranasal, intravaginal e pulmonar (KAMINSKAS et al., 2012). Algumas pesquisas mostraram que os dendrímeros podem potencializar a permeabilidade intestinal de fármacos, quando estes foram administrados com este sistema de transporte (KAMINSKAS, BOYD, PORTER, 2011; MIGNANI et al., 2013).

De forma geral, a toxicidade dos dendrímeros é determinada pela carga em sua superfície. Pesquisas analisaram o perfil farmacocinético e toxicológico de dendrímeros de PAMAM com superfície catiônica e aniônica. Estas análises apresentaram os resultados para dendrímero de superfícies como segue (WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011; KESHARWANI et al., 2011; KAMINSKAS, BOYD, PORTER, 2011):

Superfície catiônica – apresentou baixa permeabilidade, rápida depuração, baixa concentração plasmática e grande acúmulo no fígado, rim, baço, pulmão e pâncreas. Os dendrímeros catiônicos induziram a perda de integridade da célula, devido à formação de poros. Portanto, estes compostos apresentaram citotoxicidade.

Superfície aniônica – mostrou maior permeabilidade e distribuição sanguínea, menor acúmulo em órgãos, como o fígado. Dendrímeros aniônicos ou neutros foram menos citotóxicos que os catiônicos e, em ambos os casos, a excreção foi via renal.

Para superar a citotoxicidade induzida por estes polímeros, muitas abordagens têm sido desenvolvidas com base na supressão da superfície catiônica por peguilação, acetilação e modificação com moléculas aniônicas, neutras ou ligantes. A peguilação nestes casos reduziu significativamente a citotoxicidade. Além disso, pesquisas demonstraram que a acetilação ou amidação de grupos amina da superfície de dendrímeros de PAMAM promoveu citotoxicidade dez vezes menor, sem perda da permeabilidade em células Caco-2. Estes resultados suportam a relação linear entre a carga de superfície do dendrímero e a citotoxicidade (WIJAGKANALAN, KAWAKAMI, HASHID, 2011).

Outras estratégias para redução da toxicidade dos dendrímeros envolvem o desenvolvimento de compostos menos tóxicos, com foco central biodegradável e unidades de repetição que possam ser convertidas em produtos metabólicos.

Dendrímeros biodegradáveis estão sendo desenvolvidos para diminuir a toxicidade, dentre eles derivados de poliéster, poliéter e triazina. Os dendrímeros de poliésteres têm se destacado devido à biocompatibilidade e degradabilidade *in vitro* e *in vivo* (SVENSON, 2009; MEDINA, EL-SAYED, 2009; JAIN et al., 2010; SEBESTIK, NIEDERHAFNER, JEKER, 2011).

Objetivo e justificativa

"Se a solução no presente é 'a longo prazo', revela a negligência do passado, mas demonstra que se nada for feito, o problema será 'irreversível' no futuro."

Josemar Bosi

2. **OBJETIVO E JUSTIFICATIVA**

Na América Latina, a doença de Chagas está entre as quatro principais endemias, sendo um grande problema de saúde pública (ARGOLO et al., 2008). Esta doença atinge entre 7-8 milhões de pessoas e 25 milhões de indivíduos estão expostos à doença. Nas áreas endêmicas, esta enfermidade provoca perdas sociais importantes, além do grande impacto econômico como: mortalidade, absenteísmo, incapacidade laboral e custos médico-sociais de pacientes crônicos. Entretanto, apenas dois fármacos (nifurtimox e benznidazol) estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, sendo o benznidazol a única opção terapêutica utilizada no Brasil. Além disso, estes compostos apresentam muitos problemas, como: elevada toxicidade e baixa eficácia, principalmente em sua fase crônica. Dentre os principais fatores a serem desenvolvidos destaca-se o planejamento de quimioterápicos eficazes para o tratamento das fases aguda e crônica da doença de Chagas (COURA, 2007; DIAS, 2007; WHO, 2016a).

No Brasil e em outros países do mundo a leishmaniose é um grande problema de saúde pública (SOUZA et al., 2010; AMORA et al., 2009; PAILA, SAHA, CHATTOPADHYAY, 2010). Como mencionado anteriormente, cerca de 350 milhões de pessoas estão expostas e há 12 milhões de pessoas acometidas pela doença (WHO, 2016b). Mesmo com este panorama alarmante, os investimentos para busca de fármacos mais seguros e eficientes para o tratamento desta enfermidade são escassos.

Diante deste cenário, é necessário estender os estudos de desenvolvimento de fármacos para doenças consideradas negligenciadas, como as endemias tropicais, entre elas a doença de Chagas e a leishmaniose, com vistas à descoberta de quimioterápicos mais eficazes que os atualmente disponíveis. Tais doenças, por afetarem populações de países pobres, sem recursos para a aquisição de medicamentos dessa natureza, não despertam interesse por parte do segmento industrial, nacional e multinacional, o que dificulta a descoberta de novos fármacos. Embora o panorama esteja, lentamente, se modificando, ainda há falta de incentivo econômico e compromisso de investimento na pesquisa e desenvolvimento destes agentes terapêuticos (CHUNG et al., 2008). Considerando-se a carência de fármacos

tripanomicidas e leishmanicidas realmente eficazes e seguros para o tratamento destas enfermidades é premente a busca por novas alternativas.

Muitos produtos naturais apresentam interessante propriedade antiparasitária, como a 3-hidroxiflavona. Em estudo desenvolvido por Tasdemir e colaboradores (2006), a 3-hidroxiflavona apresentou atividade tripanomicida *e* leishmanicida *in vitro* comparável a da miltefosina. No entanto, os ensaios *in vivo* em cepas de *Leishmania donovani* mostraram nula atividade inibitória de 3-hidroxiflavona sobre o parasita comparado com a miltefosina, que apresentou inibição de 96,62 ±0,88%. Devido ao contraste dos achados *in vitro* e *in vivo*, os autores indicaram dois pontos importantes com relação à atividade antiparasitária *in vivo* deste agente bioativo: a rápida biotransformação que esse composto pode sofrer na hidroxila disponível na estrutura do flavonóide, o que acarreta na eliminação precoce da 3-hidroxiflavona, e também, a dificuldade de absorção deste agente bioativo, que compromete a biodisponibilidade. Tais fatos evidenciam a necessidade de planejamento de transportadores capazes de melhorar as propriedades farmacocinéticas e, consequentemente, antiparasitárias *in vivo* deste composto promissor. Neste contexto, a latenciação pode ser empregada com o objetivo de melhorar as características indesejáveis deste flavonóide, como a baixa biodisponibilidade e, também, reduzir a eliminação através de sistemas de liberação controlada do agente bioativo (CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005; CHOI-SLEDESKI, WERMUTH, 2015).

Os dendrímeros são macromoléculas que têm atraído grande destaque na área de nanotecnologia e no transporte de compostos bioativos, devido à versatilidade e a capacidade inovadora desses derivados nanoscópicos (YANG, KAO, 2006; JAIN et al., 2010; MEDINA, EL-SAYED, 2009; LIU, FRÉCHET, 1999; D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005; ASTRUC, BOISSELIER, ORNELAS, 2010). Este fato incentiva o desenvolvimento de novas estruturas dendríticas. Neste contexto, o foco central e os *dendrons* são regiões de suma importância, pois permitem o crescimento da malha dendrimérica. Estas regiões do dendrímero devem ser polifuncionais, para permitir o aumento do número de ramificações da estrutura dendrítica.

Face ao exposto e considerando-se o pedido de patente (FERREIRA, GIAROLLA, 2009), no qual o fármaco/composto bioativo faz parte da construção das

ramificações, através de etapas seguidas de esterificação, o presente trabalho teve como objetivo geral sintetizar pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona, que poderiam aprimorar as propriedades farmacocinéticas deste agente bioativo, como por exemplo, através do sistema de liberação controlada reduzir a eliminação deste agente promissor.

Os objetivos específicos foram:

1. Sintetizar transportadores dendriméricos inovadores constituídos por:

- dois agentes espaçantes, que formarão os *dendrons.* As ramificações foram planejadas com ácido L(-)-málico e ácido L-glutâmico. Tais espaçantes contêm grupos que permitem reação com o foco central e com o composto ativo e, também, o crescimento de novas gerações do dendrímero (Figura 20). O ácido glutâmico é um aminoácido não essencial, que participa da dieta e de processos bioquímicos do organismo humano, e o ácido L(-)-málico é, também, constituinte da dieta (MANTELL, 2007). Desta forma, estes compostos poderiam conferir biocompatibilidade celular aos dendrímeros propostos neste trabalho;
- diferentes núcleos polifuncionais, alguns já citados na literatura para síntese de dendrímeros como propanodiamina e butanodiamina (BERG, 1993; HELMS, MEIJER, 2006), hexanodiamina e melamina (LIM, SIMANEK, 2012). Além dos focos centrais amínicos, tentou-se, também, a síntese de dendrímeros contendo o monopentaeritritol e etilenoglicol, como núcleo (Figura 21) pelos métodos divergente e convergente, respectivamente;

2. Sintetizar pró-fármacos utilizando os dendrímeros mencionados e 3-hidroxiflavona como composto bioativo modelo.

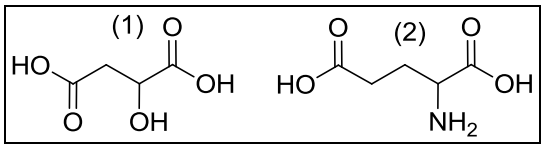


Figura 20: Agentes espaçantes (1) ácido L(-)-málico e (2) ácido L-glutâmico.

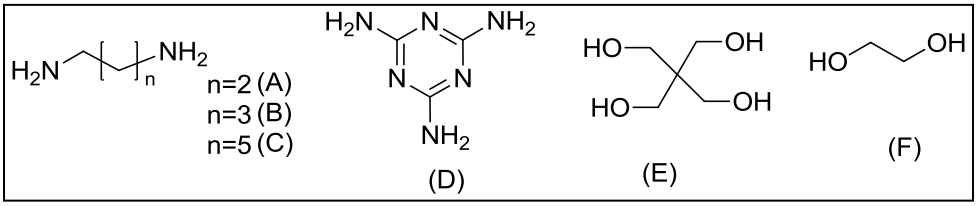


Figura 21: Focos centrais utilizados no trabalho, estrutura (A) propanodiamina, (B) butanodiamina, (C) hexanodiamina, (D) melamina, (E) monopentaeritritol e (F) etilenoglicol.

Desta forma, pretendeu-se sintetizar os seguintes pró-fármacos dendriméricos:

(A) derivados de 3-hidroxiflavona com propanodiamina, butanodiamina ou hexanodiamina, como focos centrais e com ácido L(-)-málico ou ácido L-glutâmico, como agentes espaçantes (Figura 22);

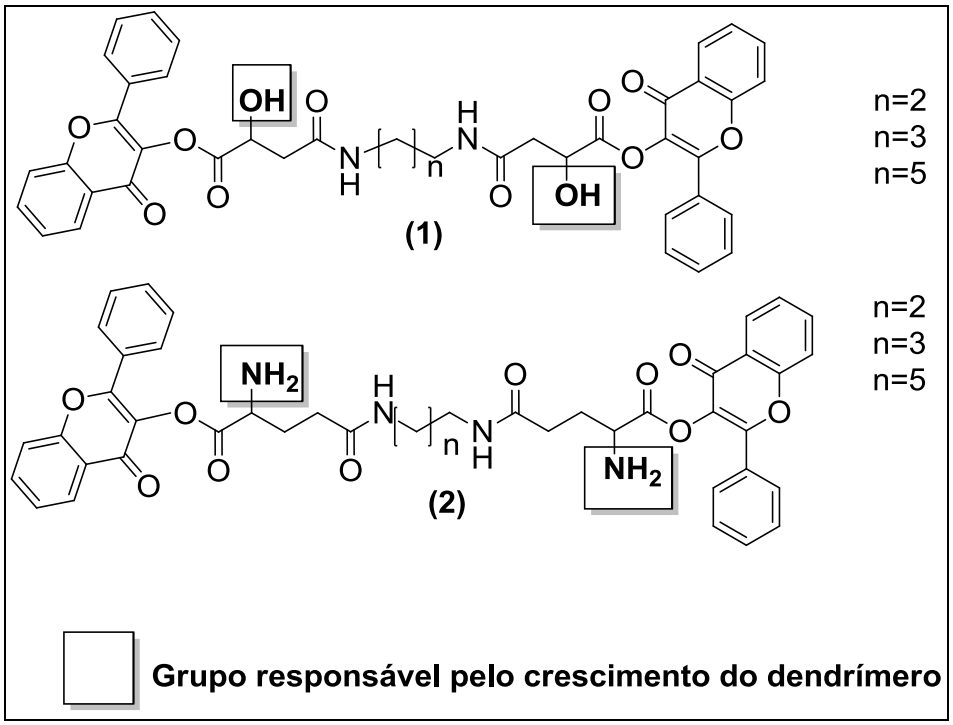


Figura 22: Estrutura final dos pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona, contendo propano-, butano- e hexano-diamina, como focos centrais. Os *dendrons* nos modelos (1) foram planejados com ácido L(-)-málico e, para os modelos (2) as ramificações foram construídas com ácido L-glutâmico.

B) derivados de 3-hidroxiflavona com 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina ou melamina, como núcleo e os *dendrons* constituídos por ácido L(-)-málico ou ácido L-glutâmico (Figura 23);

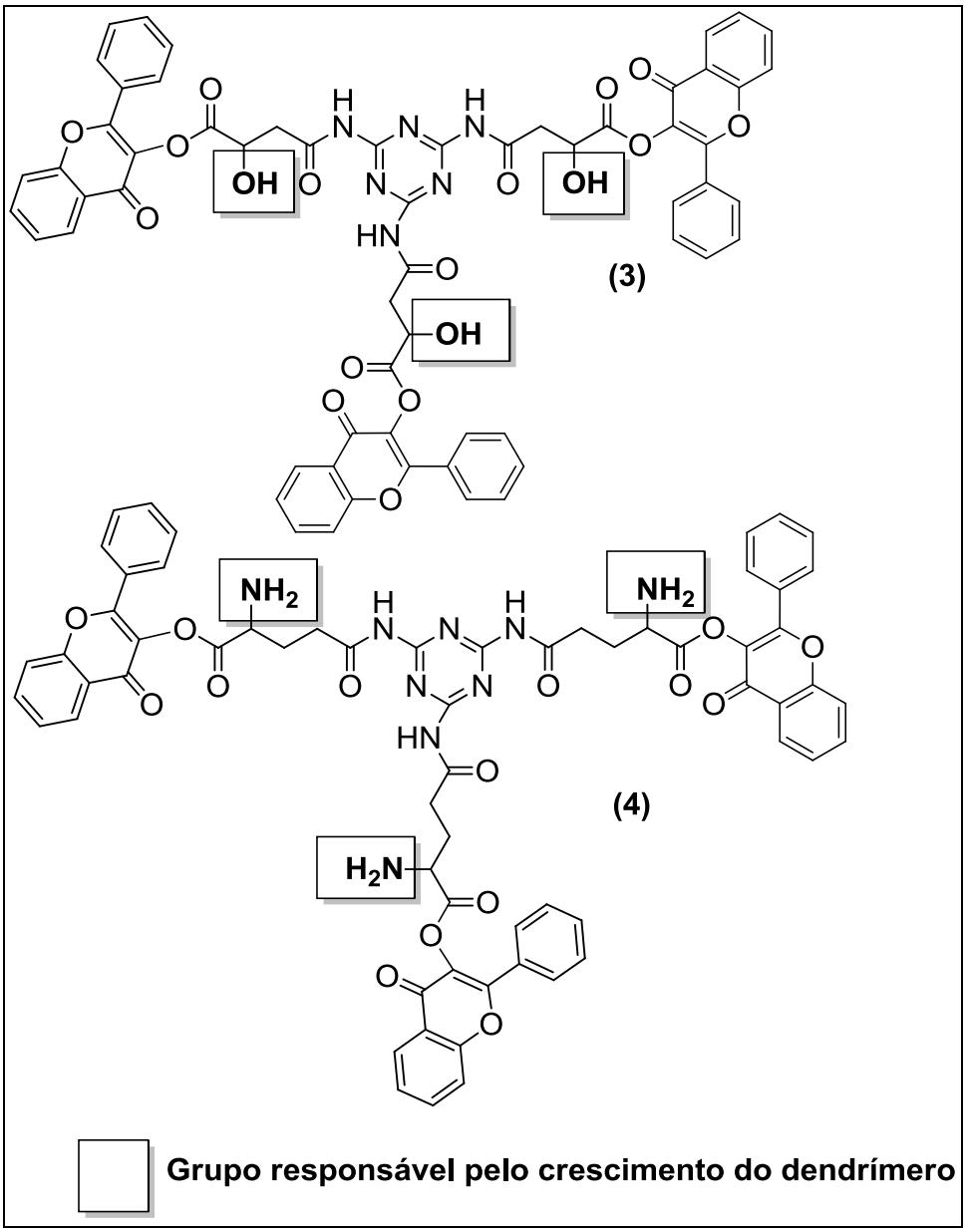


Figura 23: Estrutura final dos pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona, contendo 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina, como núcleo. Os *dendrons* nos modelos (3) foram planejados com ácido L(-)-málico e, para os modelos (4) as ramificações são constituídas com ácido L-glutâmico.

(C) Esses dendrímeros não constavam no projeto original, mas tentou-se a síntese de derivados de 3-hidroxiflavona com etilenoglicol ou monopentaeritritol, como focos centrais e com ácido L(-)-málico, como agente espaçante (Figura 24);

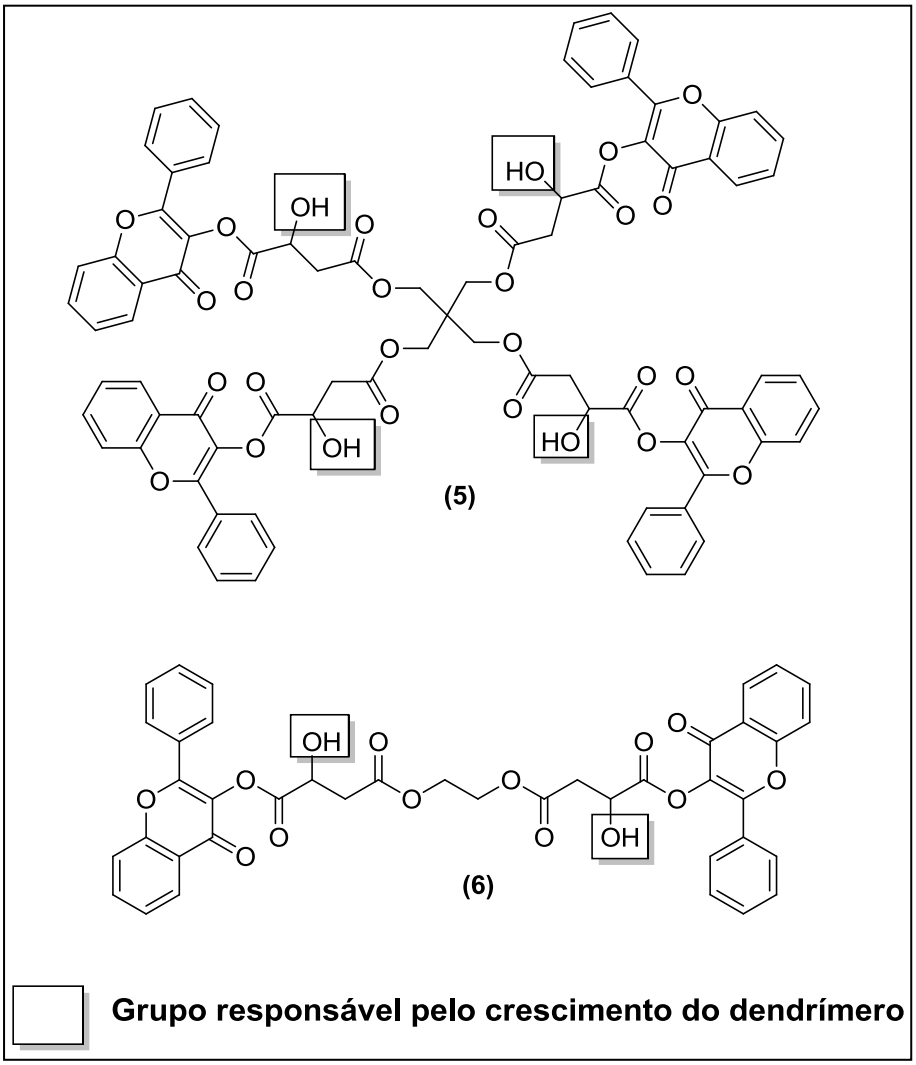


Figura 24: Estrutura final dos pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona, contendo monopentaeritritol (5) e etilenoglicol (6), como núcleos. As ramificações foram planejadas com ácido L(-)-málico.

No organismo, os pró-fármacos podem ser ativados, obtendo-se liberação controlada, redução da toxicidade, aumento da eficácia, bem como o aprimoramento das características físico-químicas da 3-hidroxiflavona.

Material e métodos

"Uma experiência nunca é um fracasso, pois sempre vem demonstrar algo."

Thomas Edison

3. **MATERIAL E MÉTODOS**

3.1 MATERIAL

3.1.1 **Reagentes e solventes**

⇒ 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC);

⇒ 2,2-dimetoxipropano (DMP);

⇒ 3-hidroxiflavona;

⇒ 4-dimetilaminopiridina (DMAP);

⇒ acetato de etila;

⇒ acetona;

⇒ acetonitrila (ACN);

⇒ acetonitrila grau HPLC;

⇒ ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico (*Bis*MBA);

⇒ ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico (*Bis*MPA);

⇒ ácido clorídrico;

⇒ ácido L-glutâmico;

⇒ ácido L(-)-málico;

⇒ ácido propanóico;

⇒ ácido *p*-toluenossulfônico;

⇒ ácido trifluoracético;

⇒ ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico;

⇒ anidrido succínico;

⇒ bicarbonato de sódio;

⇒ bissulfato de sódio;

⇒ brometo de potássio;

⇒ butanodiamina (BTDA);

⇒ celite;

⇒ cloreto de oxalila;

⇒ cloreto de sódio;

⇒ cloreto de tionila;

⇒ cloroformato de etila;

⇒ clorofórmio;

⇒ diciclohexilcarbodiimida (DCC);

⇒ diclorometano (DCM);

⇒ dimetilacetal benzaldeído;

⇒ dimetilformamida (DMF);

⇒ dimetilsulfóxido (DMSO);

⇒ etanol;

⇒ éter etílico;

⇒ etilenodiamina (ETDA);

⇒ etilenoglicol (ETG);

⇒ galvinoxil radical livre;

⇒ grafite;

⇒ hexano;

⇒ hexanodiamina (HXDA);

⇒ hidróxido de sódio;

⇒ isoniazida;

⇒ melamina ou 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina;

⇒ metanol;

⇒ metronidazol;

⇒ monopentaeritritol;

⇒ *N*',*N*-carbonildiimidazol (CDI);

⇒ *N*',*N*-diisopropilcarbodiimida (DCI);

⇒ *N*-metilmorfolina (NMO);

⇒ Pd/C;

⇒ piridina;

⇒ propanodiamina (PDA);

⇒ sulfato de sódio anidro;

⇒ tetracloreto de carbono;

⇒ tetraidrofurano (THF);

⇒ trietilamina (TEA);

⇒ trifluoracetato de potássio;

⇒ trifluoracetato de sódio.

3.1.2 **Equipamentos**

⇒ banho ultrassom Quimis;

⇒ cromatógrafo automático Isolera Prime, Biotage;

⇒ cromatógrafo para CLAE semi-preparativo Shimadzu;

⇒ espectrofotômetro FTIR IRAffinity-1 Shimadzu;

⇒ espectrofotômetro Thermo Nicolet Avatar Nexus 670 FTIR IRAffinity-1 Shimadzu;

⇒ espectrômetro de massas MALDI-ToF Bruker Autoflex III;

⇒ espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker 300 MHz, modelo *Advanced* DPX-300;

⇒ espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Varian 400 MHz, modelo Unity Inova 400;

⇒ liofilizador Christ, modelo ALPHA 1-2;

⇒ rotaevaporador Büchi.

3.2 MÉTODOS

A Figura 25 apresenta o Esquema geral de síntese.

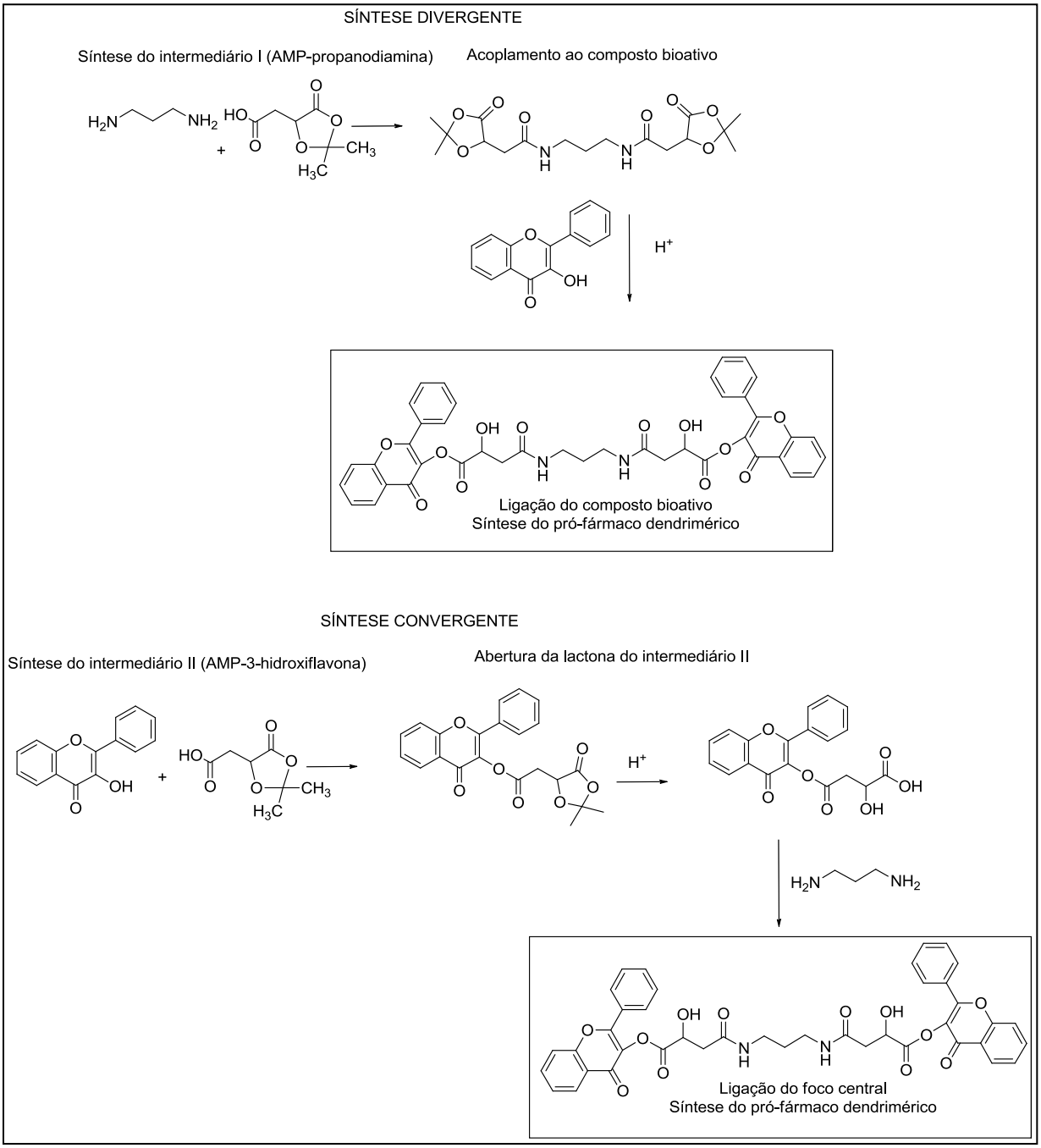


Figura 25: Esquema para síntese divergente e convergente do pró-fármaco dendrimérico de 3-hidroxiflavona, contendo propanodiamina (foco central) e ácido L-málico (*dendron*), por exemplo. A síntese dos demais dendrímeros (com diferentes focos centrais e, também, com ácido glutâmico) segue esquema análogo.

3.2.1 **Síntese**

O trabalho contou com a colaboração dos doutores Caroline da Costa Silva Gonçalves, Jeanine Giarolla Vargas, Fabrício Vargas, Márcio Henrique Zaim e Marco Aurélio Graça Arribas e, também, com a colaboração dos alunos de iniciação científica Ana Luisa Cadore, Heloisa Fernanda Augusto, Renan Augusto Gomes, Esther Letícia Amorim Ribeiro, Renan Sousa Silva e Stefani Fernanda Silva Figueiredo e do aluno de pós-graduação João Vítor da Silva. Parte do trabalho foi realizada no laboratório do Professor Dr. Scott M. Grayson, na Tulane University, em New Orleans – Estados Unidos, durante o meu estágio sanduíche no período de janeiro a julho de 2015. Nos Estados Unidos, o trabalho contou com a colaboração do aluno de graduação em Química Jorge Luiz Alves.

3.2.1.1 Síntese dos espaçantes protegidos (ácido málico e ácido glutâmico protegidos) (GREEN, KIDDLE, THOMPSON, 1995; GIAROLLA, 2007, 2012).

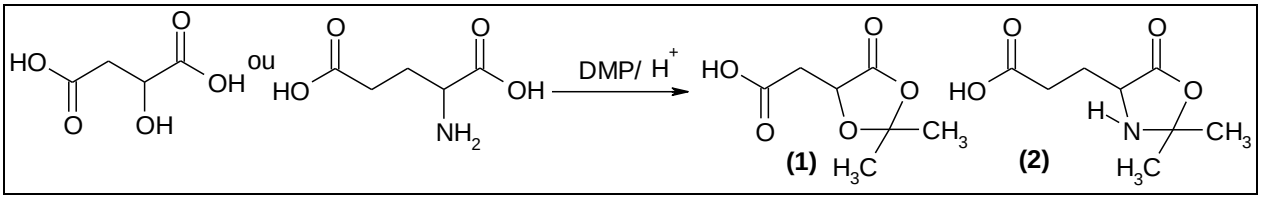


Figura 26: Síntese do espaçante protegido, (1) ácido málico protegido (AMP) ou (2) ácido glutâmico protegido (AGP).

Sob agitação e à temperatura ambiente, mantiveram-se o agente espaçante (ácido L(-)-málico ou ácido L-glutâmico), ácido *p*-toluenossulfônico e 2,2-dimetoxipropano nas concentrações de 7,5 mmol, 0,158 mmol, 20,33 mmol, respectivamente. Após 30 minutos à temperatura ambiente, o material foi separado em duas fases com água e diclorometano. Extraíram-se mais duas vezes a fase aquosa com diclorometano. As fases orgânicas foram reunidas e secadas sob sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 40 ºC, e o composto isolado foi recristalizado de clorofórmio/tetracloreto de carbono 1:1 (v/v.), obtendo-se o agente espaçante protegido de interesse (Figura 26).

3.2.1.2 Síntese dos pró-fármacos dendriméricos – método divergente

3.2.1.2.1 *Síntese do anidrido do AMP (adaptado de IHRE et al., 2001).*

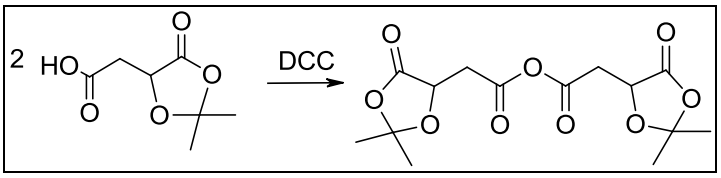


Figura 27: Síntese do anidrido do AMP.

AMP (5,74 mmol) foi dissolvido em 7 mL de diclorometano e a esta solução adicionou-se DCC (57 mmol) dissolvido em 3 mL de diclorometano. A reação foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente por 26 horas (Figura 27). Ao término, a mistura reacional foi filtrada sob pressão reduzida para remoção dos subprodutos. Posteriormente, o filtrado foi gotejado em hexano gelado na proporção 1:9 (diclorometano/hexano) sob agitação vigorosa. A suspensão obtida foi armazenada sob refrigeração e filtrada sob pressão reduzida no dia seguinte, coletando-se pó branco amorfo.

3.2.1.2.2 *Síntese dos intermediários I (IA e IE), partindo do anidrido do AMP (foco central e AMP)*

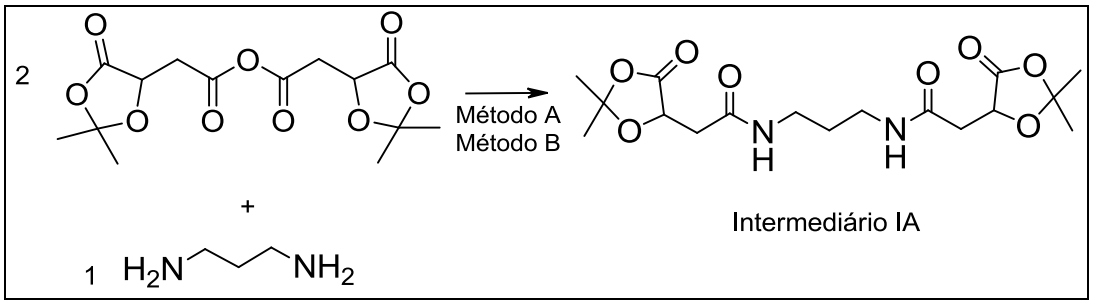


Figura 28: Síntese do intermediário IA (propanodiamina e agente espaçante protegido), a partir do anidrido do AMP.

⇒ *Método A – foco central propanodiamina* (adaptado de IHRE et al., 2001)

Sob atmosfera de N_2, dissolveram-se PDA e DMAP em solvente adequado, conforme as descrições da Tabela I. Em seguida, adicionou-se o anidrido do AMP. A

reação foi mantida sob agitação e atmosfera inerte *overnight* (Figura 28). No dia seguinte, adicionou-se água desionizada para promover a hidrólise do anidrido que não reagiu e, novamente, manteve-se a reação sob agitação e atmosfera de N_2. No terceiro dia de reação, o produto foi extraído/purificado, conforme descrito na Tabela I. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 40 ºC (Figura 28). Em seguida, o sólido foi redissolvido em diclorometano e gotejou-se este líquido, sob agitação vigorosa, em hexano gelado na proporção 1:9 (diclorometano/hexano) para precipitação. A suspensão foi armazenada sob refrigeração. No dia seguinte, o pó foi filtrado.

Tabela I – Condições reacionais, de isolamento e purificação realizados no método A (experimentos A1, A2 e A3)

Experimento	Reagentes / solvente	mmol ou volume (mL)	Condições de isolamento e purificação
A1	- anidrido AMP	1,20	Solvente: éter etílico 10 mL
	- PDA	0,48	
	- DMAP	0,05	Condição de extração:
	- piridina	3,00	Água – 15 mL – 3 vezes
	- DCM	8,00	$NaHSO_4$ 1 M - 15 mL – 3 vezes
	- H_2O desionizada	10,00	$NaHCO_3$ 10% - 15 mL – 3 vezes
A2	- anidrido AMP	5,95	Solvente: DCM 100 mL
	- PDA	2,38	
	- DMAP	0,02	Condição de extração:
	- piridina	6,60	Água – 60 mL – 3 vezes
	- DCM	20,00	$NaHSO_4$ 1 M - 60 mL – 3 vezes
	- H_2O desionizada	6,60	$NaHCO_3$ 10% - 60 mL – 3 vezes
			NaCl* - 60 mL – 1 vez
A3	- anidrido AMP	6,06	Solvente: DCM 40 mL
	- PDA	2,02	
	- DMAP	0,02	Condição de extração:
	- DCM	33,00	$NaHSO_4$ 1 M - 40 mL – 2 vezes
	- H_2O desionizada	5,00	$NaHCO_3$ 10% - 40 mL – 2 vezes

* Solução saturada, AMP = ácido málico protegido, DCM = diclorometano, DMAP = 4-dimetilaminopiridina, PDA = propanodiamina.

⇒ *Método B – foco central propanodiamina* (adaptado de HUANG et al., 1997; JOHN, YOUN, 1954)

Mantiveram-se sob agitação, atmosfera de N_2 e a 60 °C, solução de anidrido do AMP (2,27 mmol) em 2,5 mL de THF anidro e, posteriormente, adicionou-se propanodiamina (1 mmol). Após 2 e 4 horas de reação, adicionou-se mais 1,23 mmol de anidrido. A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 18 h. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, rediluído em 10 mL de acetato de etila e extraído, subsequentemente, com 10 mL de HCl 1 M, solução saturada de $NaHCO_3$ e solução saturada de cloreto de sódio 2 vezes cada extração. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente removido sob pressão reduzida, novamente.

⇒ *Método C – foco central monopentaeritritol* (adaptado de IHRE et al., 2001)

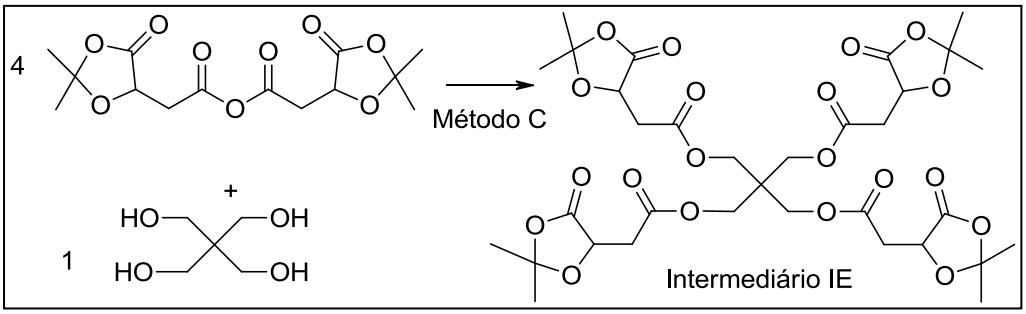


Figura 29: Síntese do intermediário IE (monopentaeritritol e AMP).

Sob atmosfera inerte, dissolveu-se o monopentaeritritol (0,756 mmol) em 10 mL de piridina. Posteriormente, adicionou-se DMAP (0,112 mmol), anidrido do AMP (3,78 mmol) e diclorometano (13 mL). A reação foi mantida nessas condições *overnight* (Figura 29). No dia seguinte, adicionaram-se 10 mL de água desionizada. O conteúdo reacional foi mantido sob agitação e atmosfera de N_2. Ao término da reação, acrescentaram-se 50 mL de acetato de etila e extraiu-se com 50 mL de água desionizada por seis vezes. Em seguida, a fase orgânica foi lavada, subsequentemente, três vezes com solução de bissulfato de sódio 1 M e três vezes com solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 40 °C (Figura 29). Para precipitação, o

sólido foi redissolvido em acetona, utilizando-se o ultrassom. Este líquido foi gotejado sob agitação vigorosa em hexano gelado na proporção 1:9. Armazenou-se esta suspensão sob refrigeração. No dia seguinte, a suspensão foi filtrada e lavada com acetona gelada.

3.2.1.2.3 *Síntese do intermediário I, partindo do ácido málico protegido (foco central e AMP) – métodos D, E, F, G e H*

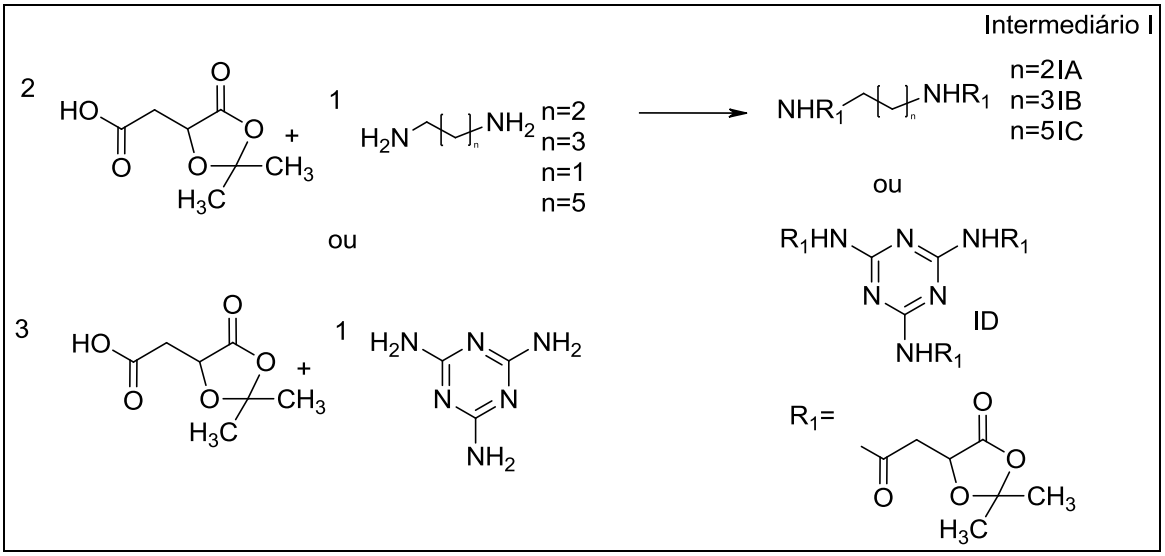


Figura 30: Síntese do intermediário IA, IB, IC e ID (foco central e AMP).

⇒ *Método D – método do anidrido misto* (adaptado de VARGAS, 2007)

Em banho de gelo, mantiveram-se *N*-metilmorfolina (6,8 mmol) e ácido málico protegido (5,75 mmol) em 40 mL de diclorometano. Agitou-se por 15 minutos, adicionando-se, então, cloroformato de etila (6,8 mmol) em solução com 7 mL de diclorometano. Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se propanodiamina (2,87 mmol). A reação foi mantida sob agitação e banho de gelo por mais uma hora. Após este período, manteve-se o meio reacional sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Ao final, o conteúdo reacional foi diluído em 50 mL de diclorometano e lavou-se, subsequentemente, com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (duas vezes com 28 mL), solução saturada de cloreto de sódio (28 mL), solução aquosa de ácido clorídrico 1 M (duas vezes com 28 mL) e, finalmente, com

solução saturada de cloreto de sódio (28 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 40 °C (Figura 30).

A reação foi acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), com fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v).

⇒ *Método E – cloreto de acila para amidação* (adaptado de HOSANGADI, DAVE, 1996)

Em banho de gelo e sob atmosfera inerte, mantiveram-se, sob agitação, o ácido málico protegido e cloreto de acila ou de sulfonila em solvente anidro apropriado, por 30 minutos (Tabela II). Aos métodos E3 e E5 neste período de ativação, adicionou-se, também, TEA (Tabela II). Após a ativação, juntaram-se o foco central e os demais reagentes (de acordo com o experimento). O meio reacional foi mantido à temperatura ambiente e sob agitação, conforme as condições reacionais descritas na Tabela II. Ao término da reação, o produto foi extraído e purificado de acordo com as condições de extração da Tabela II. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 40 ºC (Figura 30). A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v).

Tabela II – Condições reacionais, de isolamento e purificação no método E (experimentos E1, E2, E3, E4, E5 e E6)

Experimento	Reagentes / solvente	mmol ou volume (mL)	Tempo de reação (h)	Isolamento e purificação
E1	- AMP	5,75	23	Solvente: DCM 70 mL
	- $SOCl_2$	5,75		
	- PDA	2,87		Condição de extração:
	- TEA	5		NaCl* – 50 mL – 3 vezes
	- DCM	30		
E2	- AMP	11,5	23	Solvente: DCM 70 mL
	- $SOCl_2$	11,5		Condição de extração:
	- PDA	23		$NaHCO_3$* - 100 mL – 2 vezes
	- DCM	30		Água - 100 mL – 2 vezes

* Solução saturada, ACN = acetonitrila, AMP = ácido málico protegido, DCM = diclorometano, PDA = propanodiamina, TEA = trietilamina, THF = tetraidrofurano.

Tabela II – Condições reacionais, de isolamento e purificação realizados no método E (experimentos E1, E2, E3, E4, E5 e E6) (cont.)

Experimento	Reagentes / solvente	mmol ou volume (mL)	Tempo de reação (h)	Isolamento e purificação
E3	- AMP	11,50	6	Solvente: DCM 50 mL
	- $SOCl_2$	11,50		
	- PDA	23,00		Condição de extração:
	- DCM	50		$NaHCO_3$* - 100 mL – 2 vezes
				Água - 100 mL – 2 vezes
E4	- AMP	22,00	22	Solvente: acetato de etila
	- $SOCl_2$	22,00		30 mL
	- PDA	5,50		Condição de extração:
	- TEA	44,00		$NaHCO_3$* - 100 mL – 2 vezes –
	- THF	20		Porção aquosa pH 8,00
E5	- AMP	2,87	23	Solvente: DCM 10 mL
	- cloreto de oxalila	2,87		Condição de extração:
	- PDA	1,43		$NaHCO_3$* - 10 mL – 2 vezes
	- TEA	2,87		Água - 10 mL – 2 vezes
	- ACN	2		NaCl* - 10 mL – 2 vezes
E6	- AMP	6,32	7	Solvente: DCM 20 mL
	- cloreto de oxalila	6,32		Condição de extração:
	- PDA	3,16		$NaHCO_3$* - 30 mL – 2 vezes
	- piridina	12,63		HCl 1 M - 30 mL – 2 vezes
	- DCM	20		Água – 30 mL – 2 vezes
				NaCl* - 30 mL – 2 vezes
				Coluna cromatográfica – hexano/acetato de etila – gradiente de concentração

* Solução saturada, ACN = acetonitrila, AMP = ácido málico protegido, DCM = diclorometano, PDA = propanodiamina, TEA = trietilamina, THF = tetraidrofurano.

⇒ *Métodos F, G e H – Experimentos com agentes condensantes*

Mantiveram-se sob agitação em banho de gelo, solvente adequado, ácido málico protegido, agente condensante e a base aceptora de prótons para ativação conforme condições descritas na Tabela III. Ao meio reacional, adicionou-se gota a gota o foco

central e os demais reagentes (de acordo com o método). A mistura reacional foi mantida sob agitação, de acordo com o tempo reacional discriminado na Tabela III. Ao término da reação, o produto foi filtrado e/ou extraído de acordo com as descrições da Tabela III. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 40 ºC (Figura 30). A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel hexano/acetato de etila 1:1.

Tabela III – Condições reacionais, de isolamento e purificação realizados nos métodos F, G e H

Método	Reagentes / solvente	mmol ou volume (mL)	Tempo de reação (h)	Isolamento e purificação (Filtração e extração)	Referência
F	- AMP - CDI - PDA - DMAP -DCM anidro	5,75 5,75 5,75 0,57 30	29 (Em atmosfera inerte)	Adição de solvente: DCM 50 mL Condição de extração: $NaHCO_3$* - 50 mL – 1 vez Água - 50 mL – 1 vez NaCl* - 50 mL – 1 vez	Adaptado de ABOUSSAFY et al., 2010.
G	- AMP - DCI - PDA - DMAP - DCM	5,75 5,75 5,75 0,57 20	22	Filtração do conteúdo reacional Adição de solvente: DCM 50 mL Condição de extração: Água - 50 mL – 3 vezes	Adaptado de BERTHELOT et al., 2006.
H	- AMP - EDC - PDA - DMAP - DCM	5,58 22,98 2,23 0,56 33,00	26	Solvente: acetato de etila 50 mL Condição de extração: HCl 1 M – 50 mL – 2 vezes NaCl* - 50 mL – 1 vez $NaHCO_3$* - 50 mL – 2 vezes NaCl* - 50 mL – 1 vez Coluna cromatográfica – hexano/acetato de etila – gradiente de concentração	Adaptado de HORVATH, DEPRÉ, ORMEROD, 2011.

* Solução saturada, AMP = ácido málico protegido, CDI = *N',N*-carbonildiimidazol, DCI = *N',N*-diisopropilcardiimida, DCM = diclorometano, DMAP = 4-dimetilaminopiridina, EDC = 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, PDA = propanodiamina.

⇒ *Método utilizando DCC como agente condensante e diferentes focos centrais*

Mantiveram-se em banho de gelo, sob agitação e atmosfera inerte, AMP, DCC, DMAP e diclorometano, conforme descrito na Tabela IV. Ao meio reacional, adicionou-se gota a gota o foco central. A reação foi mantida em temperatura ambiente sob atmosfera de N_2 por 24 horas. Após este período, o conteúdo reacional foi purificado de acordo com as descrições da Tabela IV. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e esta foi filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 40 ºC (Figura 30). Posteriormente, redissolveu-se o conteúdo em diclorometano e gotejou-se este líquido em hexano gelado, proporção 1:9 (diclorometano/hexano). A suspensão foi armazenada sob refrigeração. No dia seguinte, o conteúdo foi filtrado sob pressão reduzida.

Tabela IV – Condições reacionais, de isolamento e purificação realizados nos métodos I, J, L e M

Método	Reagentes / solvente	mmol ou volume (mL)	Isolamento e purificação (Filtração e extração)	Referência
I	- AMP	5,60	Filtração do conteúdo reacional	Adaptado de DELONG et al., 2007.
	- DCC	5,60	Condição de extração:	
	- PDA	2,00	HCl 1 M - 20 mL – 2 vezes	
	- DMAP	0,40	$NaHCO_3$* - 10 mL – 2 vezes	
	- DCM	21,00	NaCl* - 10 mL – 2 vezes	
J	- AMP	6,00	Filtração do conteúdo reacional	Adaptado de DELONG et al., 2007.
	- DCC	6,00	Condição de extração:	
	- Melamina	1,50	Água – 20 mL – 3 vezes	
	- DMAP	0,60	HCl 1 M – 20 mL – 2 vezes	
	- DMSO (quente)	5,00	$NaHCO_3$* - 20 mL – 2 vezes	
	- DCM	25,00	NaCl* - 20 mL – 2 vezes	

* Solução saturada, AMP = ácido málico protegido, DCC = dicicloexilcarbodiimida, DCM = diclorometano, DMAP = 4-dimetilaminopiridina, DMSO = dimetilsulfóxido, PDA = propanodiamina.

Tabela IV – Condições reacionais, de isolamento e purificação realizados nos métodos I, J, L e M (cont.)

Método	Reagentes / solvente	mmol ou volume (mL)	Isolamento e purificação (Filtração e extração)	Referência
L	- AMP	12,90	Filtração do conteúdo reacional	Adaptado de DELONG et al., 2007.
	- DCC	10,70	Condição de extração:	
	- BTDA	6,00	HCl 1 M – 20 mL – 2 vezes	
	- DMAP	0,40	$NaHCO_3$* - 20 mL – 2 vezes	
	- DCM	5,00	NaCl* - 20 mL – 2 vezes	
M	- AMP	12,90	Filtração do conteúdo reacional	Adaptado de DELONG et al., 2007.
	- DCC	10,70	Condição de extração:	
	- HXDA	6,00	HCl 1 M – 20 mL – 2 vezes	
	- DMAP	0,40	$NaHCO_3$* - 20 mL – 2 vezes	
	- DCM	5,00	NaCl* - 20 mL – 2 vezes	

* Solução saturada, AMP = ácido málico protegido, BTDA = butanodiamina, DCC = dicicloexilcarbodiimida, DCM = diclorometano, DMAP = 4-dimetilaminopiridina, DMSO = dimetilsulfóxido, HXDA = hexanodiamina, PDA = propanodiamina.

3.2.1.2.4 *Síntese do pró-fármaco dendrimérico contendo isoniazida como MODELO, a partir do intermediário I por aminólise da lactona* (adaptado de DECKER, NGUYEN, LEHMANN, 2004; FOLEY, JAMISON, 2010).

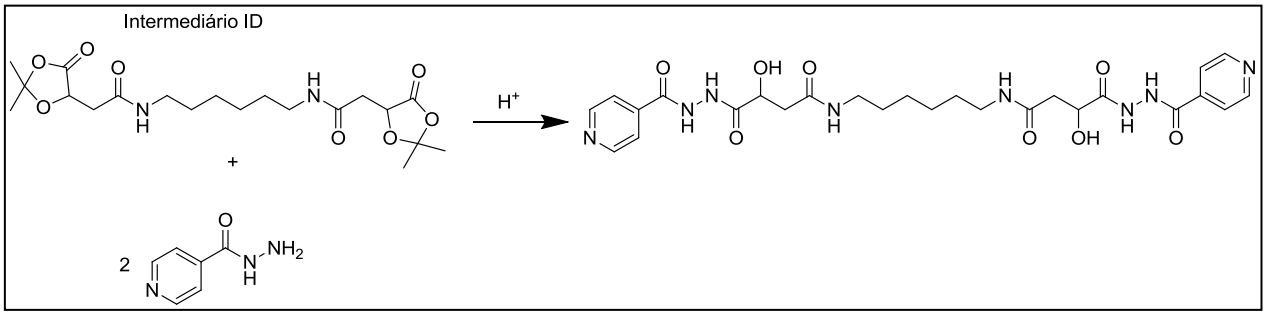


Figura 31: Síntese do pró-fármaco dendrimérico contendo isoniazida por aminólise da lactona.

Manteve-se em acetato de etila, sob agitação e a 70 °C o intermediário IC (2,3 mmol). Posteriormente, adicionaram-se isoniazida (9,2 mmol) e o ácido propanoico (1 eq) (Figura 31). A mistura reacional foi mantida sob essas condições durante 24 horas. Ao término da reação, o conteúdo reacional foi extraído três vezes com solução

saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio e o solvente removido sob pressão reduzida a 40 °C. Tentou-se a purificação em coluna cromatográfica com eluente acetato de etila e metanol, em gradiente de concentração.

3.2.1.3 Síntese dos pró-fármacos dendriméricos – método convergente

3.2.1.3.1 *Síntese do intermediário II (3-hidroxiflavona e ácido málico protegido)* (adaptado de VARGAS, 2007).

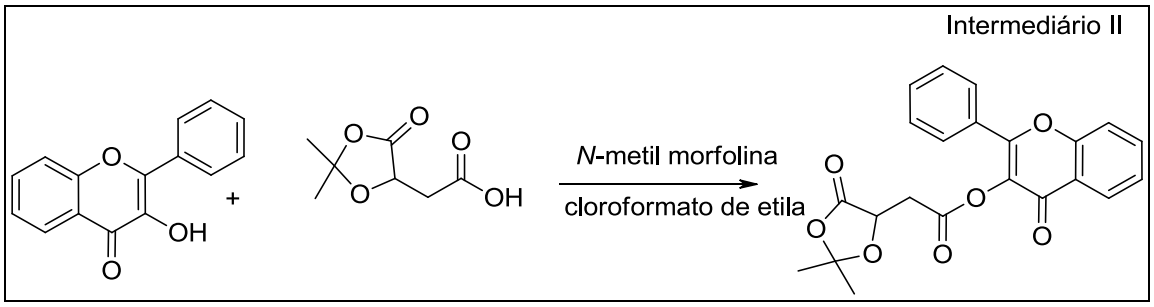


Figura 32: Síntese do intermediário II.

Em banho de gelo, mantiveram-se sob agitação em 110 mL de clorofórmio *N*-metilmorfolina (5,75 mmol) e ácido málico protegido (5,75 mmol) por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se cloroformato de etila (5,75 mmol). Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se a 3-hidroxiflavona (5,75 mmol). A reação foi mantida em banho de gelo por mais 1 hora. Após este período, manteve-se o meio reacional sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, lavou-se o conteúdo reacional, subsequentemente, com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (duas vezes com 40 mL), solução saturada de cloreto de sódio (40 mL), solução aquosa de ácido clorídrico 1 M (duas vezes com 40 mL) e, novamente, com solução saturada de cloreto de sódio (40 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 40 ºC (Figura 32).

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, com fase móvel hexano/acetato de etila 2:1 (v/v).

O produto final foi purificado em coluna cromatográfica, com eluente hexano/acetato de etila em gradiente de concentração, obtendo-se o intermediário II.

3.2.1.3.2 *Desproteção do intermediário II, obtenção do intermediário III* (adaptado de MANTELL, 2007).

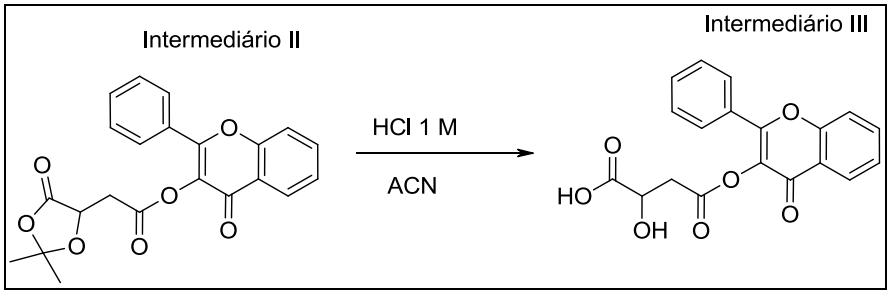


Figura 33: Hidrólise do intermediário II, obtenção do intermediário III.

O intermediário II (1 mmol) foi dissolvido em acetonitrila, e posteriormente, adicionou-se o ácido clorídrico 1 M na proporção de 1:1 (5,33:5,33 mL). O meio reacional foi mantido sob agitação de acordo com as condições descritas na Tabela V. Após este período, o conteúdo reacional foi tratado de acordo com a Tabela V. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o produto concentrado sob pressão reduzida a 40 ºC (Figura 33). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, com fase móvel hexano/acetato de etila 2:1 (v/v).

Tabela V – Tempo reacional e condições de isolamento e purificação para os experimentos N1, N2A, N2B e N3

Experimento	Tempo de reação (h)	Isolamento e purificação
N1	21	Solvente: acetato de etila 20 mL Condição de extração: Água – 20 mL – 6 vezes
N2A	9	Solvente: acetato de etila 20 mL Condição de extração: Água – 20 mL – 6 vezes
N2B	9	Lavagem exaustiva com etanol (500 mL)
N3	6	Solvente: acetato de etila 20 mL Condição de extração: Água – 20 mL – 6 vezes

3.2.1.3.3 *Ligação do intermediário III ao foco central etilenodiamina* (adaptado de IHRE et al., 2001).

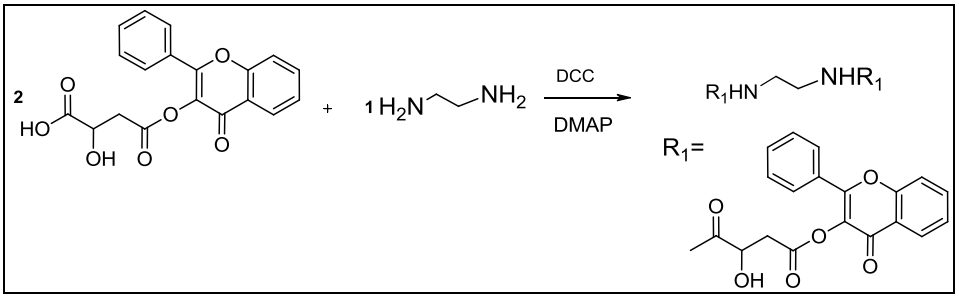


Figura 34: Síntese do pró-fármaco dendrimérico de 3-hidroxiflavona, com etilenodiamina, como foco central.

Mantiveram-se sob agitação em 5 mL de THF, o intermediário III (0,42 mmol), DCC (0,42 mmol), DMAP (0,04 mmol). Após 30 minutos, adicionou-se etilenodiamina (0,21 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação, em temperatura ambiente por 22 horas. Ao término da reação, filtrou-se o conteúdo reacional e, ao filtrado, adicionaram-se 10 mL de diclorometano e lavou-se, subsequentemente, com solução saturada de bicarbonato de sódio (duas vezes de 20 mL) e com solução saturada de cloreto de sódio (duas vezes de 20 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 40 ºC (Figura 34). Acompanhou-se a reação por CCD, em fase móvel hexano/acetato de etila 2:1 (v/v).

3.2.1.3.4 *Ligação do intermediário III ao foco central etilenoglicol* (DEPRE, HORVATH, ORMEROD, 2008).

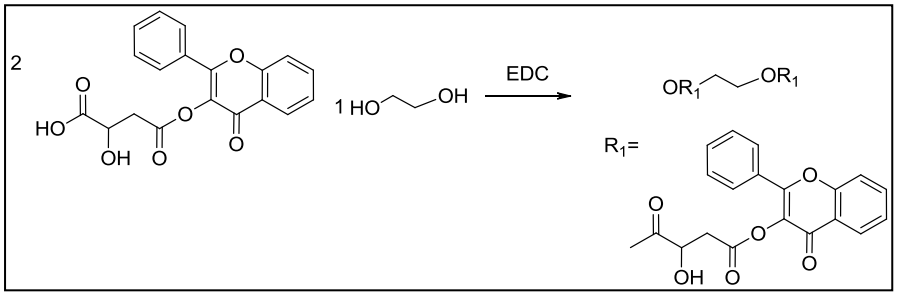


Figura 35: Síntese do pró-fármaco dendrimérico de 3-hidroxiflavona, com etilenoglicol, como foco central.

Em 5 mL de diclorometano, mantiveram-se sob agitação o intermediário III (0,44 mmol) e EDC (0,48 mmol), em banho de gelo até a dissolução (aproximadamente 15 minutos). Em seguida, adicionou-se etilenoglicol (0,22 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação em banho de gelo por 8 horas. Ao término da reação, adicionaram-se 20 mL de acetato de etila e a solução foi extraída três vezes com 30 mL de água. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, a 30 ºC (Figura 35). A purificação foi realizada por cromatografia em coluna automatizada utilizando o cromatógrafo automático Isolera Prime, Biotage, eluente hexano/acetato de etila em gradiente de concentração.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel hexano/ acetato de etila 2:1 (v/v).

3.2.1.4 Síntese de pró-fármacos dendriméricos – outras abordagens

3.2.1.4.1 *Síntese do intermediário IV (ácido succínico e propanodiamina) – Método O* (adaptado de HUANG et al., 1997; JOHN, YOUN, 1954)

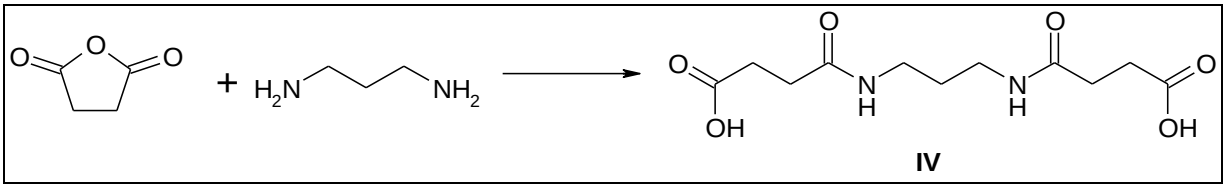


Figura 36: Síntese do intermediário IV.

Mantiveram-se sob agitação, solução de anidrido succínico em solvente adequado, e posteriormente, adicionou-se propanodiamina (Tabela VI). A mistura reacional foi mantida de acordo com as descrições da Tabela VI. Ao término da reação, o produto foi isolado conforme as especificações da Tabela VI (Figura 36). As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada com eluente clorofórmio/metanol 9:1 (v/v).

Tabela VI – Condições reacionais, de isolamento e purificação realizados no método O (experimentos O1, O2, O3, O4 e O5)

Experimento	Reagentes / solvente	mmol ou volume (mL)	Condições de tempo e temperatura	Isolamento e Purificação
O1	- anid. succínico - PDA - ACN	5 2 8	Refluxo - 80 °C Tempo: 24 h	Fitração a vácuo do precipitado com éter etílico gelado.
O2	- anid. succínico - PDA - THF	5 2 4	T.A. Tempo: 18 h	Extração e liofilização.
O3	- anid. succínico - PDA - THF	5 2 8	T.A Tempo: 18 h	Fitração do precipitado (ppt) com éter etílico gelado.
O4	- anid. succínico - PDA - THF	5 2 8	Refluxo - 60 °C Tempo: 24 h	Filtração a vácuo do ppt com éter etílico gelado.
O5	- anid. succínico - PDA - THF	18 2 20	Atmosfera N_2 Refluxo – 60 °C Tempo: 24 h	Filtração a vácuo do ppt com acetona gelada.

*ACN= acetonitrila, PDA = propanodiamina, T.A. = temperatura ambiente, THF = tetraidrofurano.

3.2.1.4.2 *Síntese de pró-fármacos a partir do intermediário IV*

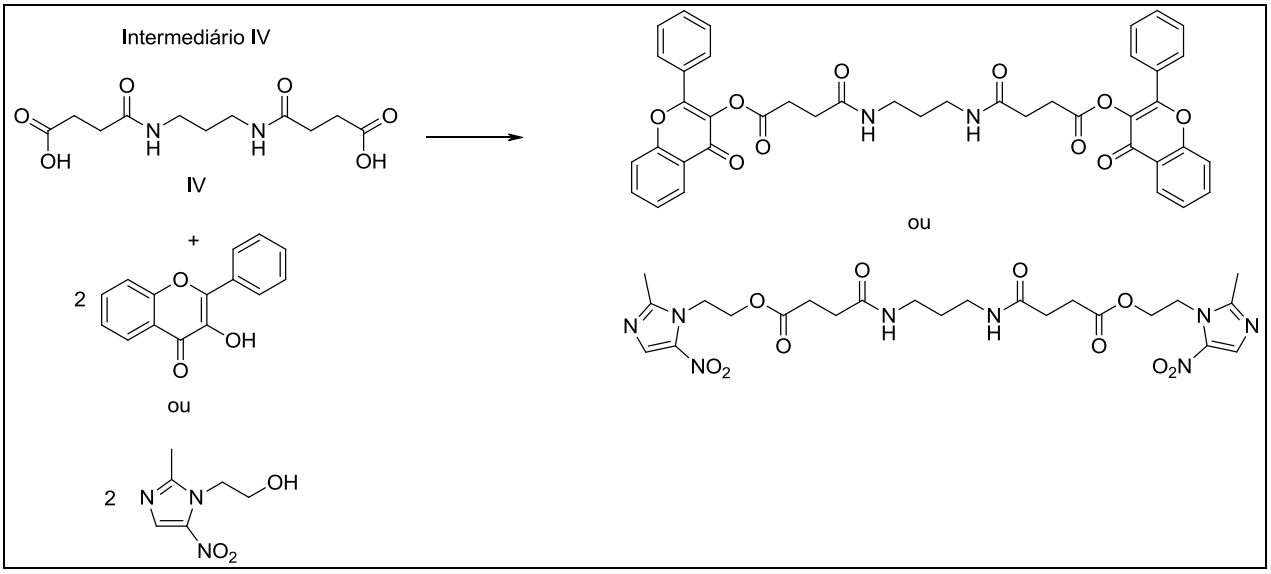


Figura 37: Síntese dos pró-fármacos sintetizados a partir do intermediário IV.

⇒ *Método P* (adaptado de VARGAS, 2007).

Em banho de gelo, adicionou-se o intermediário IV a solução de *N*-metilmorfolina em solvente adequado, de acordo com as descrições da Tabela VII. Agitou-se por 15 minutos, acrescentando-se, então, cloroformato de etila. Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se a solução com o composto bioativo (3-hidroxiflavona ou metronidazol) (Tabela VII). A reação foi mantida sob agitação e banho de gelo por mais 1 hora. Posteriormente, manteve-se o meio reacional sob agitação por 24 horas. Ao término da reação, diluiu-se a mistura reacional com solvente adequado (Tabela VII) e as extrações estão descritas na Tabela VII. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 40 ºC, para obtenção dos respectivos pró-fármacos (Figura 37).

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada com as fases móveis descritas na Tabela VII.

Tabela VII – Condições reacionais, de isolamento e purificação realizados no método P (experimentos P1, P2 e P3)

Experimento	Reagentes / solvente	mmol ou volume (mL)	Tempo de reação (h)	Isolamento e Purificação
P1	- intermediário IV	2,81	24	Solvente: clorofórmio 50 mL
	- clorof. de etila	6,74		Condição de extração:
	- NMO	6,74		NaOH 1 M - 25 mL – 2 vezes
	- 3-hidroxiflavona	6,74		NaCl* - 25 mL – 1 vez
	- clorofórmio	56		HCl 1 M - 25 mL – 2 vezes
				NaCl* - 25 mL – 1 vez
				CCD: Fase móvel $CHCl_3/CH_3OH$ 1:9 (v/v)
P2	- intermediário IV	1	24	Solvente: acet. de etila 50 mL
	- clorof. de etila	3		Condição de extração:
	- NMO	3		NaOH 1 M - 25 mL – 2 vezes
	- metronidazol	3		NaCl* - 25 mL – 1 vez
	- DMF	12		HCl 1 M - 25 mL – 2 vezes
				NaCl* - 25 mL – 1 vez
				CCD: Fase móvel $CHCl_3/CH_3OH$ 1:1 (v/v)
P3	- intermediário IV	1	22	Solvente: acet. de etila 50 mL
	- clorof. de etila	3		Condição de extração:
	- NMO	3		NaCl* - 15 mL – 10 vezes
	- metronidazol	3		CCD: Fase móvel $CHCl_3/CH_3OH$ 1:1 (v/v)
	- DMF	12		

* Solução saturada, DMF = dimetilformamida, NMO = *N*-metilmorfolina.

3.2.1.5 Síntese de pró-fármacos dendriméricos derivados dos ácidos 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico (*Bis*MPA) e 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico (*Bis*MBA) – (adaptado de IHRE et al., 2001; GILLIES; FRÉCHET, 2002) (Figura 38)

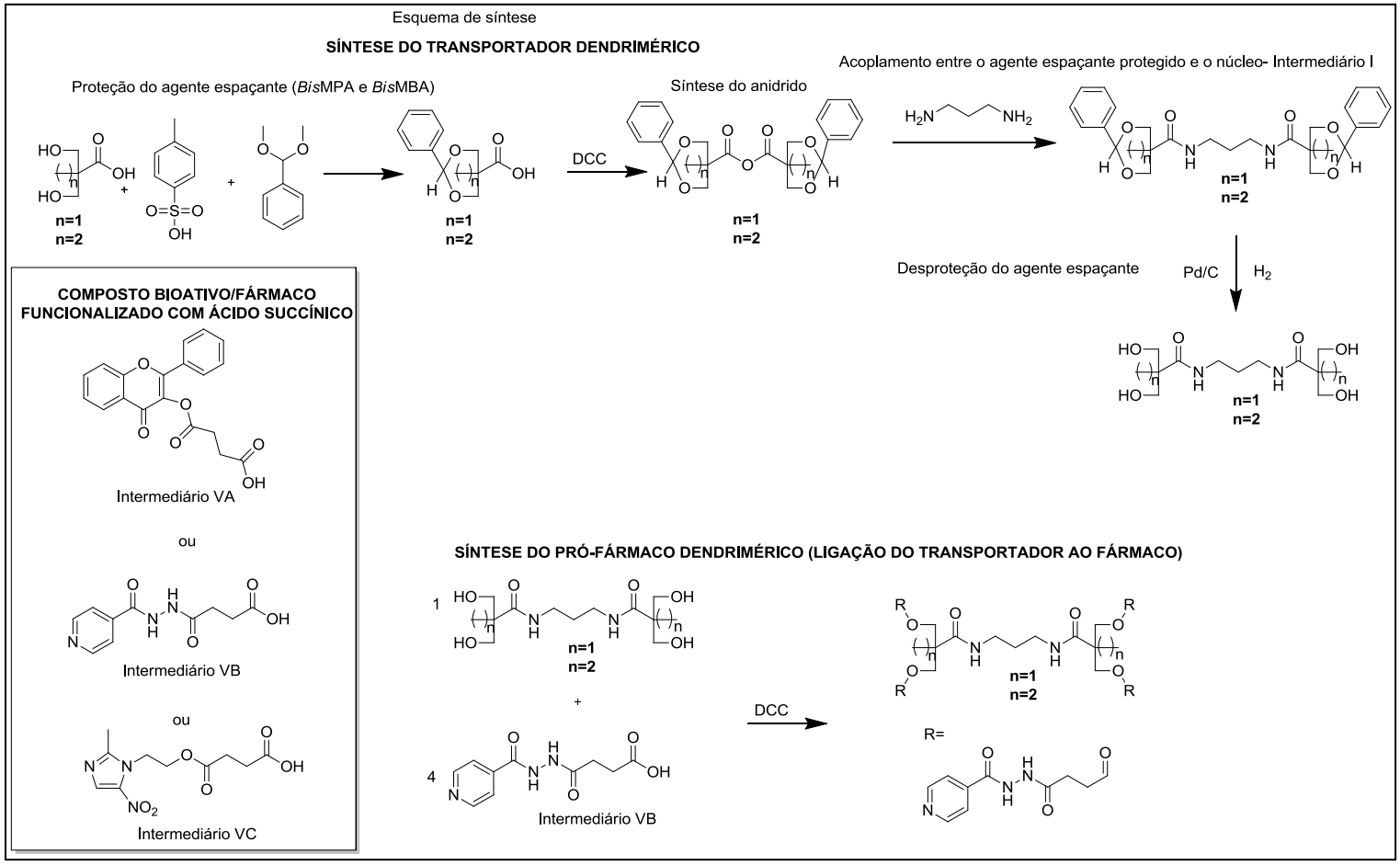


Figura 38: Esquema de síntese de pró-fármacos dendriméricos contendo propanodiamina (foco central) e o ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico (*Bis*MPA) ou o ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico (*Bis*MBA) (*dendron*). A síntese dos demais dendrímeros (com diferentes focos centrais) segue esquema análogo.

3.2.1.5.1 *Proteção do ácido 2,2*-bis*(hidroximetil)propiônico*

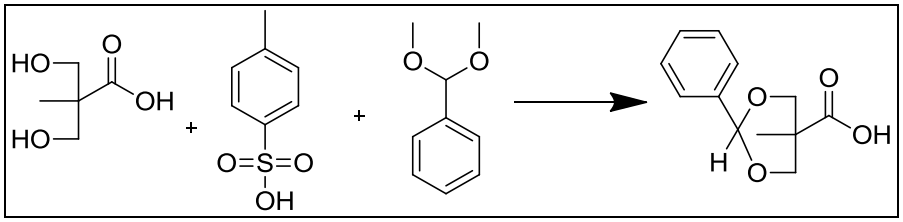


Figura 39: Síntese do ácido 2,2-*bis*(oximetil)propiônico protegido (*Bis*MPAP).

Ao ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico (0,15 mol) adicionaram-se 34 mL de dimetilacetal benzaldeído e 150 mL de acetona. Em seguida, acrescentou-se o ácido *p*-toluenossulfônico (7,64 mmol) (Figura 39). A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 4 horas. Após este período, o conteúdo foi armazenado sob refrigeração. No dia seguinte, filtrou-se a suspensão sob pressão reduzida e os cristais foram coletados.

3.2.1.5.2 *Proteção do ácido 2,2*-bis*(hidroximetil)butírico* (adaptado de IHRE et al., 1998; BEZWADA, 2014; YUAN et al., 2014)

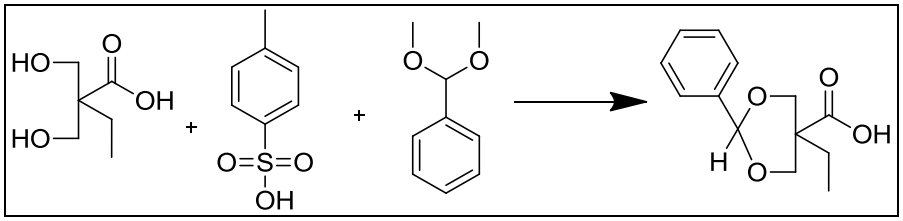


Figura 40: Síntese do ácido 2,2-*bis*(oximetil)butírico protegido (*Bis*MBAP).

Ao ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico (20 mmol) adicionaram-se 4,53 mL de dimetilacetal benzaldeído e 20 mL de acetona. Em seguida, acrescentou-se o ácido *p*-toluenossulfônico (1 mmol) (Figura 40). A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, adicionaram-se 50 mL de diclorometano e extraiu-se 3 vezes com 30 mL de água. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida a 40 °C. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada com sistema solvente hexano/acetato de etila 2:1. Posteriormente, o produto foi redissolvido em

diclorometano e gotejou-se este líquido em diclorometano/hexano(1:9) gelado para precipitação. A suspensão foi armazenada sob refrigeração. No dia seguinte, o pó foi filtrado. A reação foi acompanhada por CCD com sistema solvente hexano/acetato de etila 2:1.

3.2.1.5.3 *Síntese do anidrido do* Bis*MPAP e* Bis*MBAP*

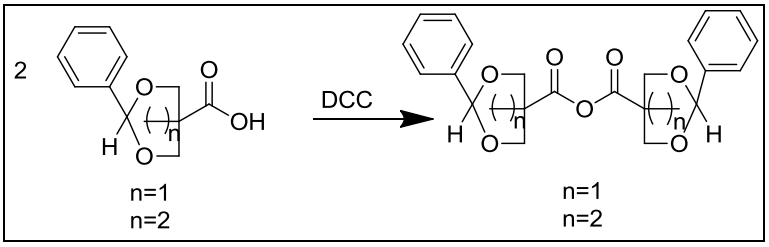


Figura 41: Síntese do anidrido do *Bis*MPAP e *Bis*MBAP.

Em 250 mL de diclorometano dissolveu-se o agente espaçante protegido (*Bis*MPAP ou *Bis*MBAP 0,23 mol). Em seguida, adicionou-se DCC (0,11 mol) dissolvido em 100 mL de diclorometano. Manteve-se a agitação em temperatura ambiente *overnight*. Após este período, a mistura reacional foi filtrada. O filtrado foi gotejado em 2000 mL de hexano gelado para precipitação do produto. O conteúdo foi armazenado sob refrigeração. No dia seguinte, filtrou-se e coletou-se pó branco amorfo (Figura 41). As reações foram acompanhadas por CCD com sistema solvente hexano/acetato de etila 2:1.

3.2.1.5.4 *Síntese do intermediário* Bis*MBAP e propanodiamina, partindo do anidrido do* Bis*MBAP*

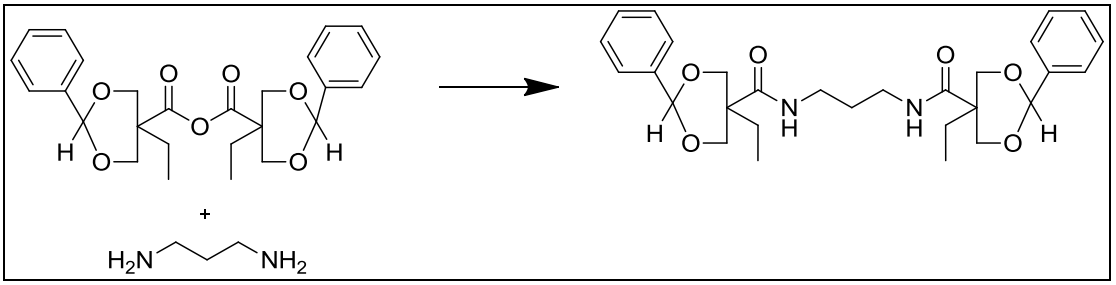


Figura 42: Síntese do intermediário *Bis*MBAP e propanodiamina, a partir do anidrido do *Bis*MBAP.

Dissolveram-se em 7 mL de diclorometano e acetona o anidrido do *Bis*MBAP (1 mmol) e DMAP (0,02 mmol). Posteriormente, adicionou-se gota a gota a propanodiamina (0,33 mmol). A mistura reacional foi mantida sob atmosfera inerte à temperatura ambiente *overnight*. No dia seguinte, acrescentaram-se 10 mL de água desionizada e a reação, novamente, foi mantida sob atmosfera inerte *overnight* (Figura 42). No terceiro dia de reação, o conteúdo reacional foi extraído 2 vezes com 30 mL de solução 1 M de bissulfato de sódio e 2 vezes com 30 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 40 ºC. A reação foi acompanhada por CCD com sistema solvente hexano/acetato de etila 2:1.

3.2.1.5.5 *Síntese do intermediário* Bis*MPAP e focos centrais, partindo do anidrido do* Bis*MPAP*

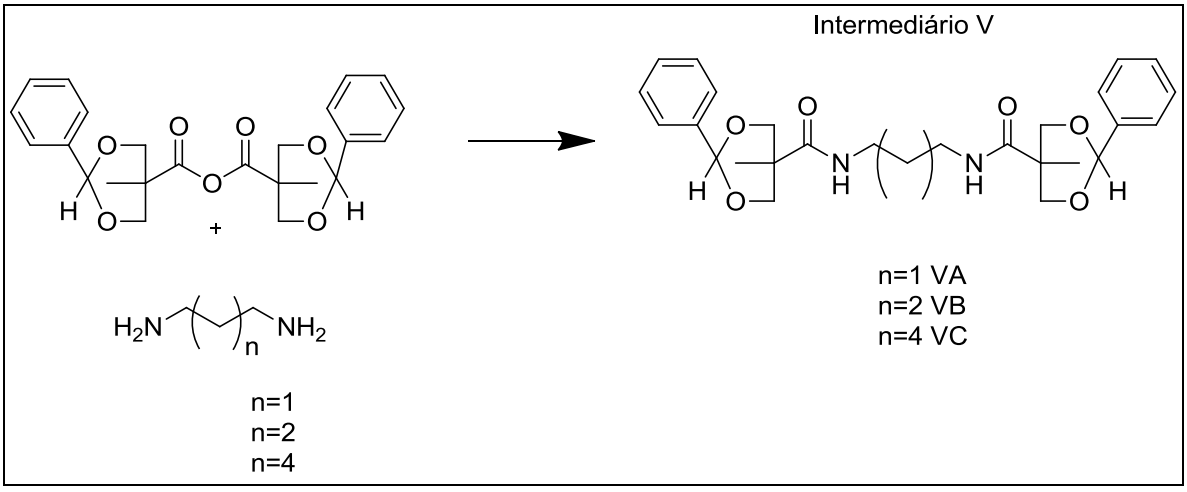


Figura 43: Síntese do intermediário V.

Dissolveram-se em 7 mL de diclorometano anidrido do *Bis*MPAP (2,75 mmol) e DMAP (0,05 mmol). Posteriormente, adicionou-se gota a gota o foco central (1,1 mmol de propano-, butano- ou hexano-diamina) diluído em diclorometano. A mistura reacional foi mantida sob atmosfera inerte à temperatura ambiente *overnight*. No dia seguinte, acrescentaram-se 10 mL de água desionizada e a reação, novamente, foi mantida sob atmosfera inerte *overnight* (Figura 43). No terceiro dia de reação, o conteúdo reacional foi extraído 2 vezes com 30 mL de solução 1 M de bissulfato de sódio e 2 vezes com

30 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 40 ºC. Em seguida, o sólido foi redissolvido em diclorometano e gotejou-se este líquido em diclorometano/hexano gelado (1:9) para precipitação. A suspensão foi armazenada sob refrigeração. No dia seguinte, o pó foi filtrado. As reações foram acompanhadas por CCD com sistema solvente hexano/acetato de etila 2:1.

3.2.1.5.6 *Desproteção do intermediário* Bis*MPAP e foco central (intermediários VA e VB)*

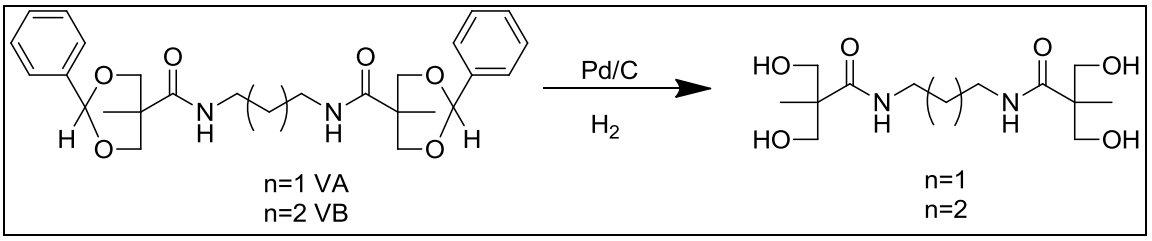


Figura 44: Desproteção do intermediário *Bis*MPAP e foco central (intermediários VA e VB).

O intermediário (VA ou VB - 2,20 mmol) foi dissolvido em 55,50 mL de solução 1:1 de metanol e diclorometano. Em seguida, adicionaram-se 1,38 g de Pd/C (Figura 44). Acoplou-se bomba de vácuo e reservatório de gás H_2 ao sistema. Para garantir a saturação do sistema com H_2, abriu-se a saída de hidrogênio e a bomba de vácuo até a formação de bolhas no sistema, repetindo-se esse processo três vezes. O meio reacional foi mantido sob atmosfera de H_2 *overnight*. No dia seguinte, filtrou-se a mistura reacional com celite, lavando-se com solução de metanol/diclorometano 1:1. Posteriormente, o filtrado foi removido sob pressão reduzida a 40 °C, obtendo-se o intermediário desprotegido.

3.2.1.5.7 *Funcionalização dos agentes bioativos*

⇒ *Síntese do hemissucinato de 3-hidroxiflavona* (adaptado de NAJLAH et al., 2007; GIAROLLA, 2012).

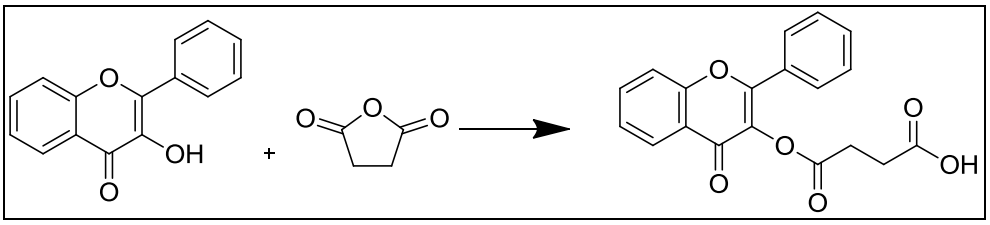


Figura 45: Funcionalização da 3-hidroxiflavona com ácido succínico.

Dissolveram-se o anidrido succínico (2 mmol) e DMAP (0,1 mmol) em 10 mL de THF. Posteriormente, adicionaram-se 3-hidroxiflavona (1 mmol) e piridina (0,8 mL). A reação foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente por 24 horas (Figura 45). Após esse período, o THF foi removido sob pressão reduzida, o produto foi lavado com hexano e, novamente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada com eluente hexano/acetato de etila 2:1. Realizou-se a purificação do produto por coluna cromatográfica, utilizando como sistema solvente hexano e acetato de etila em gradiente de concentração.

⇒ *Síntese do hemissucinato de metronidazol* (adaptado de MURA et al., 2011).

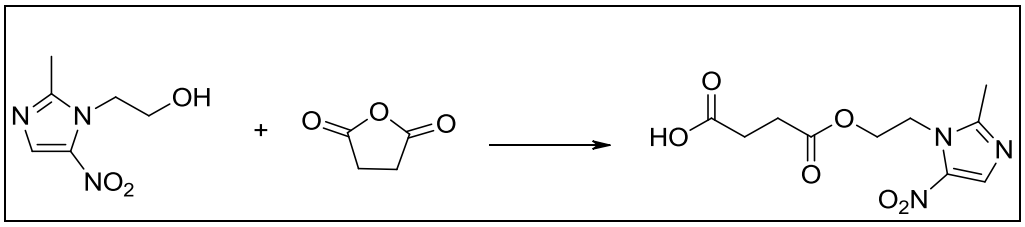


Figura 46: Funcionalização do metronidazol com ácido succínico.

Em 14 mL de acetonitrila mantiveram-se, sob agitação, metronidazol (2 mmol), anidrido succínico (2,4 mmol) e DMAP (0,25 mmol) por 57 horas (Figura 46). Após este período, o solvente foi concentrado sob pressão reduzida a 50 °C, lavou-se o conteúdo três vezes com 4,27 mL de água a 60 °C e filtrou-se.

Acompanhou-se a reação por cromatografia em camada delgada com fase móvel clorofórmio/metanol 1:1 (v/v).

⇒ *Metronidazol e AMP* (adaptado de VARGAS, 2007).

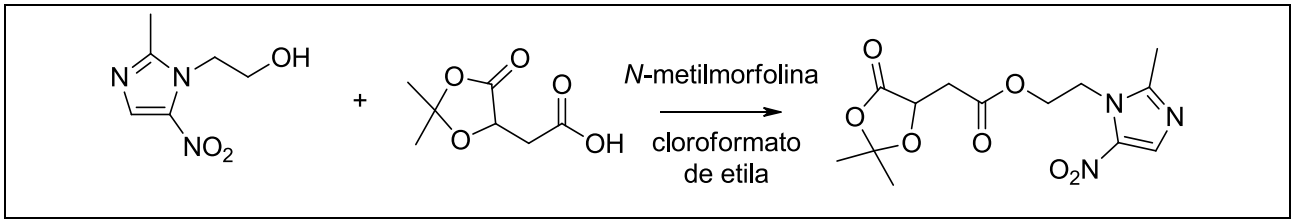


Figura 47: Síntese do *dendron* contendo metronidazol e AMP.

Em banho de gelo, mantiveram-se sob agitação em 10 mL de DMF, *N*-metilmorfolina (1,5 mmol) e ácido málico protegido (1 mmol), por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se cloroformato de etila (1,5 mmol). Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se o metronidazol (1,5 mmol) (Figura 47). A reação foi mantida em banho de gelo por mais 1 hora. Após este período, manteve-se o meio reacional sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, lavou-se o conteúdo reacional conforme as descrições da Tabela VIII. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 40 ºC.

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, com fase móvel clorofórmio/metanol 1:1 (v/v).

Tabela VIII – Condições de extração realizadas para os experimentos Q1 e Q2

Experimento	Condições de extração
Q1	Solvente: acetato de etila 20 mL Condição de extração: NaOH 1 M - 10 mL – 2 vezes NaCl* - 10 mL – 1 vez HCl 1 M - 10 mL – 2 vezes NaCl* - 10 mL – 1 vez
Q2	Solvente: acetato de etila 20 mL Condição de extração: NaCl* - 10 mL – 3 vezes

***** solução saturada

⇒ *Síntese da hemissucinamida de isoniazida* (adaptado de YEOH et al., 2013).

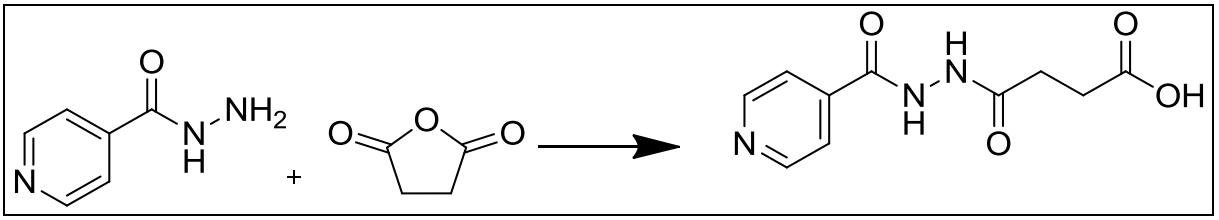


Figura 48: Funcionalização da isoniazida com ácido succínico.

Adicionou-se a isoniazida (2 mmol), sob agitação, a 10 mL de acetato de etila. Posteriormente, acrescentou-se gota a gota solução de anidrido succínico (1 mmol) dissolvido em 5 mL de acetato de etila. O meio reacional foi mantido sob agitação em temperatura ambiente por 5 horas. Após este período, o precipitado foi coletado e recristalizado de etanol, obtendo-se o derivado succinoilado (Figura 48).

3.2.2 **Métodos de análise dos compostos obtidos**

3.2.2.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear dos compostos obtidos foi realizada em Espectrômetro Bruker 300 MHz, modelo advanced DPX-300, disponível na FCF-USP e, também, no Espectrômetro Varian 400 MHz, modelo Unity Inova 400, disponível no Departamento de Química da Tulane University.

3.2.2.2 Espectrofotometria no Infravermelho (IV)

A espectrofotometria no IV foi realizada no equipamento FTIR IRAffinity-1 Shimadzu da Central Analítica da FCF-USP, com pastilhas de KBr e ATR (*Attenuated Total Reflectance*). As análises no IV foram realizadas, também, no equipamento Thermo Nicolet Avatar Nexus 670 FTIR do Departamento de Química da Tulane University, com pastilhas de KBr.

3.2.2.3 Espectrometria de massas MALDI-ToF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*)

A espectrometria de massas MALDI-ToF foi realizada no espectrômetro de massas Bruker Autoflex III em modo positivo, disponível no Departamento de Química da Tulane University. Para aquisição dos dados, utilizou-se o *software* Bruker Daltonics FlexControl 3.0, empregando-se uma fonte iônica com voltagem de 19,00 kV e segunda fonte iônica com voltagem de 16,30 Kv, bem como lente com voltagem 9,10 kV, energia laser definida para 65% e detector de 1905 kV. A margem de detecção definida no equipamento foi de massa molecular entre 200 e 2000 u.m.a.

Prepararam-se soluções padrão em THF:

- Analito - concentração de 2 mg/mL;
- Cátions – trifluoracetato de sódio 1 mg/mL ou trifluoracetato de potássio 1 mg/mL;
- Para preparo das amostras é necessário o uso de matriz. Como matrizes utilizaram-se as soluções de galvinoxil livre 10 mg/mL, ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico 10 mg/mL ou grafite.

A partir das soluções padrão prepararam-se as amostras a serem aplicadas na placa do MALDI. Para o preparo da amostra, utilizou-se a proporção 1:1:2, que consiste em 3 µL de matriz: 3 µL de cátion e 6 µL de analito. Em seguida, aplicaram-se nos poços da placa do MALDI-ToF 3 µL desta solução 2 vezes. O número de toques na placa, para detecção da amostra, foi de aproximadamente 2000. Por fim, os dados foram analisados em *software* Bruker Daltonics FlexAnalysis 3.0.

3.2.2.4 Análise Cromatográfica

3.2.2.4.1 *Cromatografia em camada delgada (CCD)*

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas com cromatoplacas de sílica-gel G-60, marca Merck, com as fases móveis apropriadas.

3.2.2.4.2 *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a doutoranda Lorena Cristine Paes e a aluna de iniciação científica Giulia Kassab. O método de análise e a curva de calibração foram determinados pelos estudos de doutorado e iniciação científica das colaboradoras acima citadas.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada para determinação da pureza cromatográfica em equipamento semipreparativo, marca Shimadzu, disponível na Central Analítica do Departamento de Farmácia, FCF-USP.

A solução mãe foi preparada com 1 mg do intermediário III e 10 mL de acetonitrila grau HPLC. As amostras para injeção no equipamento foram preparadas com 400 µL de acetonitrila e 600 µL de solução de ácido trifluoracético a 1%. O fluxo do equipamento foi de 1 mL/minuto, tempo de corrida de 30 minutos e o comprimento de onda em UV λ = 240-310 nm.

Resultados e discussão

"Você nunca sabe que resultados virão da sua ação, mas se você não fizer nada, não existirão resultados."

Mahatma Gandhi

4. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

4.1 SÍNTESE DOS AGENTES ESPAÇANTES PROTEGIDOS

O ácido málico e o ácido glutâmico são importantes para a síntese dos dendrímeros, pois não só atuam como espaçantes para a obtenção dos pró-fármacos, como, também, fazem parte do *dendron* dos polímeros dendriméricos. Estes ácidos apresentam duas carboxilas, que proporcionam ligação ao foco central do dendrímero e ao composto bioativo. No entanto, os ácidos málico e glutâmico apresentam, respectivamente, hidroxila e amina, que são importantes para o aumento das gerações dos dendrímeros propostos. Neste contexto, para evitar a ocorrência de reações cruzadas e a obtenção de diferentes produtos, realizaram-se as reações de proteção dos agentes espaçantes. Desta forma, é possível garantir a seletividade da carboxila que reagirá com o foco central ou com o composto bioativo (Figura 49). As reações de proteção tiveram o objetivo de promover a obtenção da lactona do ácido málico e do ácido glutâmico (GIAROLLA, 2007; GIAROLLA, 2012; SANTOS, 2012).

4.1.1 **Síntese do ácido málico protegido**

A cromatografia de camada delgada mostrou mancha com R*ƒ* de 0,23, valor diferente do material de partida (ácido málico = 0,15 em fase móvel hexano/acetato de etila 1:1). O R*ƒ* de 0,23 mostra a formação de produto com caráter mais apolar que o material de partida, o que sugere a obtenção do ácido málico protegido.

O espectro no IV (Espectro 1) mostrou a obtenção do ácido málico protegido. Com relação ao ácido, observam-se bandas de estiramento de OH e carbonila de ácido carboxílico em 3269 e 1735 cm^{-1}, respectivamente. Neste espectro, é possível identificar banda de estiramento em 1767 cm^{-1} referente a lactona, o que caracteriza a proteção. Além disso, as bandas de deformação em 1386 e 1379 cm^{-1} são relativas às metilas da proteção, bem como a banda de deformação em 1129 cm^{-1}, que está relacionada à ligação C-O-C axial de acetal.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 2) apresentou singletos em 1,55 e 1,60 ppm, correspondentes aos hidrogênios H_6 e H_7 das metilas da lactona presente no ácido málico protegido. No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 3) apareceram os sinais em

111,36 ppm, relativo ao C_5, em 25,81 ppm, referente ao C_6, e em 26,75 ppm, que se refere ao C_7 da lactona do ácido málico protegido. O produto foi obtido com sucesso e apresentou aspecto de cristal agulha de cor branca e rendimento em torno de 60%.

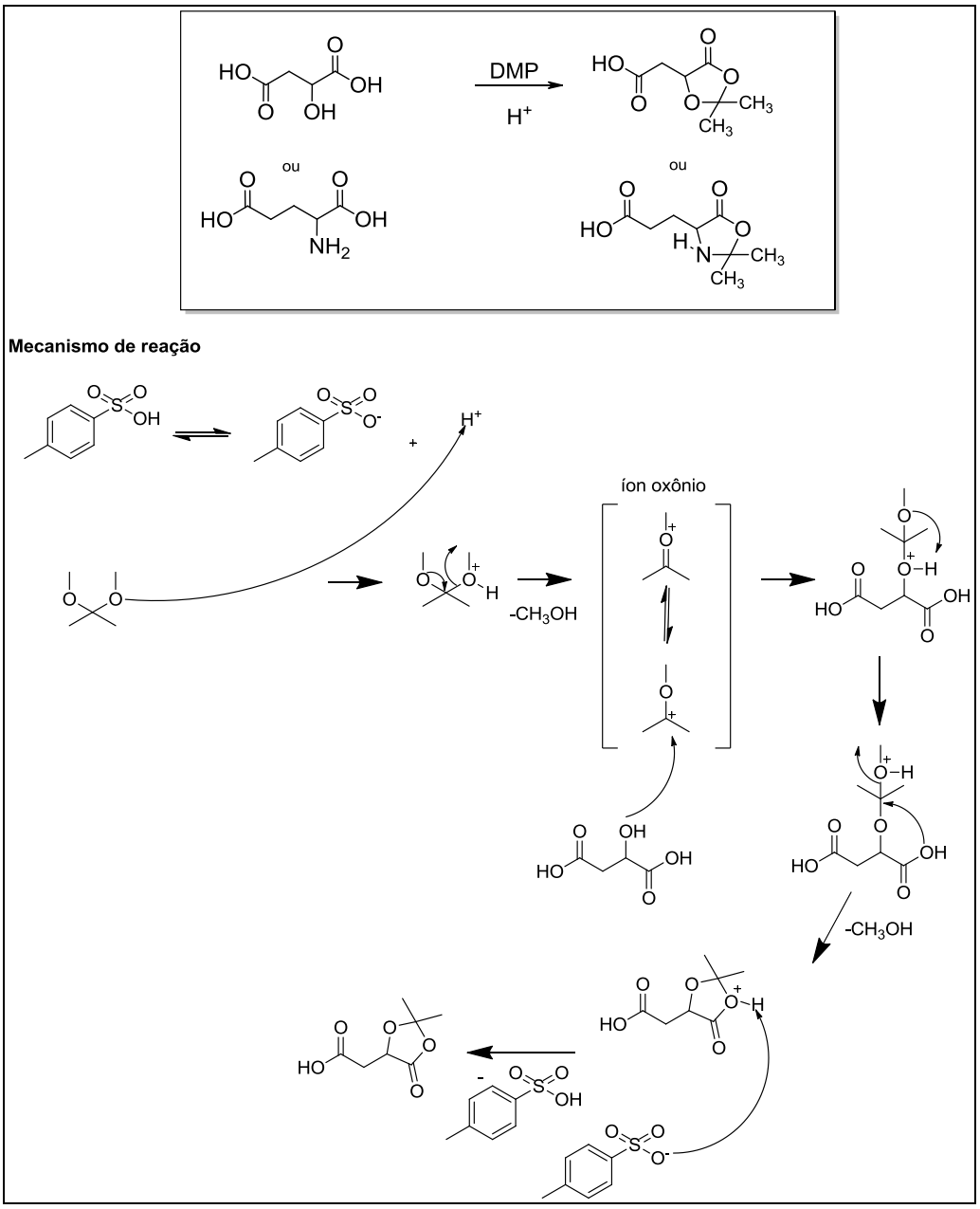
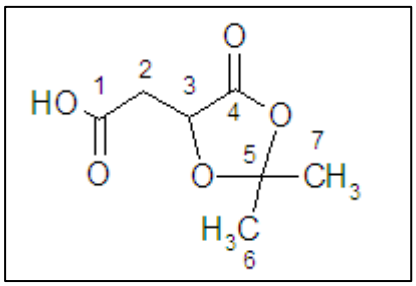
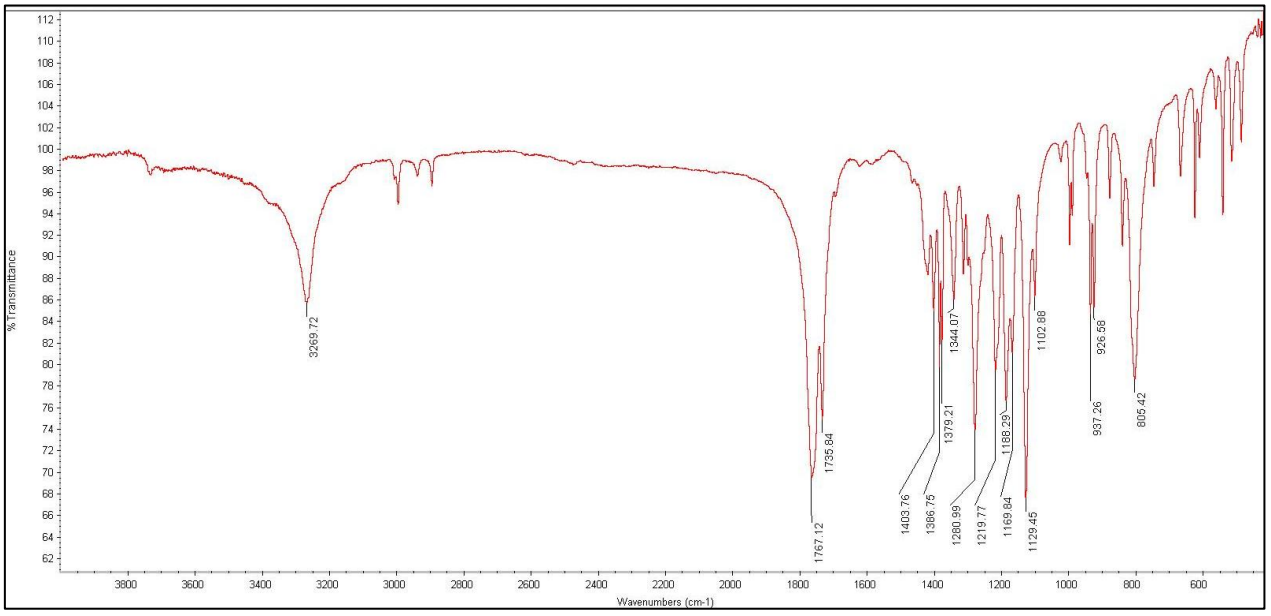


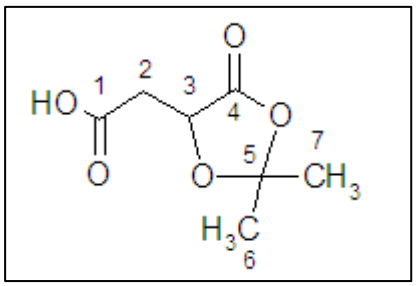
Figura 49: Reação de proteção dos agentes espaçantes (ácido L-glutâmico e ácido L(-)-málico). O mecanismo de reação mostra a proteção do ácido málico e a proteção do ácido glutâmico segue mecanismo análogo (adaptado de CLAYDEN et al., 2008). DMP = 2,2-dimetoxipropano.

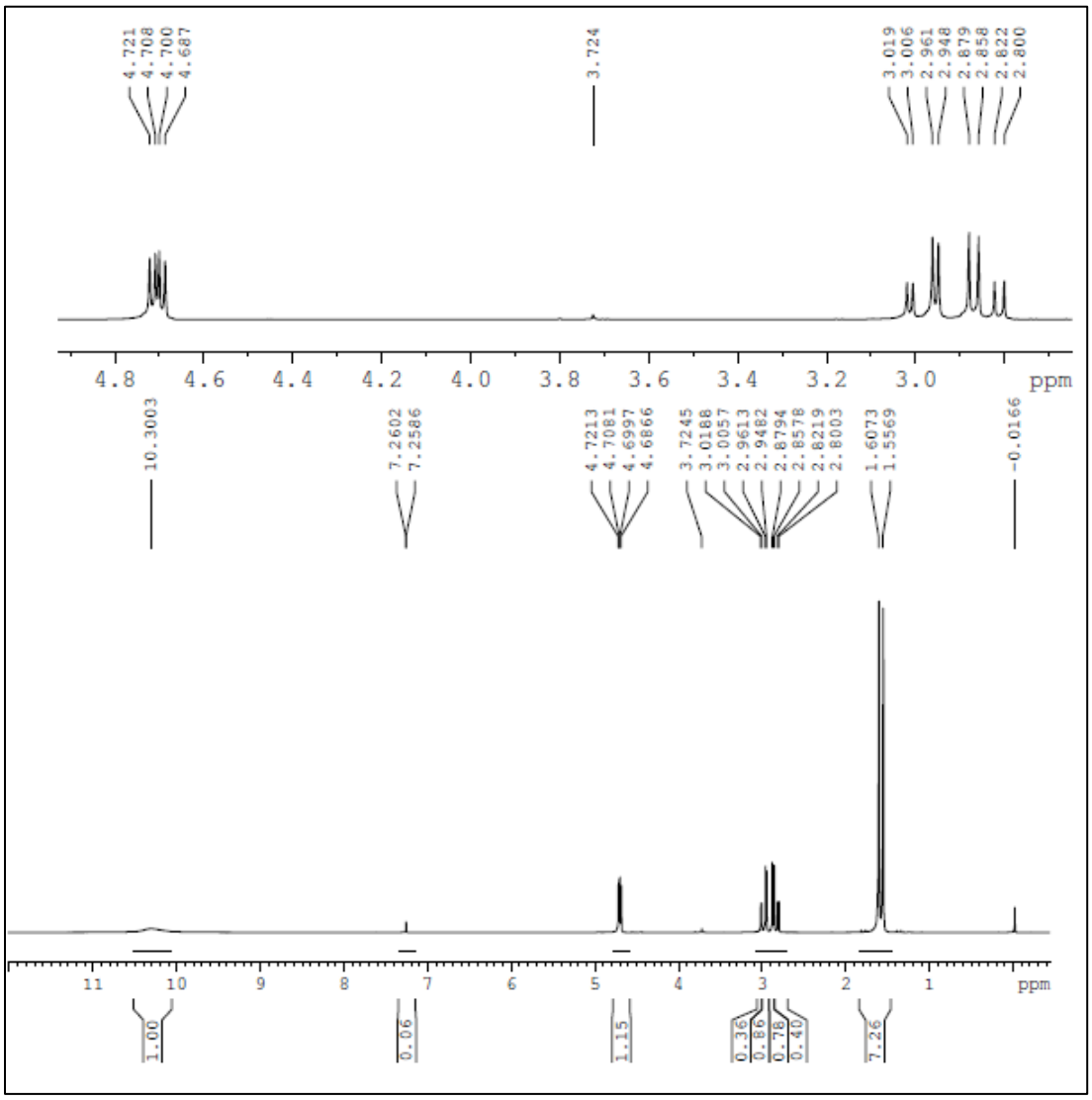




Espectro 1: Espectro no IV do AMP.

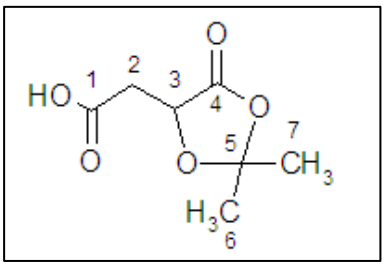
IV (ν, KBr, cm^{-1})
3269 (ν_{OH} livre de ácido carboxílico); 1767 ($\nu_{C=O}$ lactona); 1735 ($\nu_{C=O}$ ácido carboxílico); 1386 (δ CH_3 angular assimétrica); 1379 (δ CH_3 angular assimétrica); 1129 (δ_{C-O-C} axial de acetal).

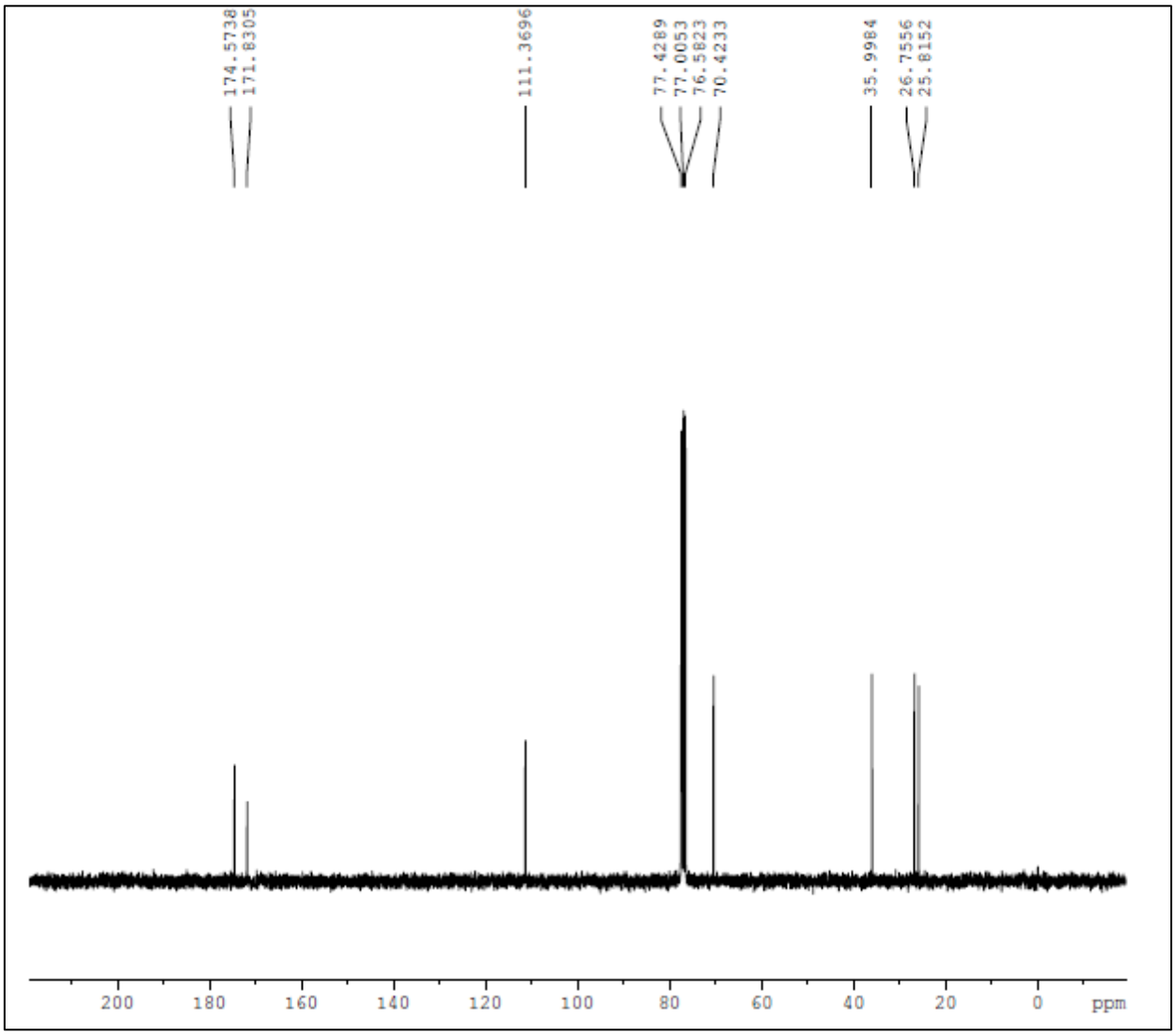




Espectro 2: Espectro de RMN ^{1}H de ácido málico protegido.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ
7,26 ($CDCl_3$); 1,55, 1,60 (s, 6H, H_6, H_7); 2,81 (dd, 1H, H_2, J = 17 Hz, J = 6 Hz); 3,00 (dd, 1H, H_2, J = 17 Hz, J=3 Hz); 4,70 (dd, 1H, H_3, J = 6 Hz, J = 3 Hz).





Espectro 3: Espectro de RMN ^{13}C de ácido málico protegido.

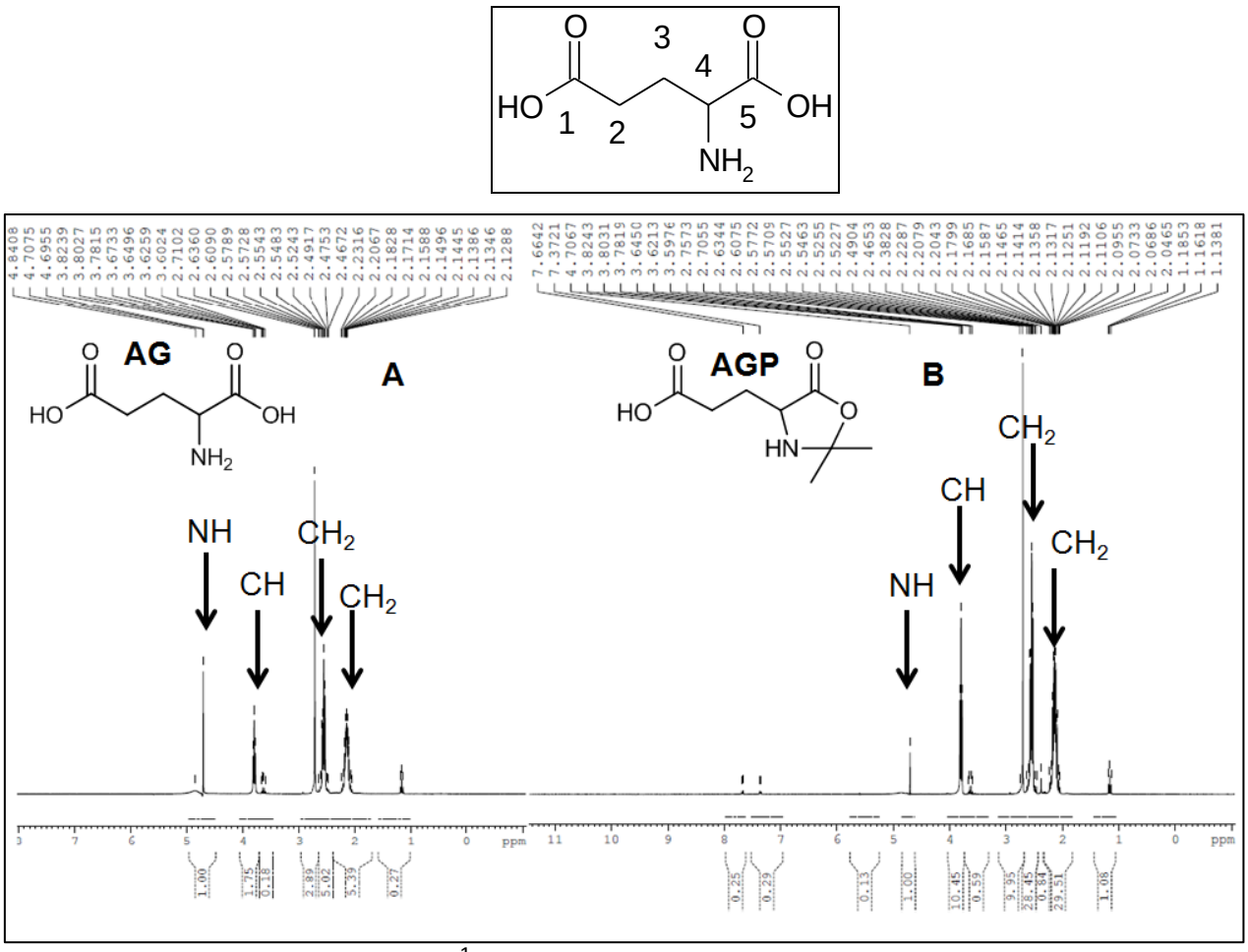
RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75 MHz, δ
77,00 ($CDCl_3$); 25,81 (C_7); 26,75 (C_6); 35,99 (C_2); 70,42 (C_3); 111,36 (C_5); 171,83 (C_4); 174,57 (C_1).

4.1.2 **Síntese do ácido glutâmico protegido**

A princípio, a reação foi realizada com o mesmo método de proteção do ácido málico. A placa cromatográfica da fase orgânica não apresentou manchas que indicassem a obtenção de produto. Além disso, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 4) não apresentou os sinais relativos às metilas da proteção na região de 1,50 ppm. Adicionalmente, o espectro mostrou apenas os sinais referentes ao material de partida, ácido glutâmico, nas regiões de 2,03, 2,50 e 3,60 ppm, relacionados aos hidrogênios dos carbonos C_3, C_2 e C_4, respectivamente. Outro forte indício da não obtenção do produto foi a presença do sinal em 4,70 ppm, que corresponde aos hidrogênios da amina livre que deveria ter sido protegida.

Com o intuito de favorecer a proteção do ácido glutâmico, algumas adaptações foram realizadas no procedimento. O método de proteção citado na literatura descreve a adição concomitante de todos os reagentes no início da reação, como acontece com a bem-sucedida síntese do ácido málico protegido. Neste contexto, deixou-se reagir o ácido *p*-toluenossulfônico e 2,2-dimetoxipropano durante 30 minutos, para favorecer a formação do íon oxônio, intermediário reacional importante que sofre o ataque nucleofílico do ácido glutâmico para a síntese do derivado protegido (Figura 49). Após este período, adicionou-se ácido glutâmico. Entretanto, o resultado obtido com esta adaptação foi análogo ao anterior, ou seja, a não formação do ácido glutâmico protegido.

Ademais, durante os experimentos observaram-se problemas com relação à solubilização do ácido glutâmico, devido à formação de precipitado branco no meio reacional. Dessa forma, provavelmente, o ácido glutâmico não reagiu. Um problema enfrentado na síntese com o ácido glutâmico é a sua baixa solubilidade na maioria dos solventes. Realizaram-se testes de solubilidade a quente e a frio nos seguintes solventes: acetato de etila, acetona, acetonitrila, água, clorofórmio, dioxano, metanol e tetraidrofurano e, em todos estes o ácido glutâmico foi insolúvel. Provavelmente, este fator influenciou a reatividade deste composto.



Espectro 4: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O): (A) ácido glutâmico - material de partida; (B) produto obtido da reação de proteção do ácido glutâmico. AG – ácido glutâmico; AGP- ácido glutâmico protegido.

4.2 SÍNTESE DO ANIDRIDO DO ÁCIDO MÁLICO PROTEGIDO

Uma das tentativas realizadas para a síntese dos intermediários I, que consistem na ligação dos diferentes focos centrais com o AMP, foi a síntese do anidrido do AMP. Desta forma, utilizou-se o anidrido para reagir com núcleos amínicos, devido ao anidrido ser mais reativo que o ácido carboxílico. Além disso, o grupo do Professor Dr. Scott M. Grayson tem larga experiência na síntese do anidrido do ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico protegido. Deste modo, foi possível adaptar esta metodologia amplamente utilizada para a síntese do anidrido do AMP, bem como adquirir essa experiência.

Aplicaram-se duas metodologias semelhantes, mas com algumas diferenças na purificação desses produtos. De acordo com Gillies & Fréchet (2002), para o processo de precipitação, após a filtração do DCU (dicicloexiluréia – subproduto obtido nas reações que utilizam DCC, como agente condensante – Figura 50), o filtrado é concentrado sob pressão reduzida e, posteriormente, redissolvido em acetato de etila. Em seguida, o líquido é gotejado em hexano gelado, na proporção 1:9. Seguindo esta metodologia, obteve-se rendimento de 55% de produto puro.

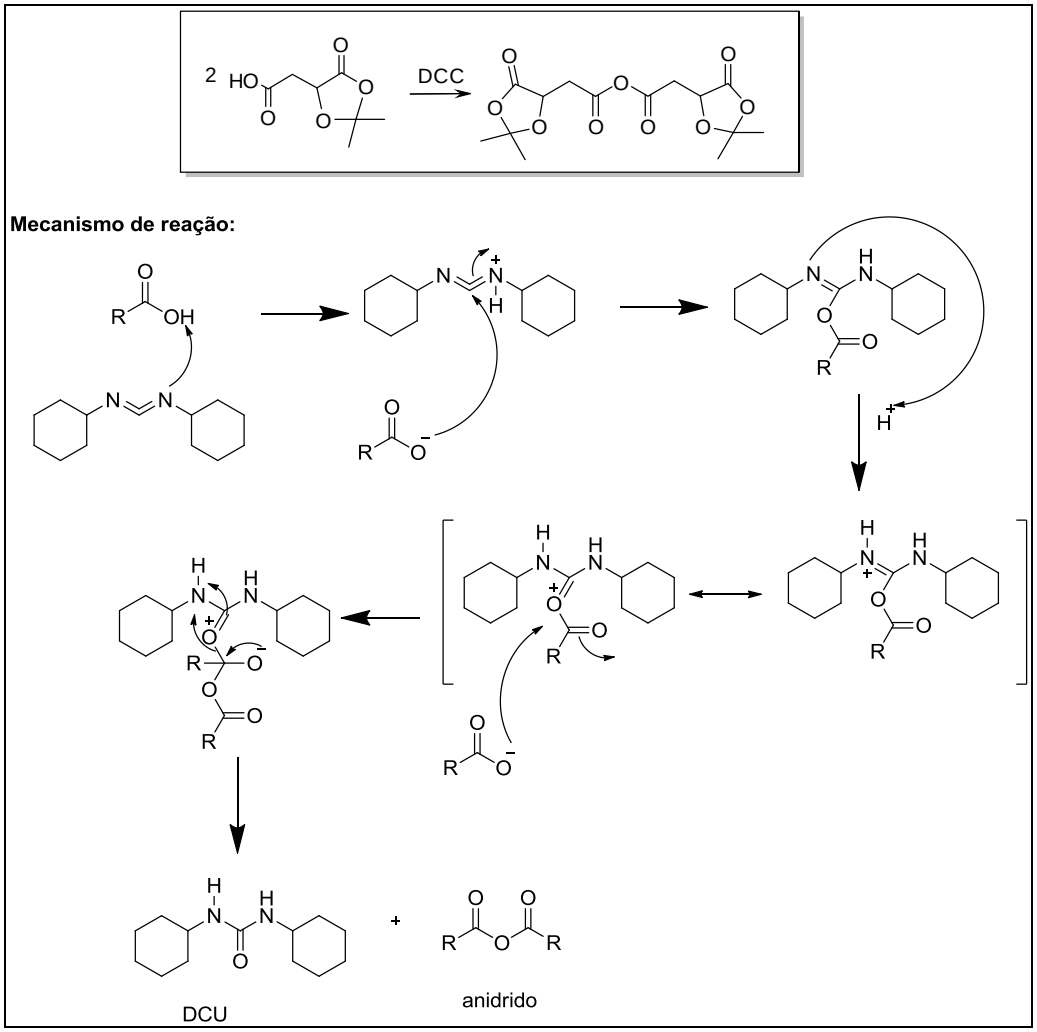
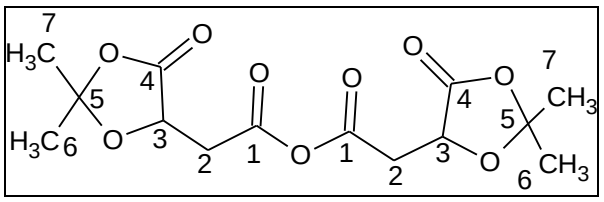


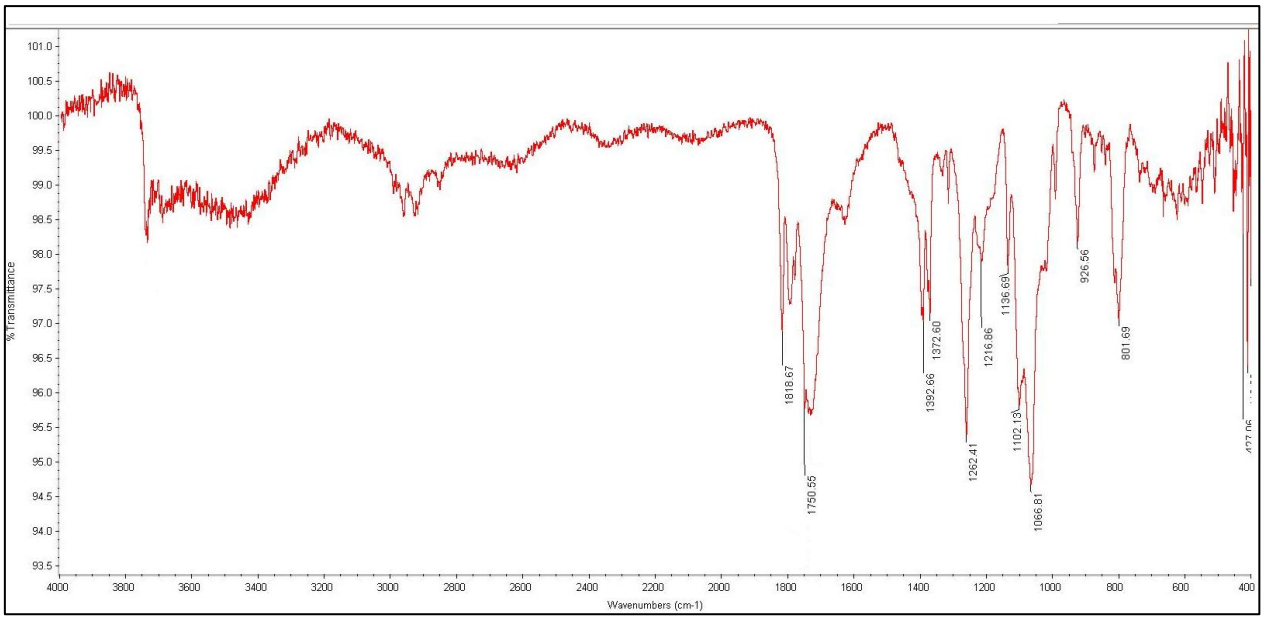
Figura 50: Mecanismo de reação para a síntese do anidrido do ácido carboxílico. Esse mecanismo é referente a síntese do anidrido do AMP, *Bis*MPAP e *Bis*MBAP (adaptado de D'OCA, 2010 e NEISES, STEGLICH, 1978).

Outro método utilizado foi o descrito por Ihre et al. (2001), que, após a filtração do DCU, o filtrado, cujo solvente é diclorometano, é gotejado em hexano gelado, respeitando-se, também, a proporção 1:9. Com este procedimento, obteve-se rendimento de 69% e, por esta razão, este método foi o utilizado para a síntese deste anidrido.

O espectro no IV (Espectro 5) revelou a obtenção do anidrido do AMP, principalmente pela presença da banda de estiramento de carbonila de anidrido em 1818 cm^{-1}, o que caracteriza a função do produto de interesse. Além disso, constatou-se o desaparecimento da banda de estiramento de OH de ácido carboxílico em 3269 cm^{-1}, mostrando que houve a formação do anidrido. Em adição, é possível observar outros sinais relativos a este composto, como a banda de estiramento em 1750 cm^{-1}, referente à lactona da proteção, bem como as bandas de deformação em 1392 e 1372 cm^{-1} e em 1136 cm^{-1}, relacionadas, respectivamente, às metilas e à ligação C-O-C de acetal.

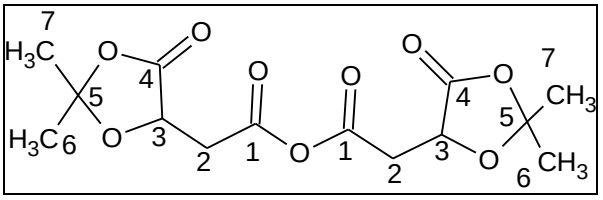
O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 6) apresentou sinais relativos ao ácido málico protegido em 1,55-1,59 ppm e 4,68-4,70 ppm, relacionados, respectivamente, às metilas no grupo protetor do AMP e ao hidrogênio do carbono 3. Os sinais na região de 2,92 a 3,10 ppm indicam os sinais dos hidrogênios do carbono 2, próximos à função anidrido formada, sinais estes que estão levemente deslocados para campo mais baixo. Estes, anteriormente, apareciam em 2,80 e 3,01 ppm, o que indica a obtenção do anidrido.

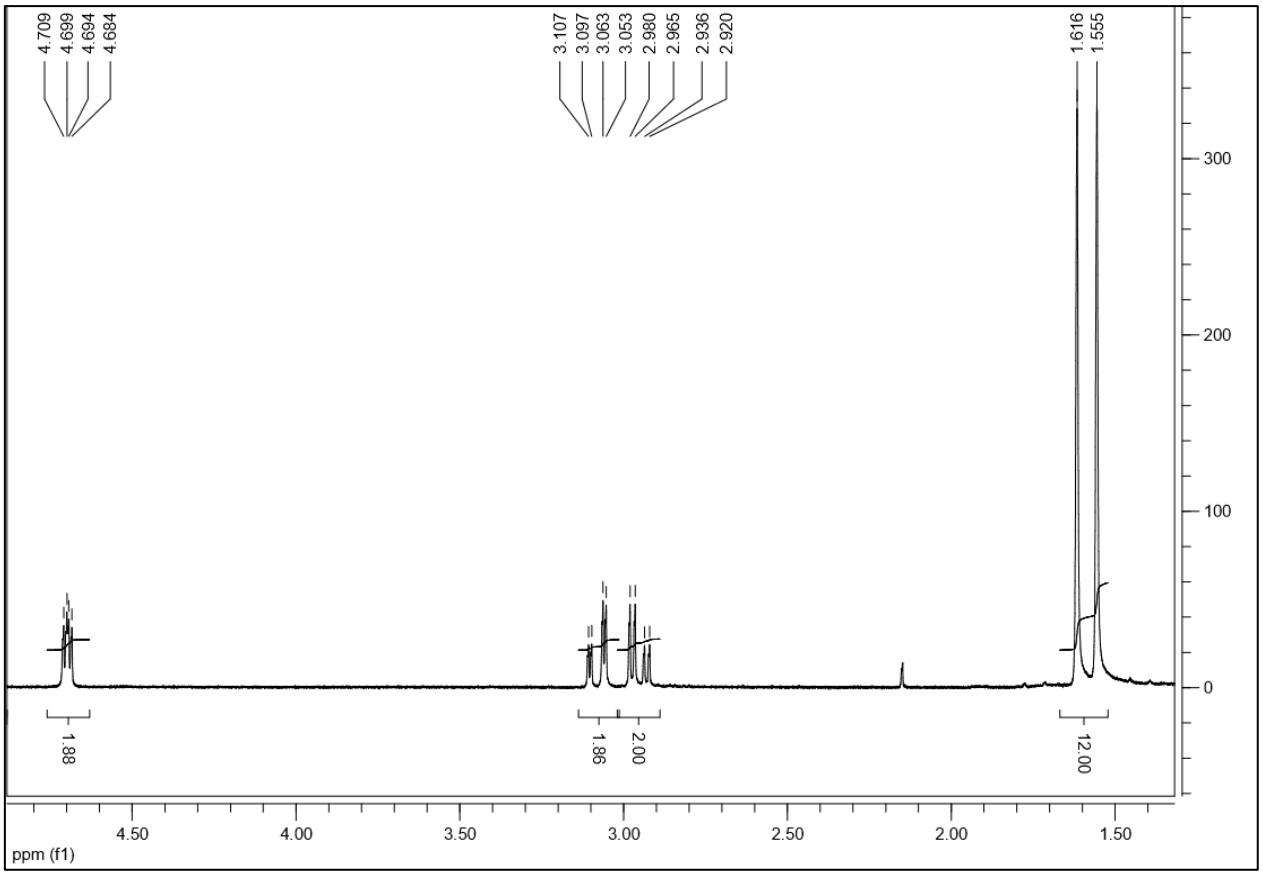




Espectro 5: Espectro no IV do anidrido do AMP.

IV (ν, KBr, cm^{-1})
1818 (ν $_{C=O}$ anidrido); 1750 (ν $_{C=O}$ lactona); 1392 (δ CH_3 angular assimétrica); 1372 (δ CH_3 angular assimétrica); 1136 (δ $_{C-O-C}$ axial de acetal).



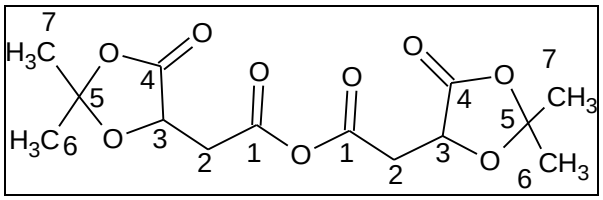


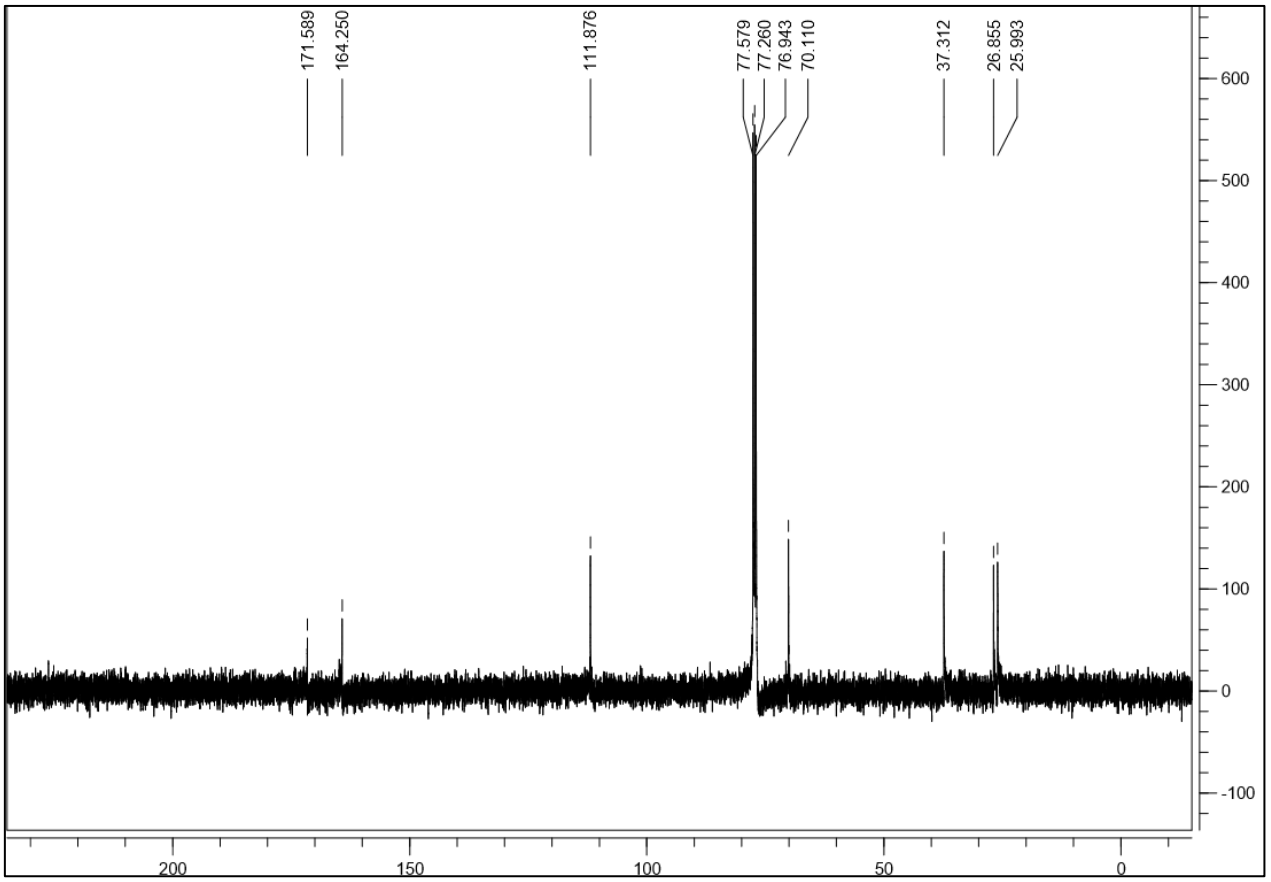
Espectro 6: Espectro de RMN ^{1}H do anidrido do AMP.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 400 MHz, δ
1,55, 1,61 (s, 12H, H_6, H_7); 2,92 (dd, 2H, H_2, J =16 Hz, J = 4 Hz); 3,05 (dd, 2H, H_2, J = 16 Hz, J= 4 Hz); 4,68 (dd, 2H, H_3, J = 8 Hz, J = 4 Hz).

No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 7), os sinais em: 25,99-26,85 ppm (C_6 e C_7), 70,11 ppm (C_3) e 111,87 ppm (C_5), respectivamente, caracterizam o ácido málico protegido. O carbono C_2, próximo à função anidrido, e a carbonila C_4 sofreram

deslocamentos. Anteriormente, esses carbonos apareciam em 35,99 e em 174,57 ppm, sendo deslocados para 37,21 e 171,83 ppm, respectivamente. Além disso, o espectro mostrou a carbonila C_1 deslocada para 164,25 ppm, caracterizando a formação do anidrido do AMP.

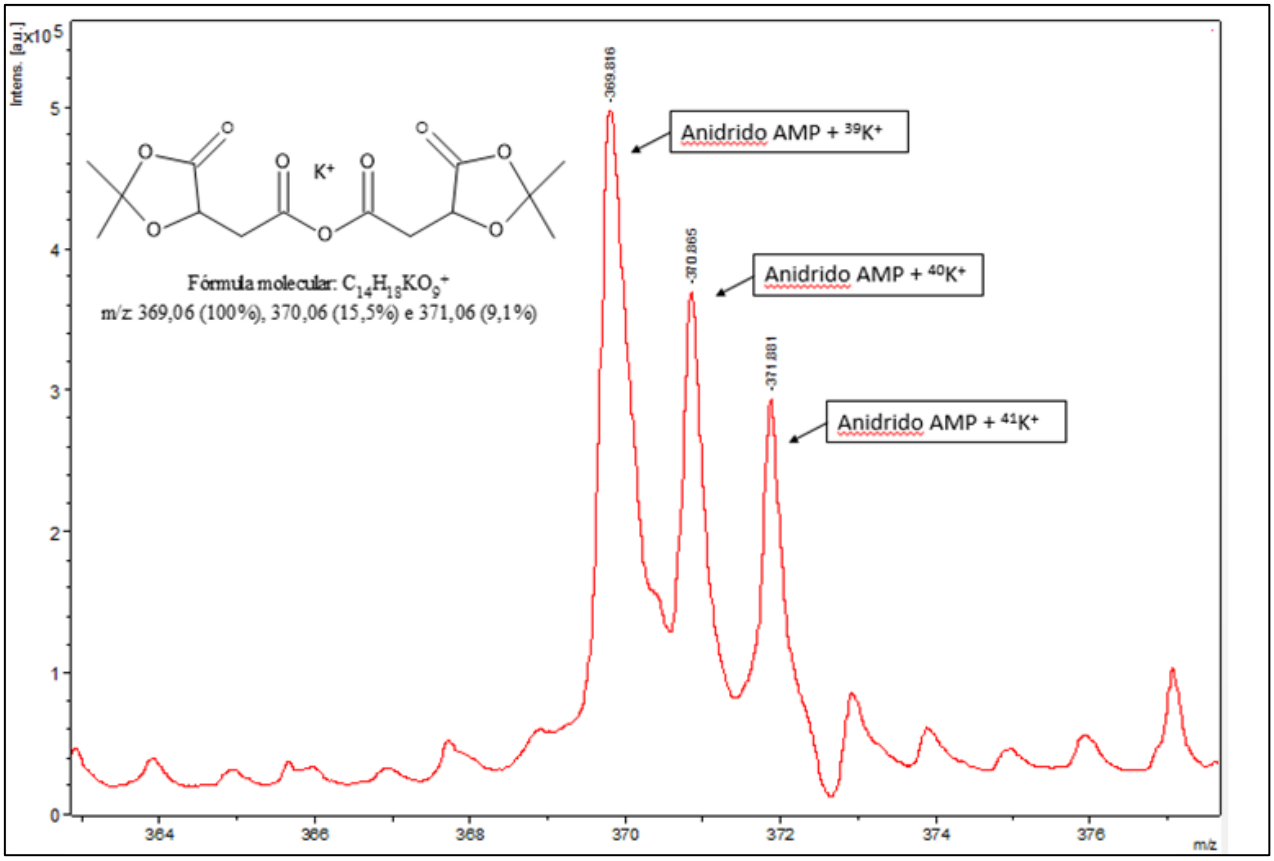




Espectro 7: Espectro de RMN ^{13}C do anidrido do ácido málico protegido.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 100 MHz, δ
77,00 ($CDCl_3$); 25,99 (C_7); 26,85 (C_6); 37,31 (C_2); 70,11 (C_3); 111,87 (C_5); 164,25 (C_1); 171,58 (C_4).

Outra evidência de obtenção do anidrido do ácido málico protegido é o espectro de massas MALDI-ToF no modo positivo (Espectro 8), em que é possível observar o sinal referente à molécula cationizada com potássio em *m/z* 369,81 $[M+K]^+$, bem como os picos em *m/z* 370,86 e 371,88 $[M+K]^+$, relativos aos isótopos K_{40} e K_{41}; o valor calculado para $C_{14}H_{18}O_9K^+$ é 369,06. Portanto, todos esses resultados comprovam a síntese do anidrido do AMP.



Espectro 8: Espectro de massas – MALDI-ToF (+) do anidrido do ácido málico protegido. Matriz: Grafite.

4.3 SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS – MÉTODO DIVERGENTE

Como já mencionado, os dendrímeros podem ser sintetizados por dois métodos principais: método convergente e divergente. A técnica convergente consiste na síntese da ramificação para posterior ligação ao foco central, como se o dendrímero crescesse

de fora para dentro. Contrariamente, a síntese divergente inicia-se com a síntese a partir do núcleo e as ramificações são ligadas sucessivamente ao foco central, com o polímero crescendo de dentro para fora. Neste contexto, o trabalho utilizou tanto a abordagem divergente quanto a convergente. A síntese convergente permite maior controle de síntese dos intermediários obtidos e purificação dos mesmos, mas impede a obtenção de maiores gerações dos dendrímeros de interesse. Em contrapartida, o método divergente permite a obtenção de maior número de gerações. Por essas razões, a síntese foi realizada com a utilização de ambas as abordagens sintéticas.

4.3.1 **Síntese dos intermediários I (foco central e AMP), a partir do anidrido do ácido málico protegido**

Com a síntese do anidrido do AMP, partiu-se para a próxima etapa denominada dendronização, que consiste na síntese do intermediário I. Com o método de dendronização utilizaram-se como focos centrais a propanodiamina e monopentaeritritol.

A propanodiamina é um dos focos centrais propostos para a síntese dos dendrímeros deste estudo. O intermediário IA é composto pela ligação amídica entre a propanodiamina e o ácido málico protegido. O monopentaeritritol (intermediário IE) é um foco central polifuncional e biocompatível, que também, permite a obtenção dos dendrímeros. Estes compostos obtidos, posteriormente, sofrerão a abertura da lactona (proteção) e a ligação com o composto bioativo, 3-hidroxiflavona, através da ligação éster. Desta forma, propôs-se a obtenção do dendrímero de primeira geração de 3-hidroxiflavona com propanodiamina e monopentaeritritol, como focos centrais, pela abordagem divergente através do método de dendronização a partir do anidrido do AMP. O mecanismo da reação pode ser visualizado na Figura 51.

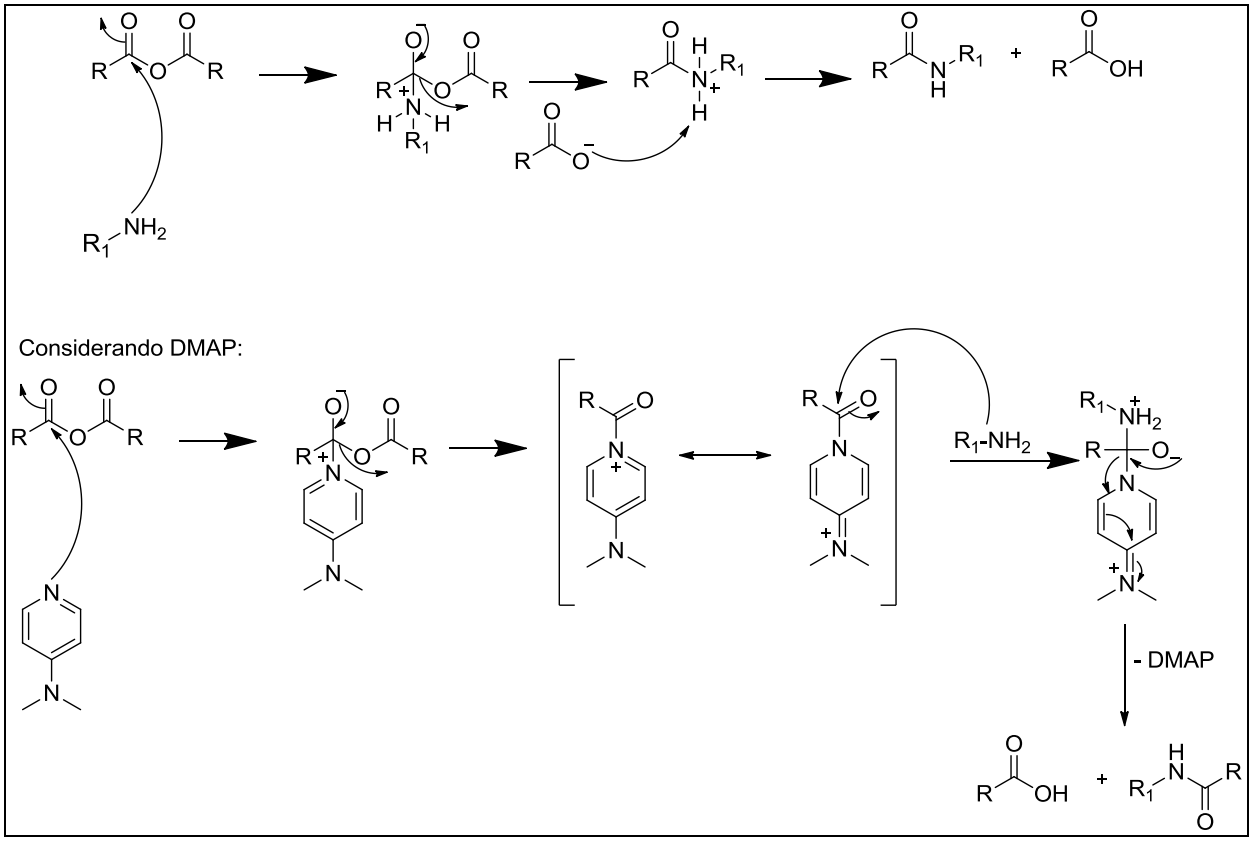


Figura 51: Mecanismo de reação para a síntese de amidas, a partir de anidridos. O mecanismo é análogo para a formação de ésteres (adaptado de ALLINGER et al., 1978; NEISES, STEGLICH, 1978 e SOLOMONS, FRYHLE, 2001).

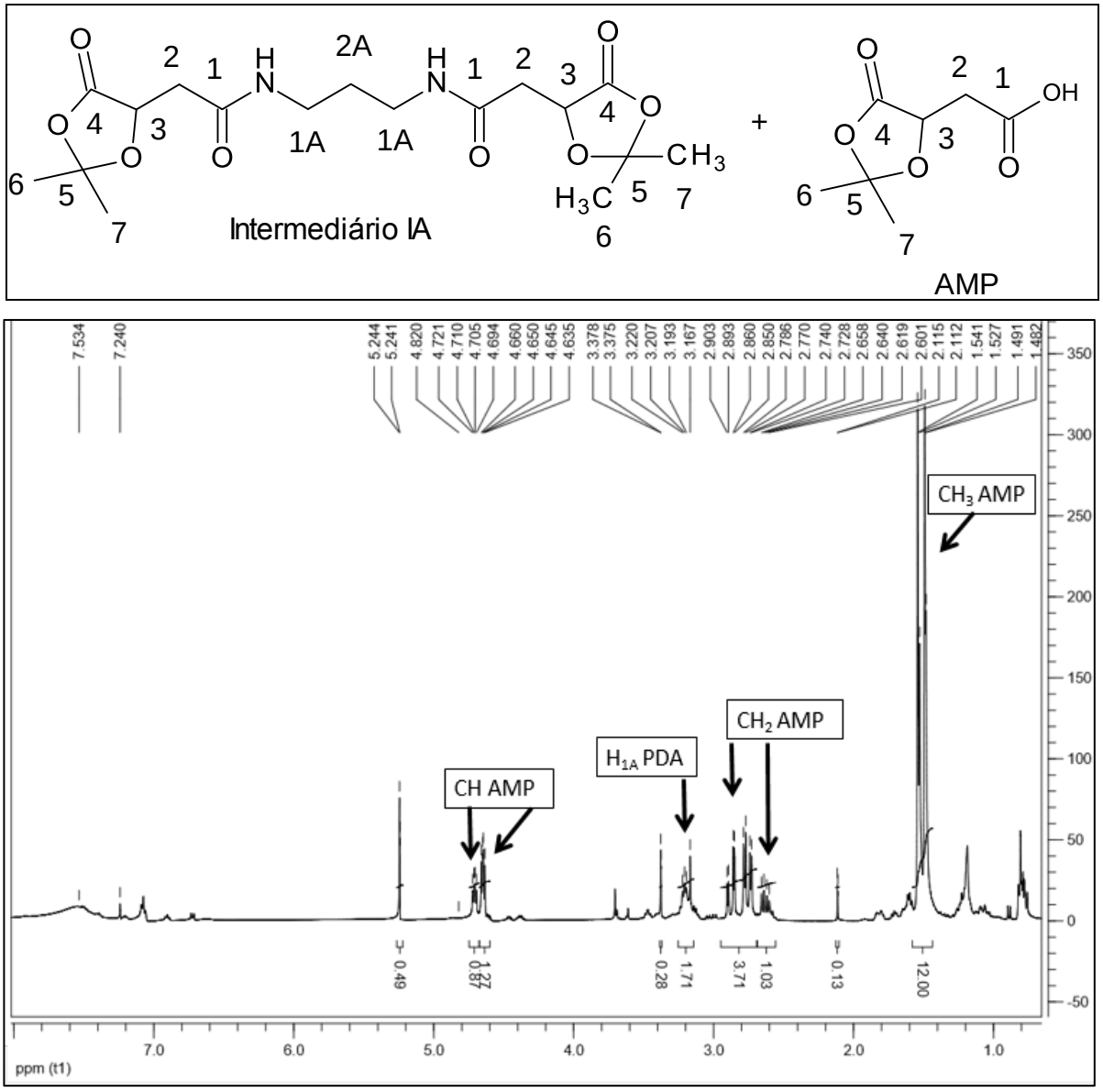
4.3.1.1 Método A – experimentos A1, A2 e A3

No experimento A1, a proporção molar utilizada foi de 1:2,5 do foco central (propanodiamina) e o anidrido do AMP, respectivamente. Com o intuito de reproduzir o experimento de acordo com a experiência do grupo do Professor Dr. Scott M. Grayson, utilizou-se éter etílico como solvente para extração, que, entretanto, não se mostrou adequado para a purificação do produto de interesse. No experimento A2, seguindo o artigo referência (Ihre et al., 2001), utilizou-se piridina como solvente da reação, que não se mostrou um bom solvente para os reagentes. Além disso, este solvente é difícil de remover e dificulta a purificação do composto de interesse. Neste contexto, a utilização de piridina não foi adequada para a dendronização.

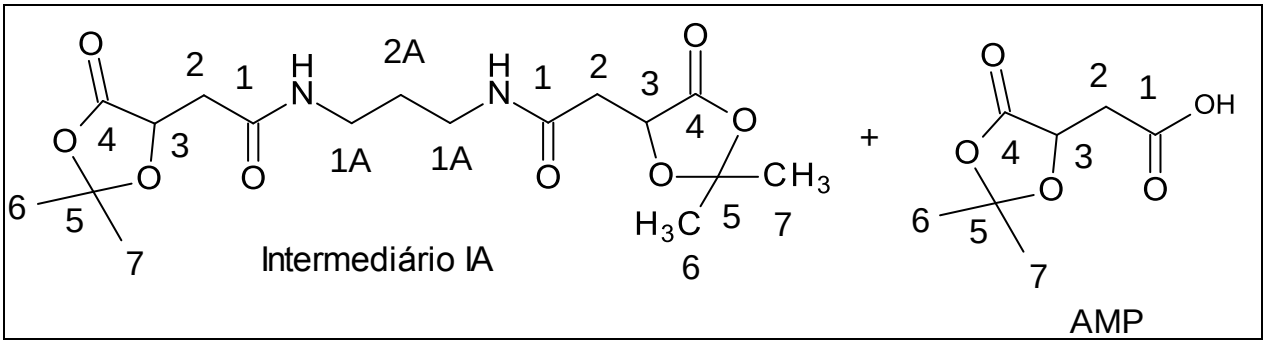
O experimento A3 consiste na utilização apenas de diclorometano como solvente para a reação e extração. O RMN ^{1}H (Espectro 9) mostrou indícios de obtenção do

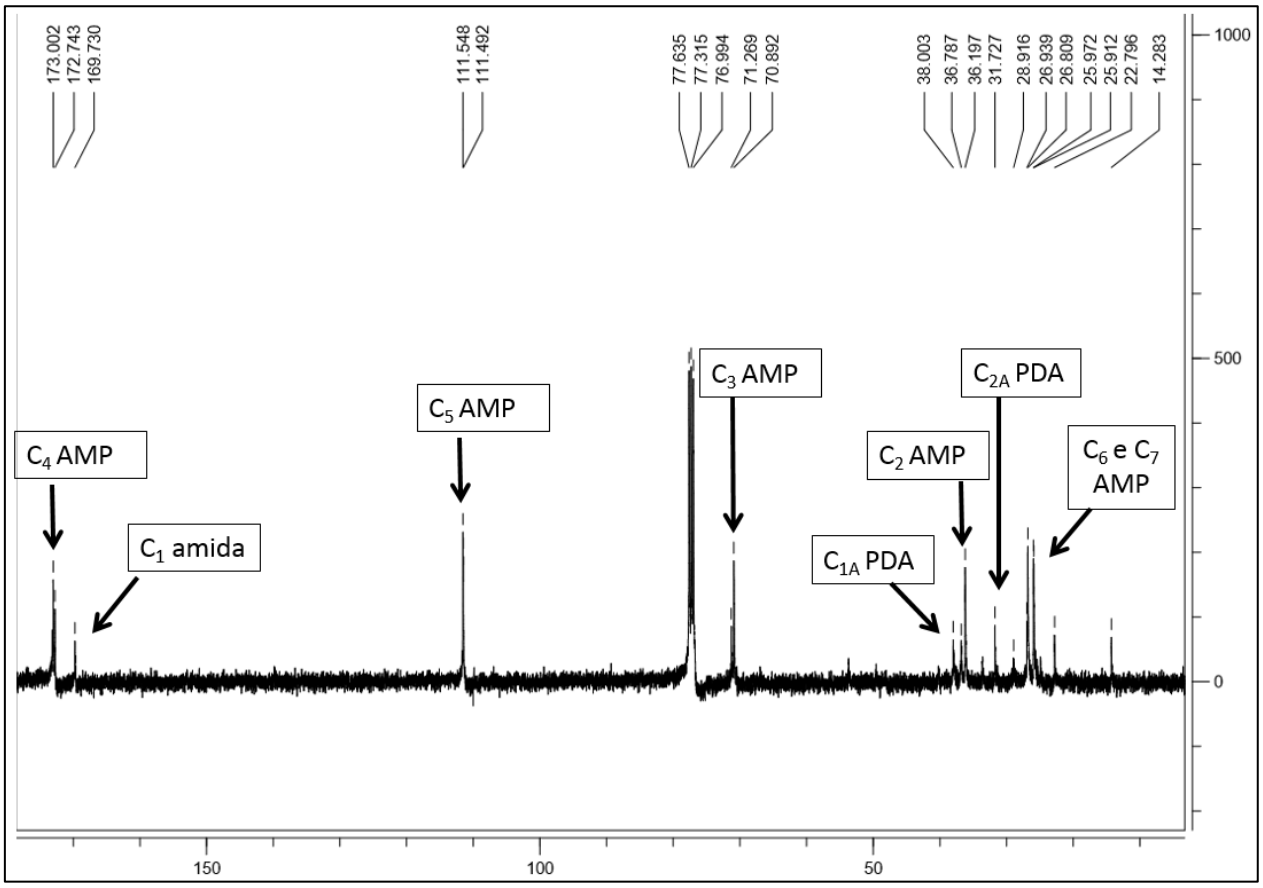
produto desejado, devido à presença dos sinais em 1,48 e 1,49 ppm, e 1,52 e 1,54 ppm, referentes aos hidrogênios metílicos da lactona do ácido málico protegido. Entretanto, observa-se duplicação dos sinais relativos ao espaçante, o que mostra mistura de compostos formada pelo intermediário IA (composto de interesse) e o ácido málico protegido, material de partida. Ainda com relação ao espaçante, observam-se sinais entre 2,60 e 2,90 ppm e próximos de 4,60 a 4,82 ppm, que caracterizam H_2 e H_3 do ácido málico, mas, novamente, esses sinais estão duplicados no espectro. Adicionalmente, os sinais de H_{1A} da propanodiamina são visualizados na região entre 3,16 e 3,22 ppm. Portanto, com o experimento A3 foi possível sintetizar o intermediário IA, no entanto, esta metodologia não foi eficiente para a purificação do mesmo.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 10) é outra evidência da síntese do intermediário IA impuro. Este espectro mostra os carbonos das metilas da proteção em 25-26 ppm e, também, $C_{2,}$ C_3 e C_5 do espaçante em 36,19-36,78 ppm, em 70,89 e 71,26 ppm e em 111,49 e 111,54 ppm. No entanto, os sinais estão duplicados, mostrando a mistura formada pelo produto de interesse e o AMP. A respeito do foco central, observam-se os carbonos em 38,00 e 28,91 ppm, referentes aos carbonos 1A e 2A da propanodiamina, respectivamente. A maior evidência é a presença dos sinais em 169,73 ppm, em campo mais alto, que caracteriza a função amida formada. A carbonila da lactona também aparece duplicada nesse espectro, como os sinais em 172,74 e 173,00 ppm, revelando mais uma vez ter se obtido mistura. Considerando-se todas essas evidências, o intermediário formado entre a propanodiamina e o ácido málico protegido foi obtido através do experimento A3, ainda que impuro. Outros sinais ainda são observados em 14,28, 22,79 e 31,72 ppm, que podem estar relacionados aos carbonos do hexano, utilizado no processo de precipitação do material.



Espectro 9: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre propanodiamina e anidrido do ácido málico protegido, obtido com o uso do método A3. AMP – ácido málico protegido; PDA-propanodiamina.

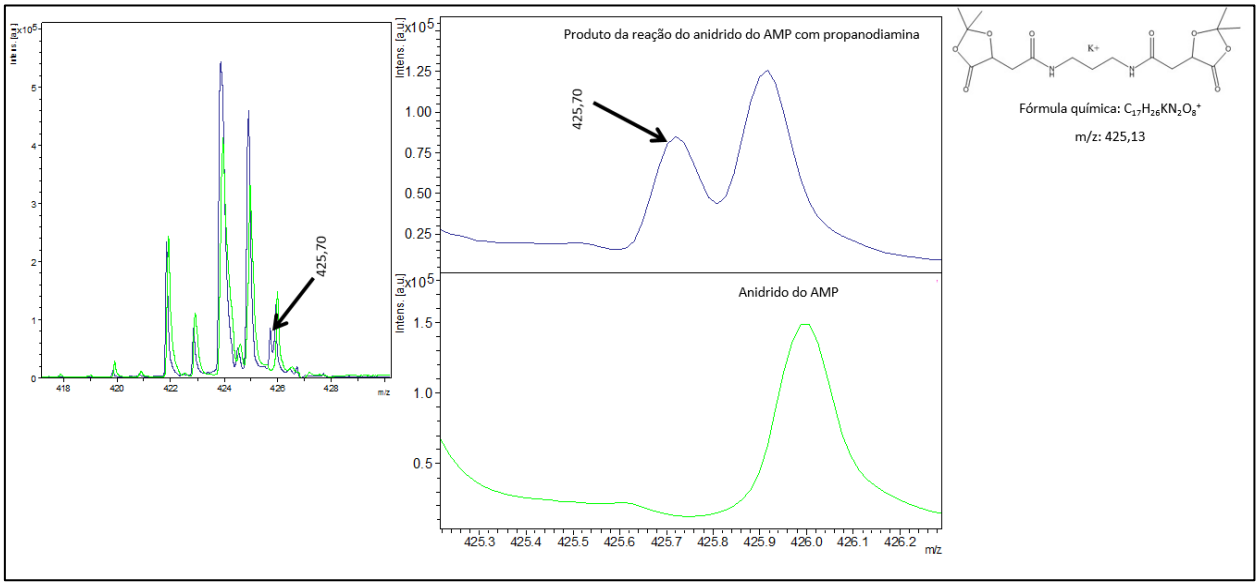




Espectro 10: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre propanodiamina e anidrido do ácido málico protegido, obtido com o uso do método A3. AMP – ácido málico protegido; PDA-propanodiamina.

Na análise por espectrometria de massas no modo positivo (EM-MALDI-ToF-(+)) (Espectro 11), observou-se um pico referente à molécula cationizada com potássio em *m/z* 425,70 $[M+K]^+$, cujo valor calculado para $C_{17}H_{26}N_2O_8K^+$ é 425,13. Não é possível observar a presença do ácido málico protegido no MALDI-ToF, porque esta técnica é

utilizada para compostos com massa molecular acima de 200 u.m.a. e a massa molecular do AMP é 174 u.m.a.

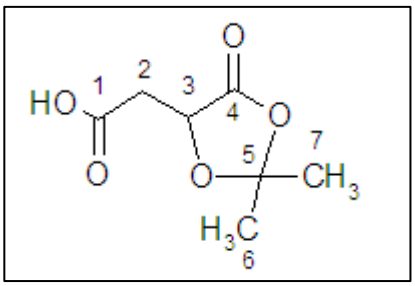


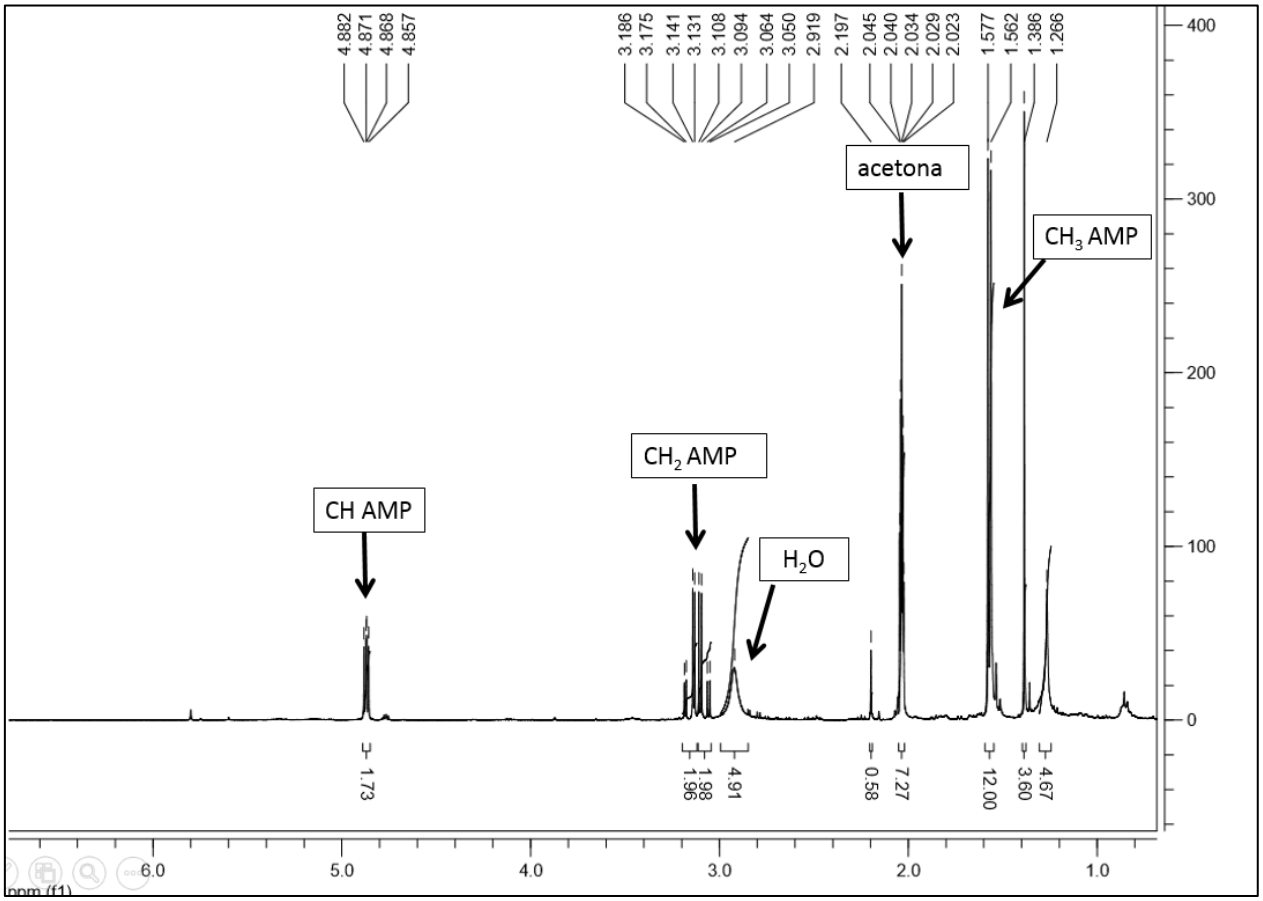
Espectro 11: Espectro de massas – MALDI-ToF (+) do produto impuro da reação entre propanodiamina e anidrido do ácido málico protegido, obtido com o uso do método A3. Matriz: Grafite.

4.3.2.2 Método B

O método B, utilizado para a síntese do intermediário IA, consiste no uso de temperatura para catalisar a reação entre o anidrido do ácido málico e a propanodiamina, para formação da respectiva amida (Figura 51).

O RMN de ^1H (Espectro 12) não mostrou a presença dos sinais relativos à propanodiamina. Neste espectro, observam-se os sinais característicos do ácido málico protegido em 1,56 ppm, relacionados aos hidrogênios das metilas e, também, os sinais na região de 3 ppm e em 4,80 ppm, que correspondem aos hidrogênios dos C_2 e C_3 do AMP, respectivamente. Portanto, este método não foi eficiente para a síntese do intermediário IA. Os sinais em 2,05 ppm e em 2,91 pm são referentes aos hidrogênios do solvente utilizado no preparo da amostra, ou seja, acetona e a impureza água presente na acetona, respectivamente.





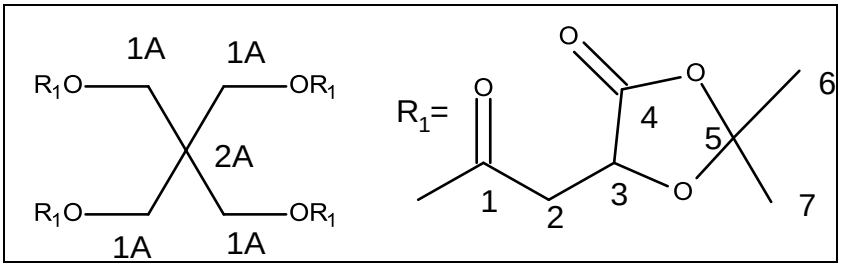
Espectro 12: Espectro de RMN ^{1}H [400 MHz, $(CD_3)_2CO$] do produto impuro da reação entre propanodiamina e ácido málico protegido, obtido com o uso do método B. AMP – ácido málico protegido.

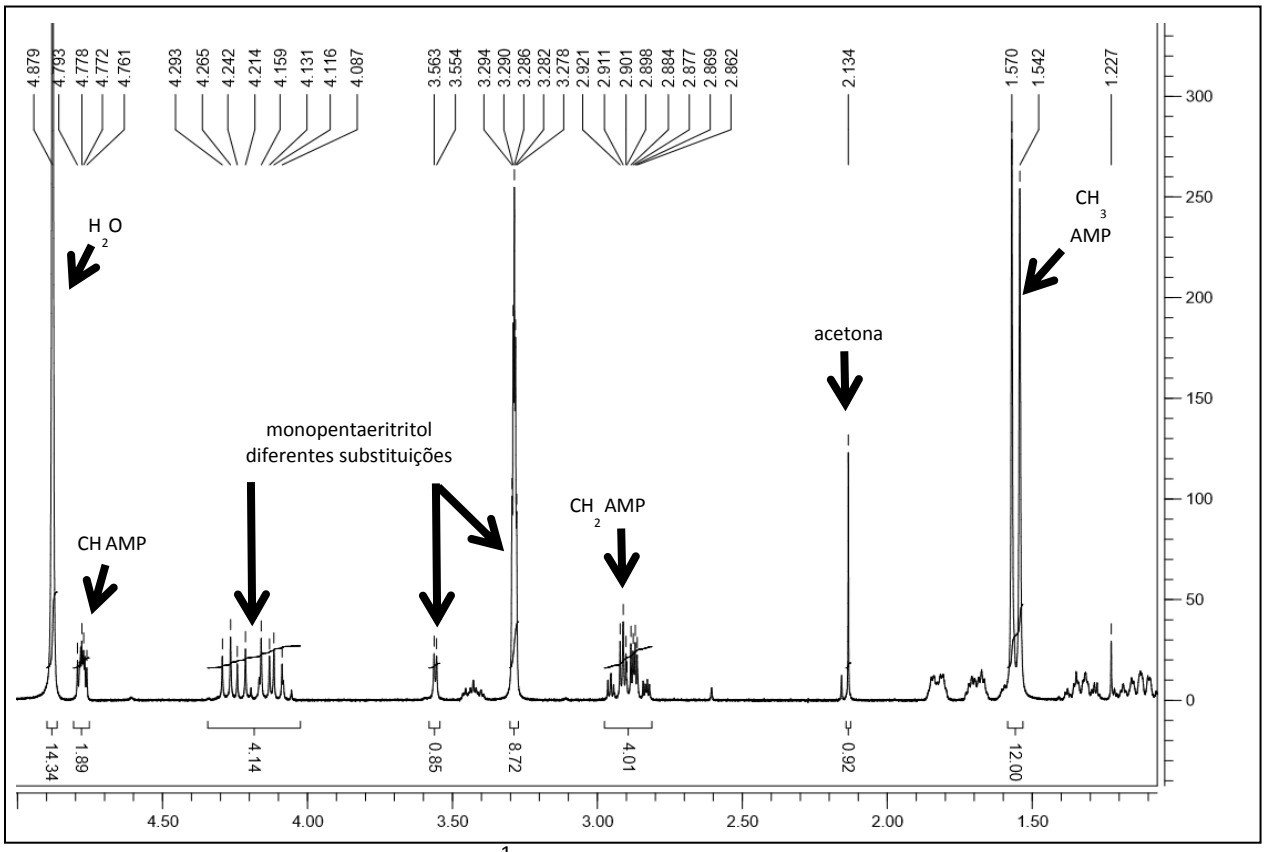
4.3.2 **Síntese do intermediário IE (núcleo monopentaeritritol), a partir do anidrido do AMP**

Diante das dificuldades enfrentadas com o uso do método de dendronização (Figura 51), utilizando o anidrido do ácido málico protegido e a propanodiamina, utilizou-

se o monopentaeritritol, como foco central. O monopentaeritritol, como núcleo em dendrímeros, é amplamente utilizado no grupo do Professor Dr. Scott M. Grayson. No método C, utilizou-se a proporção molar entre monopentaeritritol e ácido málico protegido de 1:5, respectivamente. O excesso do anidrido foi utilizado com o intuito de obter o máximo de substituições nos quatro grupos hidroxílicos.

O espectro RMN ^{1}H (Espectro 13) do produto obtido mostrou evidências da obtenção do intermediário de interesse. O espectro revela sinais na região de 1,54-1,57 ppm, que indicam os hidrogênios do grupo metílico do ácido málico protegido. Ainda em relação ao espaçante, o espectro apresenta os hidrogênios em 2,86 e 2,92 ppm e, também, em 4,76-4,79 ppm, que correspondem os hidrogênios de C_2 e C_3. Quanto ao foco central, observa-se a presença dos sinais em 3,27-3,29 ppm, indicando os hidrogênios 1A do produto tetrassubstituído. No entanto, ainda com relação ao núcleo, observaram-se os sinais em 3,50 e entre 4,08-4,29 ppm, também, relacionados aos hidrogênios do 1A do monopentaeritritol, sendo que o excesso de sinais nestas regiões sinaliza a obtenção de produtos com diferentes substituições.

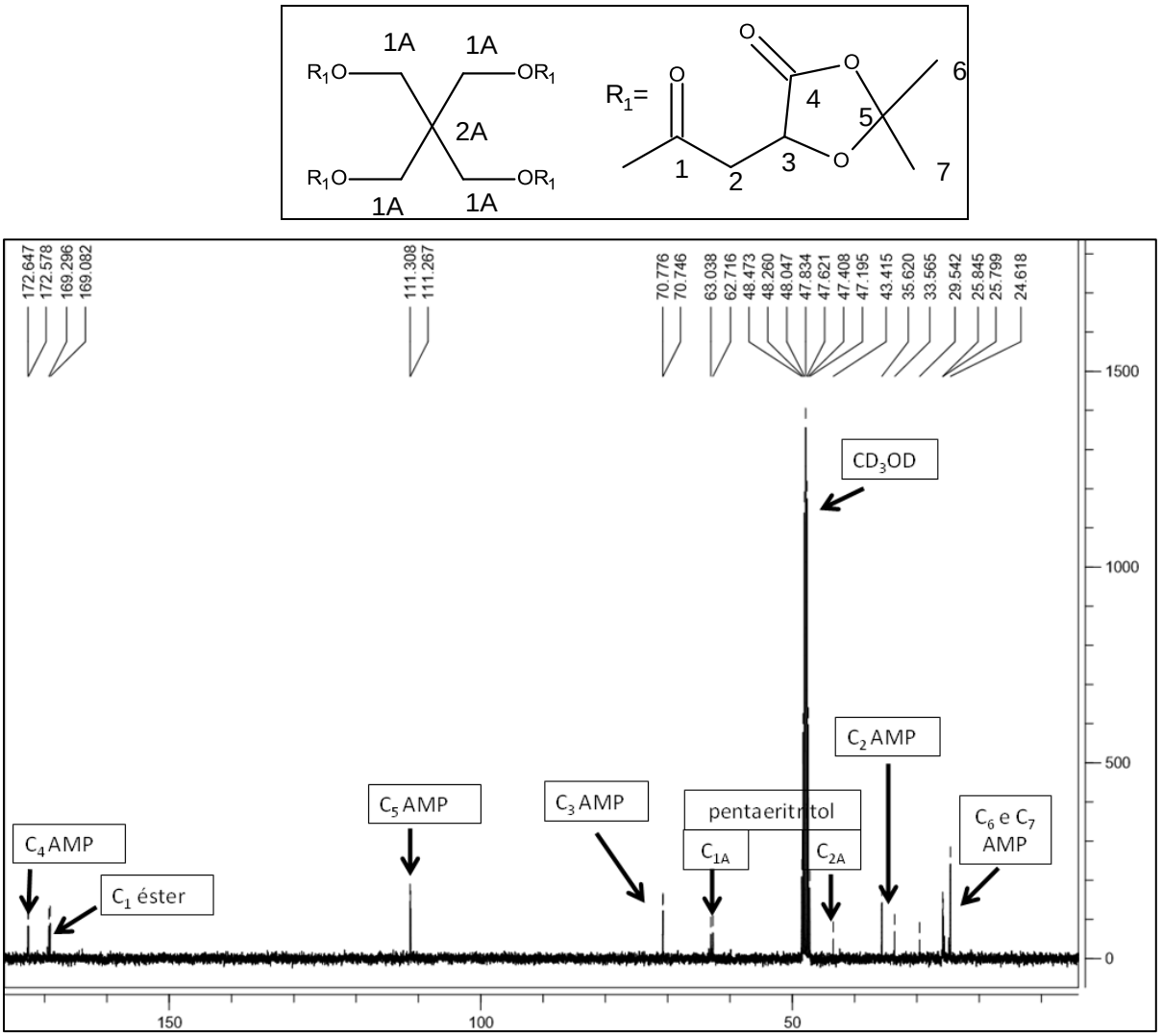




Espectro 13: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) do produto impuro da reação entre monopentaeritritol e anidrido do ácido málico protegido, obtido com o uso do método C. AMP – ácido málico protegido.

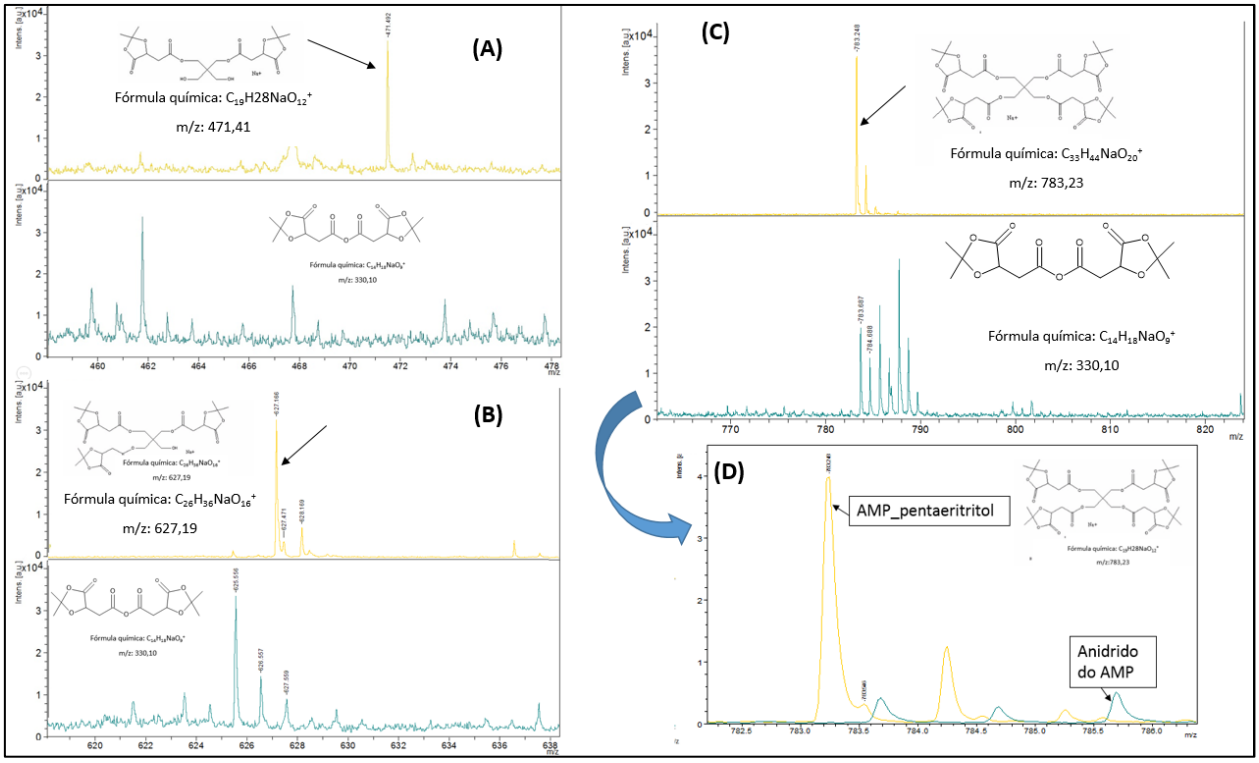
Adicionalmente, o espectro de RMN ^{13}C (Espectro 14) reafirma a obtenção do intermediário IE, com diferentes substituições. O RMN ^{13}C mostrou os sinais dos carbonos do AMP em 25-26 ppm referente às metilas, em 33-35 ppm, 70 e 111 ppm, correspondentes aos carbonos 2, 3 e 5 e também, das carbonilas da lactona em 172 ppm. O principal indício de obtenção do éster de interesse são os sinais em 169,08 e 169,29 ppm, em campo mais alto, que caracteriza a carbonila do éster formado entre

o monopentaeritritol e o ácido málico protegido. Todos os sinais relativos ao ácido málico mostraram-se duplicados, o que demonstra a presença de intermediários com diferentes substituições. Em adição, observam-se no espectro os carbonos 1A e 2A do monopentaeritritol em 62,71 e 63,03 ppm, respectivamente. Portanto, sintetizou-se o intermediário IE com esta metodologia. No entanto, obteve-se este intermediário com dieferentes substituições.



Espectro 14: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do produto impuro da reação entre monopentaeritritol e anidrido do ácido málico protegido, obtido com o uso do método C. AMP – ácido málico protegido.

O espectro de massas MALDI-ToF (+) (Espectro 15), também, mostrou a obtenção do intermediário 1E com diferentes substituições. Observaram-se no MALDI-ToF, os sinais relativos à molécula cationizada com sódio em *m/z* 471,49; 627,16 e 783,24 $[M+K]^+$, que, respectivamente, correspondem ao intermediário IE com duas, três e quatro substituições. Esses compostos apresentam *m/z* calculado para os respectivos intermediários di-, tri- e tetra-substituídos de 471,15; 627,19 e 783,23 $[M+K]^+$. Desta forma, este método é eficiente para a síntese deste intermediário, no entanto, o experimento necessita de aprimoramento para otimização da síntese deste intermediário com as 4 substituições possíveis.



Espectro 15: Espectro de massas – MALDI-ToF (+) do produto impuro da reação entre monopentaeritritol e anidrido do ácido málico protegido, obtido com o uso do método C. A – intermediário monopentaeritritiol-AMP com duas substituições; B – intermediário monopentaeritritiol-AMP com três substituições; C – intermediário monopentaeritritiol-AMP com quatro substituições; D – sobreposição dos espectros do monopentaeritritiol-AMP com quatro substituições (amarelo) e anidrido do AMP (azul). Matriz: Radical Galvinoxil livre.

4.3.3 **Síntese do intermediário I, partindo do ácido málico protegido (foco central e AMP) – métodos D, E, F, G e H**

4.3.3.1 Método D – método do anidrido misto

Um dos métodos utilizados para obtenção do intermediário IA foi a síntese de anidridos mistos com *N*-metilmorfolina (como catalisador) e cloroformato de etila, como condensante.

O método D utilizou a proporção molar de 1:2 para propanodiamina e ácido málico protegido, respectivamente, devido à possibilidade de ocorrerem duas substituições de ácido málico protegido neste foco central. Após 18 horas de reação, observou-se na cromatografia em camada delgada a formação de mancha com valor de R*ƒ* igual a 0,53, que poderia estar relacionada ao intermediário IA. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 16) apresentou sinais da presença de ácido málico protegido na região de 1,50 ppm, referentes aos hidrogênios das metilas da lactona, sinais em 2,60 ppm relacionados aos hidrogênios do C_2 e multipleto entre 4,42 e 4,46 ppm relativo aos hidrogênios do C_3, porém ausência de sinais de propanodiamina.

No mecanismo desta reação (Figura 52), há a formação de um intermediário de síntese, o anidrido misto, que deveria ter sofrido ataque nucleofílico pela propanodiamina. Entretanto, a substituição não ocorreu e o que se observa no espectro é a presença do anidrido misto que não reagiu. Os sinais entre 1,00 e 1,29 ppm e próximos a 3,80 ppm, caracterizam, respectivamente, os hidrogênios de CH_3 e de CH_2 (ligados ao oxigênio da função anidrido), que estão presentes neste intermediário de síntese. Portanto, estes resultados mostram que o método com o uso de cloroformato de etila não foi eficiente para a síntese do intermediário formado entre propanodiamina e ácido málico protegido. As duas carbonilas apresentam eletrofilicidade análoga e, portanto, não há a seletividade que o método exige.

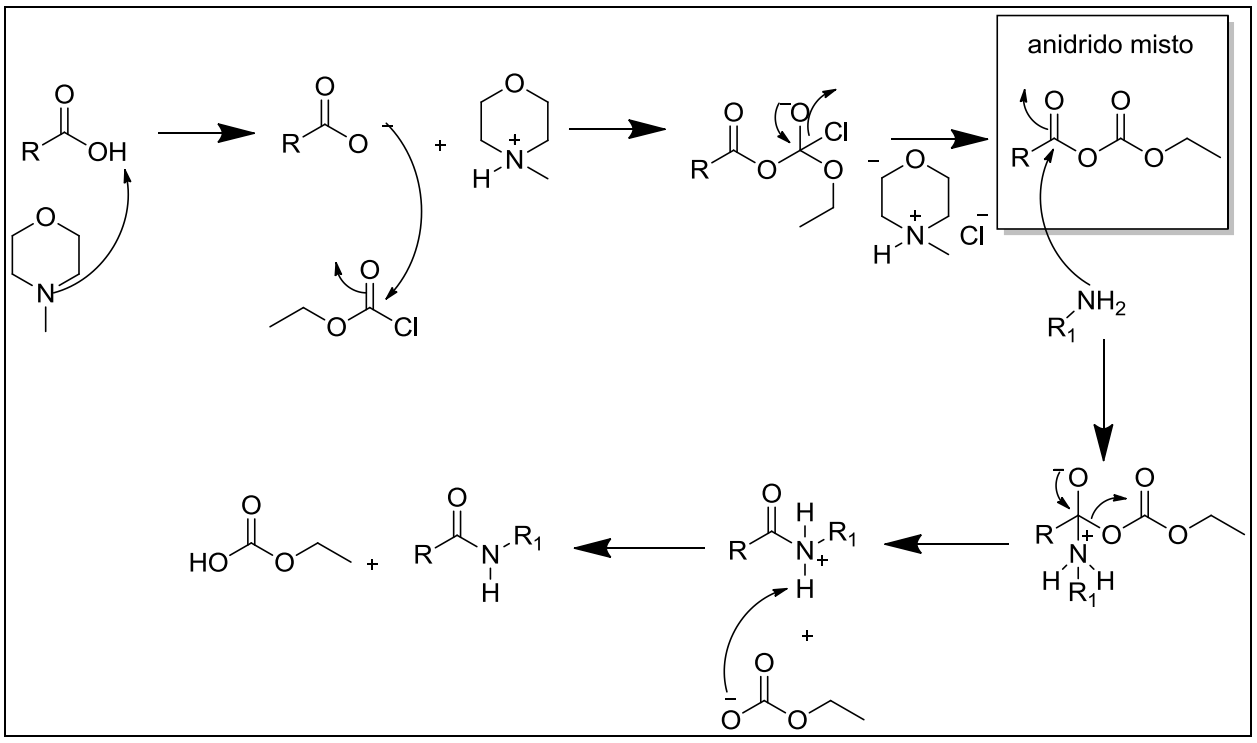
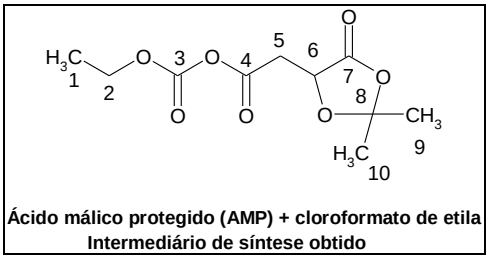
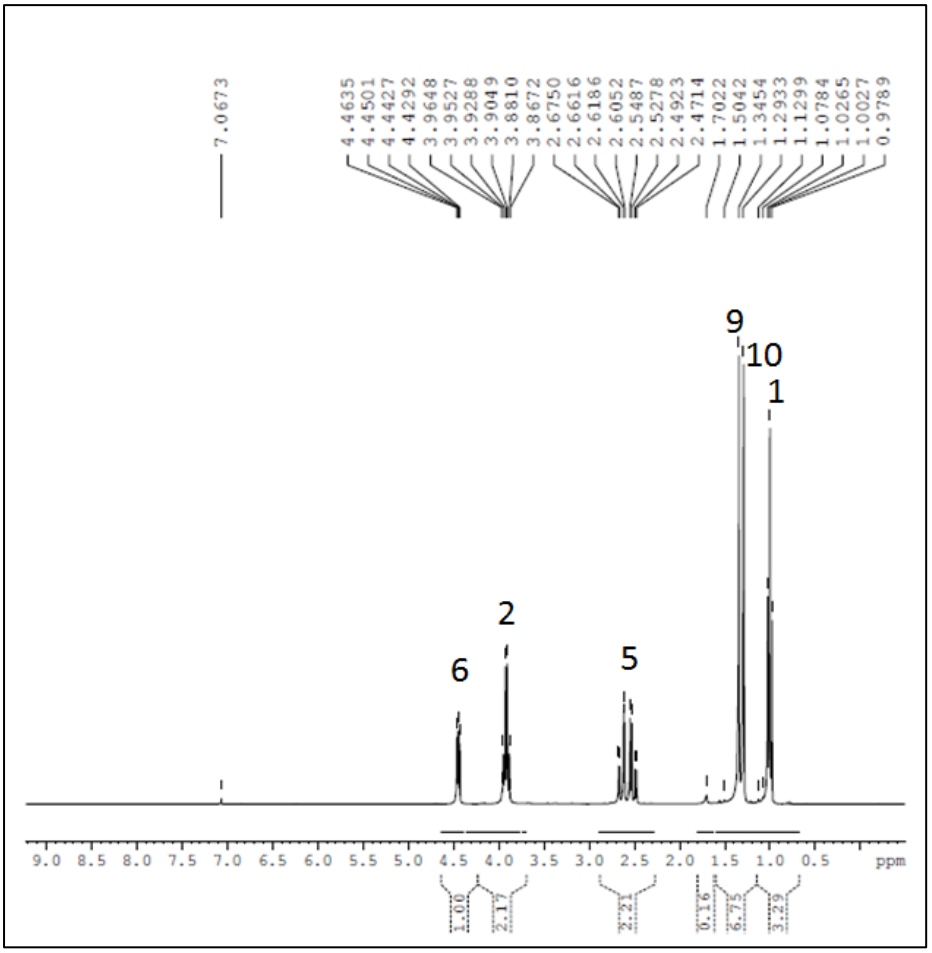


Figura 52: Mecanismo de reação para a síntese de amidas, a partir de anidridos mistos. O mecanismo é análogo para a formação de ésteres.



Ácido málico protegido (AMP) + cloroformato de etila
Intermediário de síntese obtido



Espectro 16: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da tentativa de obtenção do intermediário IA com o método D, que utiliza cloroformato de etila e *N*-metilmorfolina.

4.3.3.2 Método E – utilizando cloretos de acila

No método E utilizou-se propanodiamina, como foco central, que leva à síntese do intermediário IA (intermediário IA - experimentos E1 a E6).

Os experimentos E são caracterizados pelo uso de cloreto de acila para obtenção das amidas de interesse. No experimento E1, utilizou-se a proporção molar entre propanodiamina e o ácido málico protegido de 1:2, respectivamente, com o intuito

de obter a substituição nos dois grupos amínicos. O mecanismo das reações com cloretos de acila, a partir dos cloretos de tionila e oxalila, é apresentado na Figura 53.

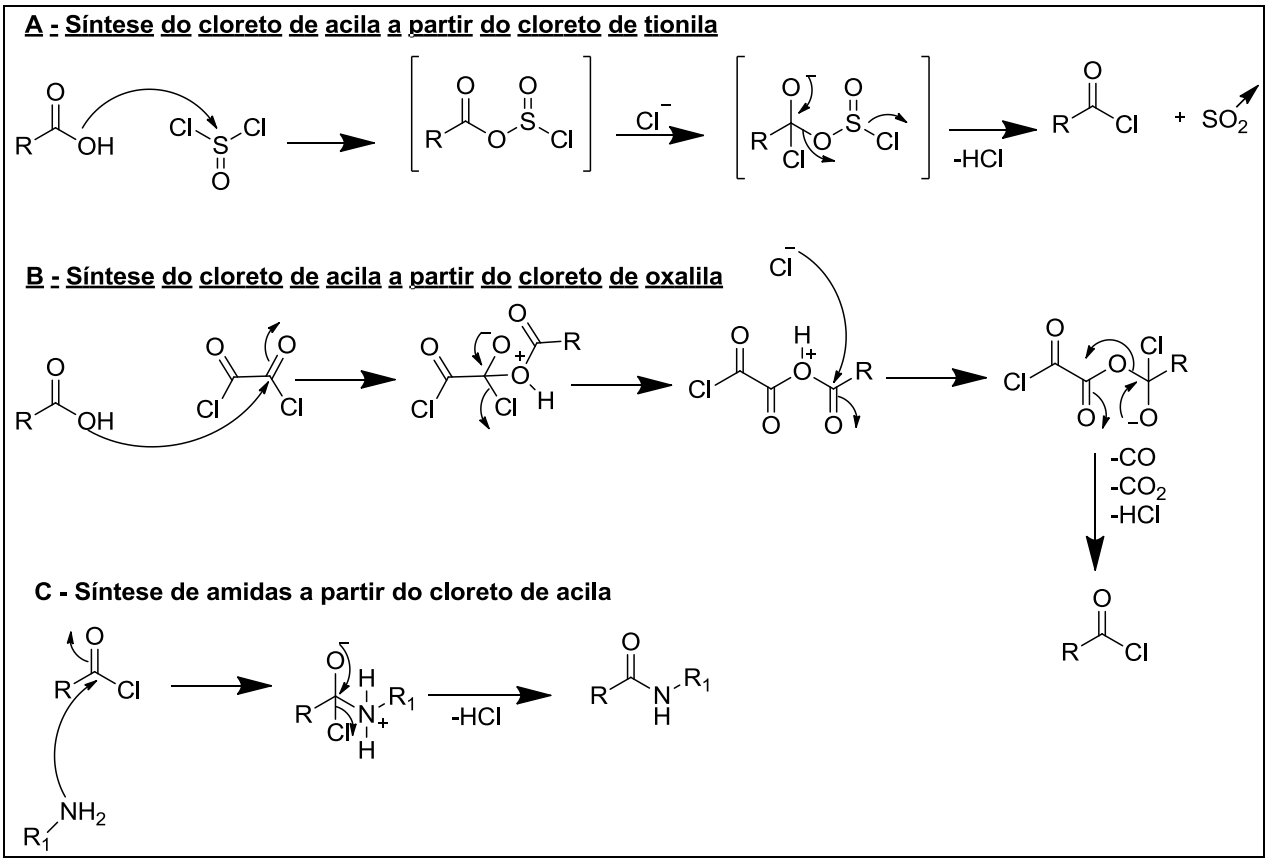


Figura 53: Mecanismo de reação para a síntese de amidas, a partir de cloretos de acila. O mecanismo é análogo para a formação de ésteres (adaptado de ALLINGER et al., 1978).

Para o método E1, a trietilamina foi adicionada no momento da formação do cloreto de ácido, ou seja, concomitantemente ao ácido málico protegido e ao cloreto de tionila, como aceptor do HCl formado. Além disso, neste experimento, extraiu-se o conteúdo reacional três vezes com solução saturada de cloreto de sódio. Após a reação, a placa cromatográfica do produto bruto mostrou a formação de quatro manchas, duas delas correspondentes aos materiais de partida propanodiamina e ácido málico protegido, que estavam, ainda, muito pronunciadas na CCD com R*f* de 0,15 e 0,23, respectivamente. Ademais, as outras duas manchas apresentavam os seguintes

R*f* 0,79 e 0,92, indicativos da formação do intermediário IA de interesse, possivelmente com diferentes substituições. Os espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C (não apresentados) mostraram, também, excesso de sinais referentes a impurezas, o que indicou a dificuldade da purificação deste composto. Portanto, esse experimento não foi o mais adequado para a síntese do intermediário IA com cloreto de tionila.

Neste contexto, o experimento E2 foi realizado com a substituição do aceptor de próton (trietilamina) pelo próprio foco central em excesso. Nas primeiras horas de reação, a CCD apresentava a formação de mancha mais apolar que os materiais de partida como R*f* equivalente a 0,79, similar a uma das manchas apresentadas na cromatografia do experimento E1, indicando a obtenção do intermediário formado entre a propanodiamina e o ácido málico protegido. Entretanto, após 19 horas de reação, esta mancha não foi mais observada na placa cromatográfica, o que revela que, provavelmente, houve a degradação do composto de interesse nesta condição reacional. Devido a este problema, realizou-se o experimento E3, que consiste na manutenção das condições reacionais do experimento E2 (substituição de trietilamina por propanodiamina em excesso), porém com tempo reacional de 6 horas.

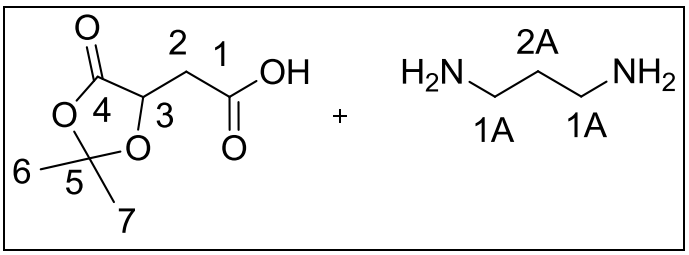
A CCD desta reação mostrou a formação da mesma mancha apresentada anteriormente, no experimento E2, com R*f* de 0,79. No entanto, apesar dos indícios observados na cromatografia em camada delgada, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 17) mostrou apenas a mistura física dos materiais de partida: hidrogênios das metilas do ácido málico protegido na região de 1,50 ppm; sinais em 2,80-3,00 e em 4,70 ppm, que correspondem aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do espaçante. Os principais indícios de que o intermediário IA não foi obtido são os sinais característicos da propanodiamina, sinal pronunciado em 1,60 ppm relativo aos hidrogênios do carbono 1A, que não sofreram deslocamento, bem como os hidrogênios do carbono 2A em 1,15 ppm. Portanto, o experimento E3, que utilizou propanodiamina, como foco central e, também, como aceptor de próton não foi bem-sucedido para a síntese do intermediário IA.

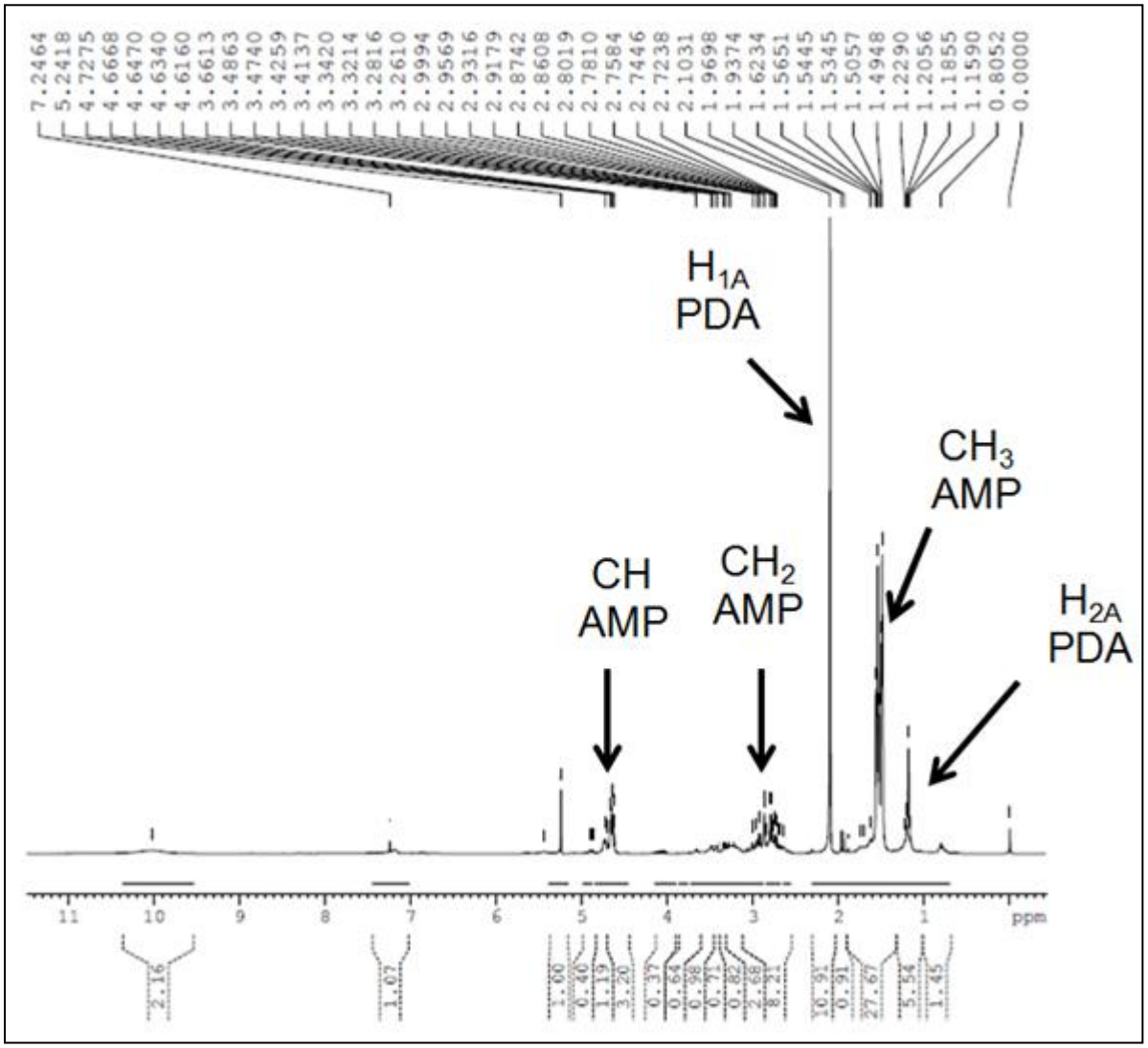
Para o experimento E4, a proporção molar de ácido málico protegido e propanodiamina foi de 4:1, respectivamente, para promover o máximo de substituição possível no intermediário IA. Além disso, adicionou-se o dobro de trietilamina para

garantir que todo o ácido clorídrico formado na reação fosse neutralizado pelo aceptor de próton, impedindo a degradação do composto sintetizado.

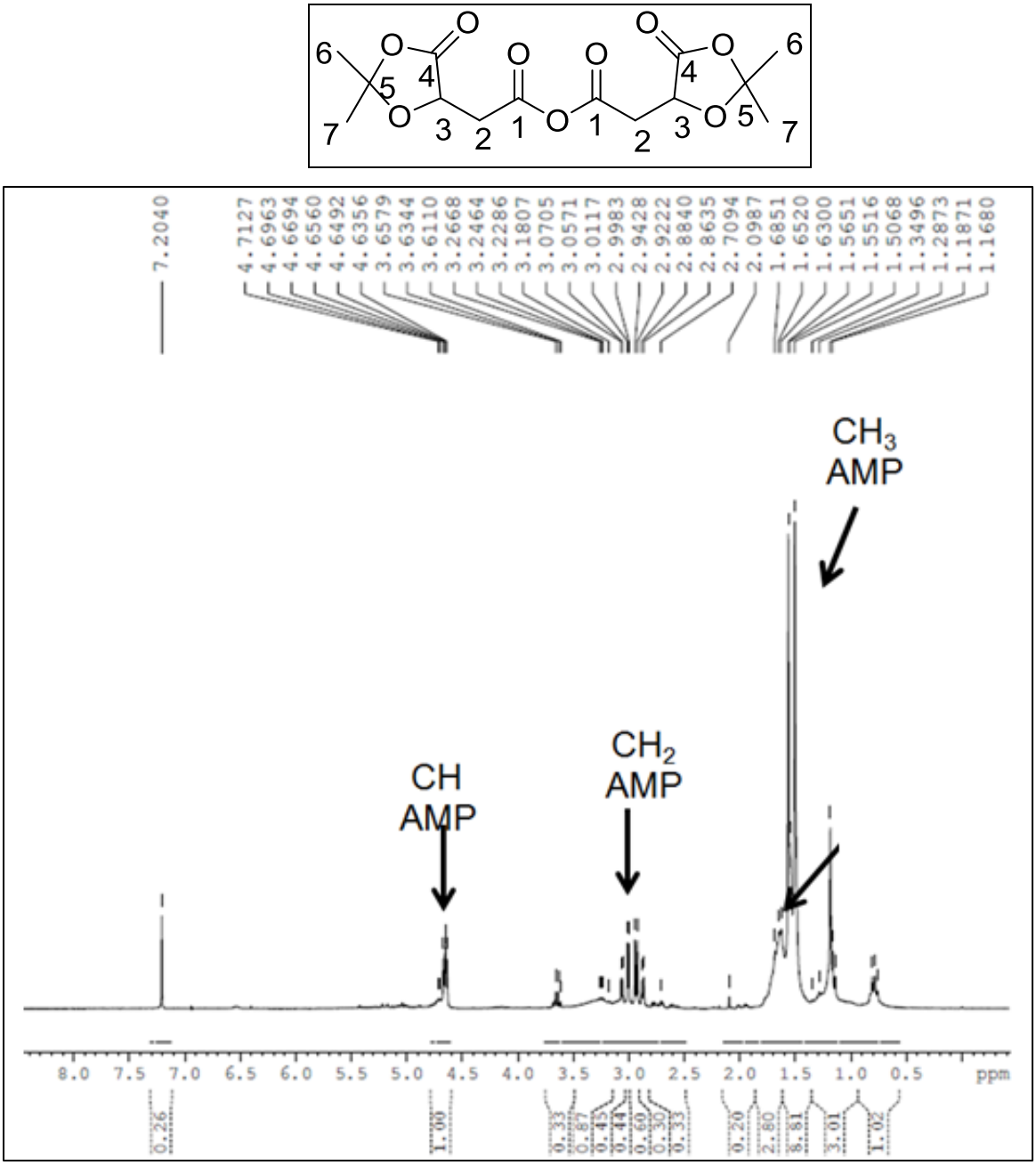
Após 22 horas de reação, a cromatografia em camada delgada do composto obtido revelou mancha com R*f* 0,92, que pode estar relacionada à formação do composto de interesse, pois apresenta R*f* distinto dos materiais de partida (propanodiamina e ácido málico protegido, respectivamente R*f* 0,15 e 0,23).

O espectro RMN ^{1}H (Espectro 18) do produto obtido mostrou apenas a presença dos sinais do ácido málico protegido. O espectro revelou sinais na região de 1,50 ppm, que indicam os hidrogênios do grupo metílico do ácido málico protegido. Ainda em relação ao espaçante, o espectro apresenta os hidrogênios em 2,80 e 3,00 ppm e, também, em 4,70 ppm, que correspondem os hidrogênios de C_2 e C_3. O RMN ^{13}C (Espectro 19) mostra os carbonos das metilas da proteção em 25-26 ppm e, também, $C_{3,}$ C_5 e C_4 do espaçante região de 70, 111 e 171 ppm. Além disso, no espectro de RMN ^{13}C (Espectro 19) observa-se a presença da carbonila deslocada para campo mais alto, passando de 174 ppm para 164,02 ppm. O carbono $C_{2,}$ que antes aparecia em 35,99 ppm surge mais desblindado, em 37,15 ppm. Esse resultado mostra que aconteceu a condensação entre duas moléculas de ácido málico protegido, o que levou à síntese do anidrido do AMP. A carbonila em 164 ppm revela a carbonila do anidrido formado e o C_2 aparece deslocado por estar próximo da função anidrido. Portanto, o método com cloreto de tionila não foi eficiente para a síntese do intermediário I de interesse, mas levou a síntese do anidrido do AMP.

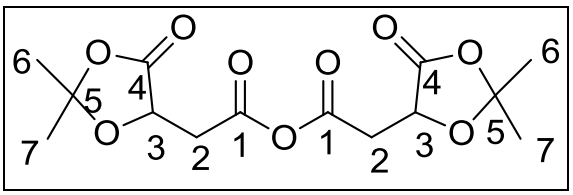


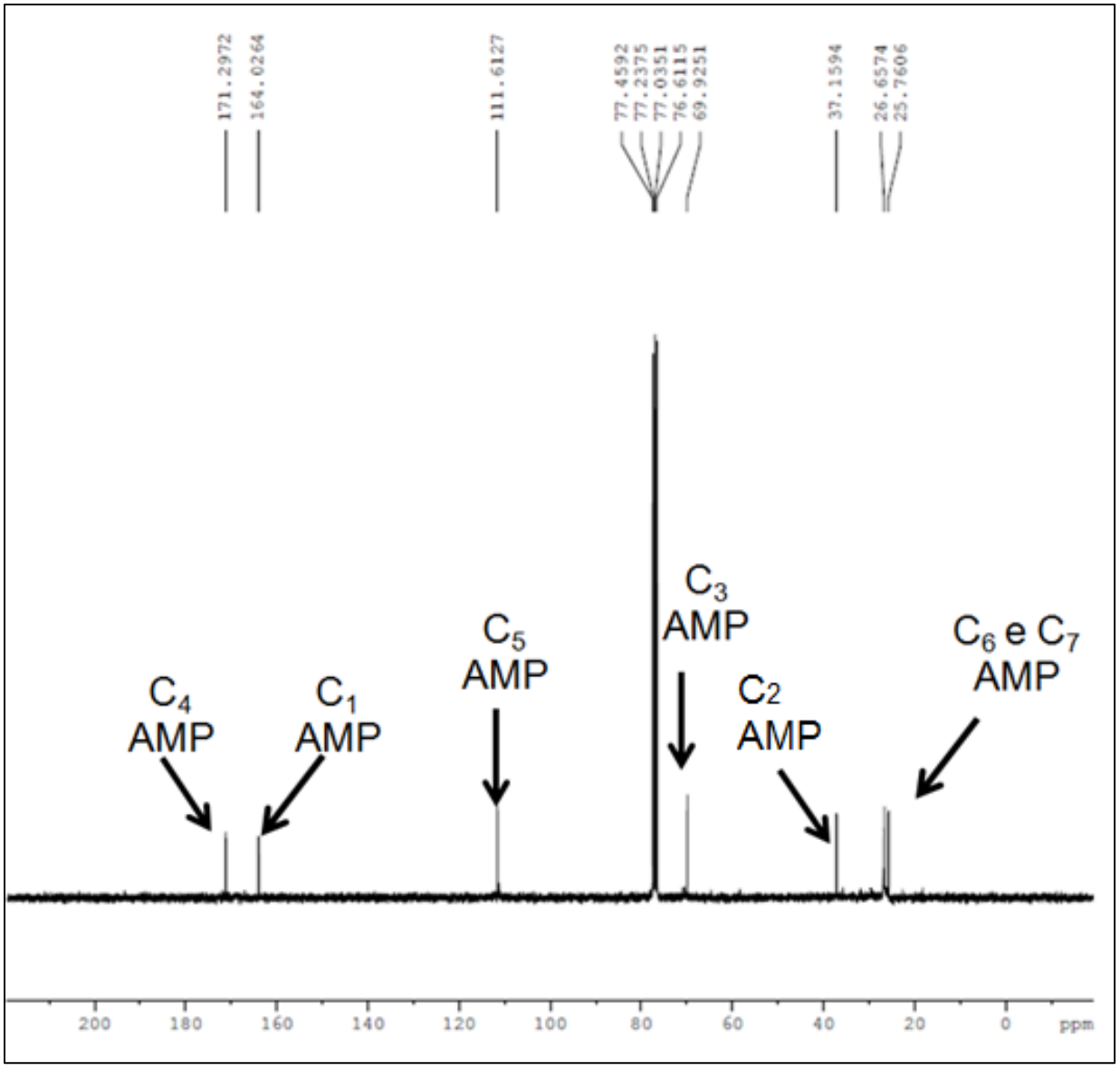


Espectro 17: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre propanodiamina e ácido málico protegido, obtido com o uso de cloreto de tionila, experimento E3. AMP – ácido málico protegido; PDA-propanodiamina.



Espectro 18: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre propanodiamina e ácido málico protegido, obtido com o uso de cloreto de tionila, experimento E4. AMP – ácido málico protegido.



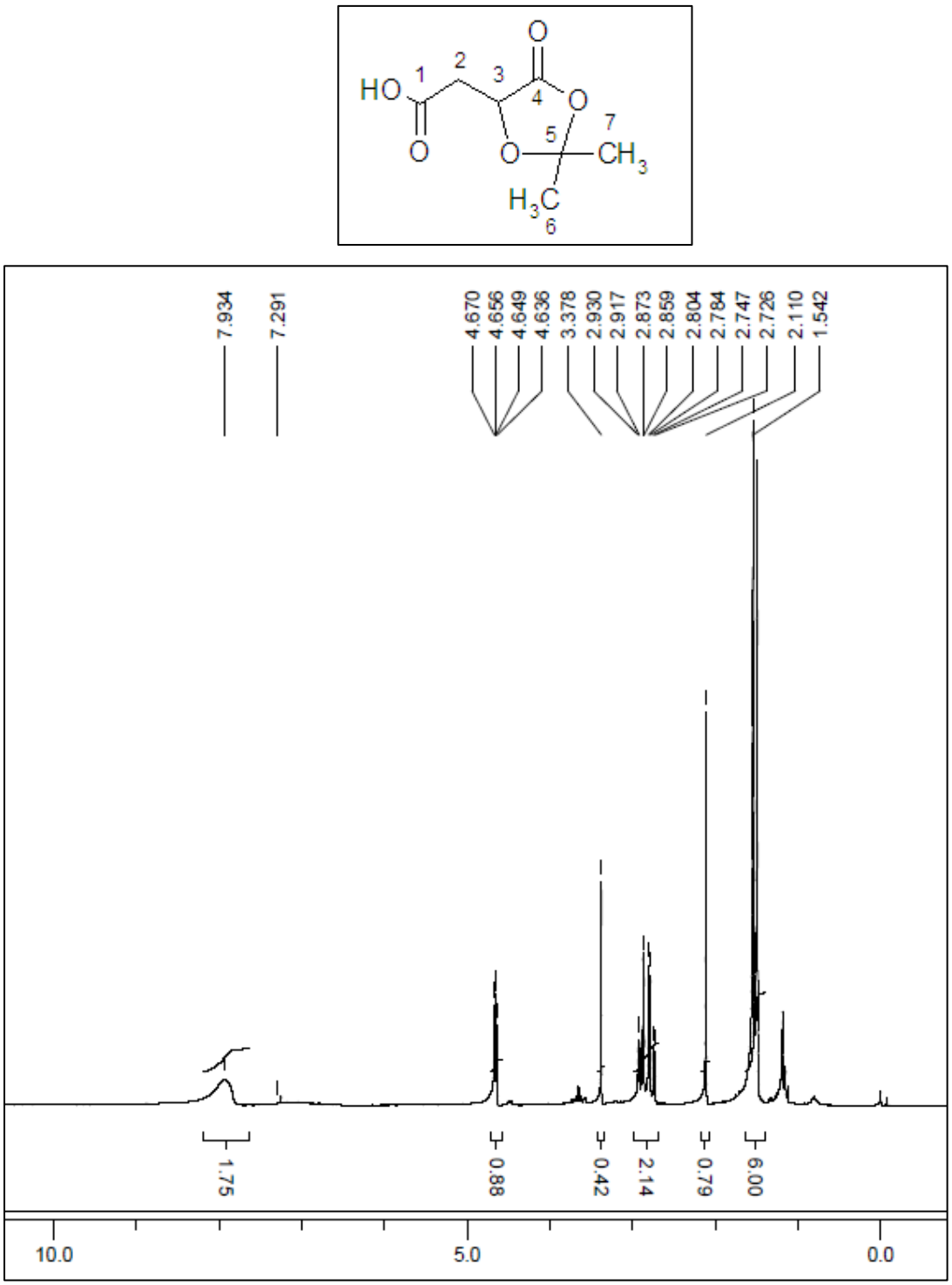


Espectro 19: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre propanodiamina e ácido málico protegido, obtido com o uso de cloreto de tionila, experimento E4. AMP – ácido málico protegido.

No experimento E5, utilizou-se outro cloreto de acila, neste caso o cloreto de oxalila e trietilamina, em substituição ao cloreto de tionila. A proporção molar foi de 1:2

para propanodiamina e AMP. A cromatografia em camada delgada do experimento E5 não mostrou a formação de mancha diferente dos materiais de partida, indício de que o produto não foi obtido.

O experimento E6 para a síntese do intermediário IA consistiu no uso de cloreto de oxalila e piridina em grande excesso, para garantir a neutralização do HCl formado no meio reacional. Com esta metodologia, a cromatografia em camada delgada apresentou a presença de duas manchas com R*f* diferentes dos materiais de partida (0,79 e 0,92), o que indicou a possível obtenção do intermediário IA com diferentes substituições. O produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica e as manchas foram isoladas. No entanto, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 20) não mostrou a presença dos sinais relativos à propanodiamina. No espectro, observam-se os sinais característicos do ácido málico protegido em 1,54 ppm relacionado aos hidrogênios das metilas e, também, os sinais na região de 2,72-2,93 e em 4,60 ppm, que correspondem aos hidrogênios dos C_2 e C_3 do AMP, respectivamente. Portanto, este método não foi eficiente para a síntese e purificação do intermediário IA.



Espectro 20: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto da reação entre propanodiamina e ácido málico protegido, obtido com o uso de cloreto de oxalila, experimento E6, fração isolada na coluna cromatográfica. AMP – ácido málico protegido.

4.3.3.3 Método F, G e H – utilizando agentes condensantes

Diferentes agentes condensantes foram utilizados para a síntese do intermediário I. Desta forma, realizou-se o método F, que consiste no uso de CDI e DMAP, como agente condensante e catalisador, respectivamente, para a síntese destas amidas (Figura 54).

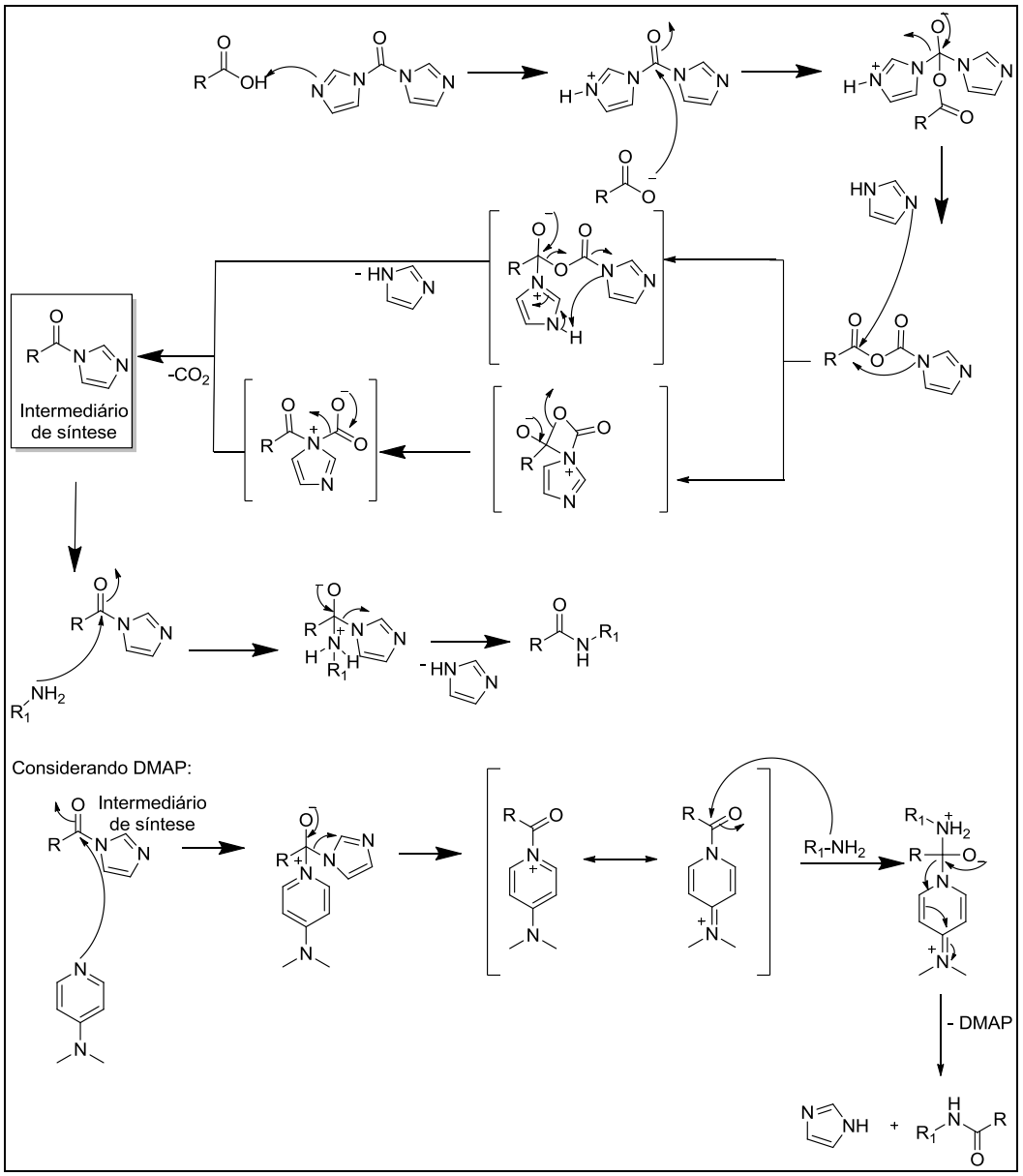
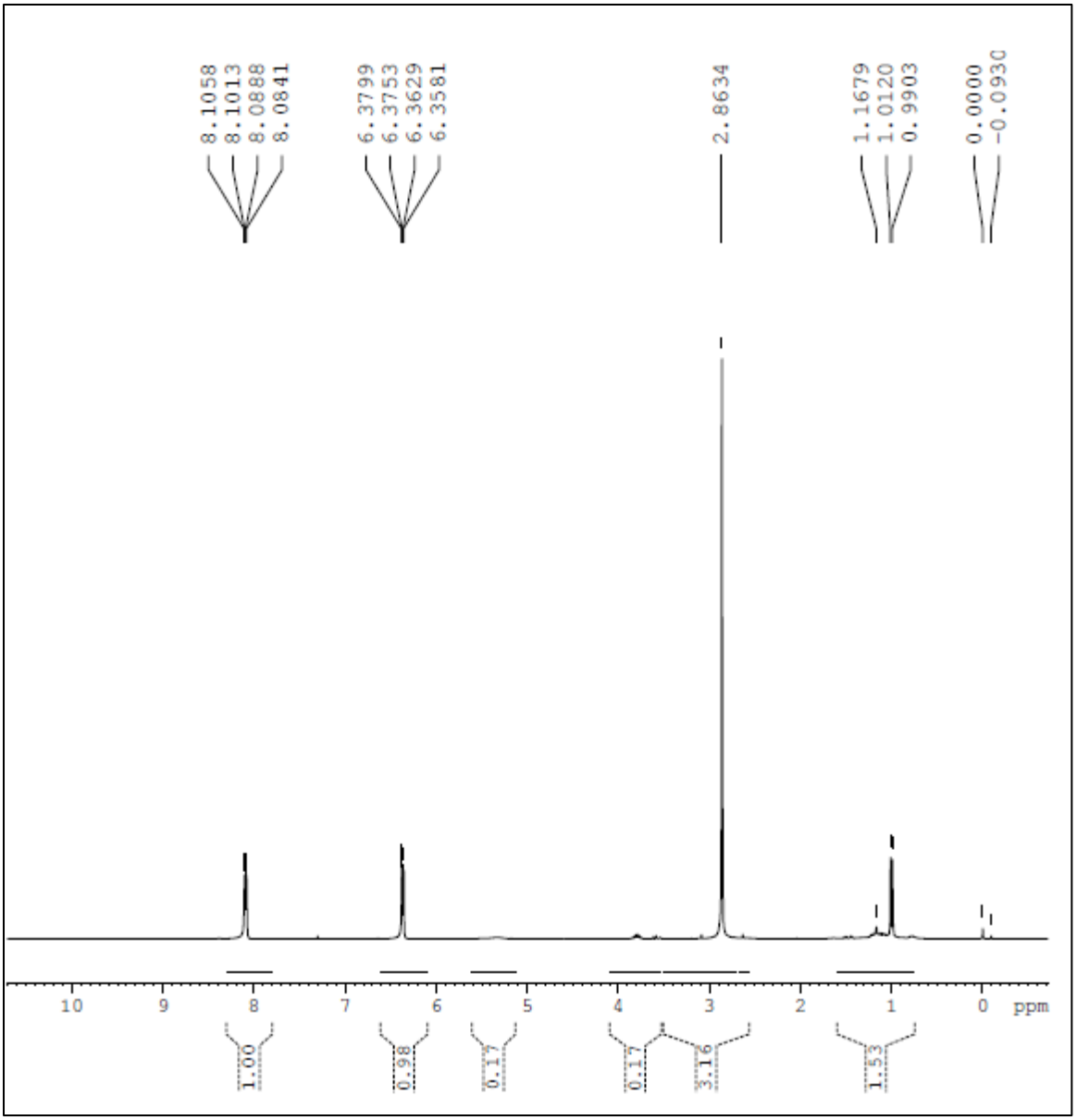


Figura 54: Mecanismo de reação para a síntese de amidas, utilizando CDI e DMAP, como agente condesante e catalisador, respectivamente (adaptado de MONAGLE, 1962; NEISES, STEGLICH, 1978 e CHRISTIE et al., 1993).

Para os métodos F e G a proporção molar utilizada para a síntese do intermediário IA foi de 1:1 de ácido málico protegido e propanodiamina, respectivamente. Utilizou-se essa proporção com o intuito de reproduzir o protocolo realizado pelos artigos utilizados e, também, obter a substituição da propanodiamina, determinando, assim, as condições reacionais. Desta forma, com as condições reacionais estabelecidas, as proporções molares poderiam ser reajustadas para a obtenção do maior número de substituições, o que é mais interessante para a síntese de dendrímeros. No método F, a cromatografia em camada delgada não mostrou mancha diferente dos materiais de partida.

Outra tentativa sintética realizada para obtenção do intermediário IA foi o uso de DCI e DMAP, como agente condensante e catalisador, respectivamente, designado como método G, para formação da amida entre o ácido málico protegido e a propanodiamina.

Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada não apresentou mancha diferente dos materiais de partida. Em adição, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 21) da porção orgânica obtida nesta reação mostrou apenas sinais referentes aos reagentes utilizados. O RMN ^{1}H (Espectro 21) não apresentou sinais do ácido málico protegido tampouco da propanodiamina, mas, apenas sinais das metilas do agente condensante, DCI em 1,01 ppm. Ademais, os sinais em 2,86 ppm caracterizam as metilas presentes no aceptor de próton, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e, também, os sinais entre 6,35 e 8,10 ppm, correspondentes aos hidrogênios do anel piridínico. Portanto, com estes resultados, conclui-se que o intermediário IA não foi obtido por estes métodos.



Espectro 21: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da tentativa de obtenção do intermediário IA com o método G, que utiliza DCI, como agente condensante.

Outro método utilizado para a síntese do intermediário IA fez uso de EDC (agente condensante) e DMAP (catalisador), e este foi denominado como método H. O EDC promove a formação do subproduto EDU (1-(3-diaminopropil)uréia) (Figura 55), que é solúvel em água, o que facilita a purificação do intermediário desejado por este método.

No método H, a proporção molar utilizada foi de 1:2,5 do foco central (propanodiamina) e o espaçante AMP, respectivamente. Para purificação realizou-se extração com ácido, base e solução salina saturada. As placas cromatográficas mostraram a formação de mancha com caráter diferente dos materiais de partida, mais apolar, com Rf de 0,81, provavelmente, relacionada ao composto de interesse sintetizado.

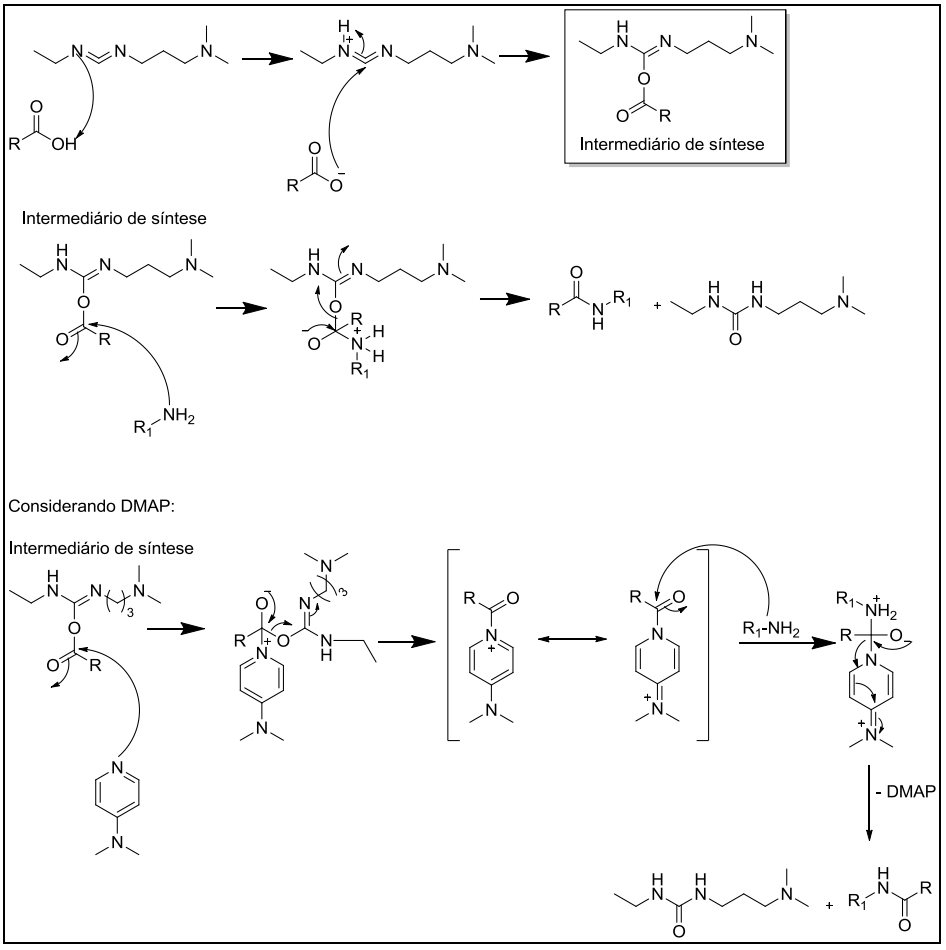


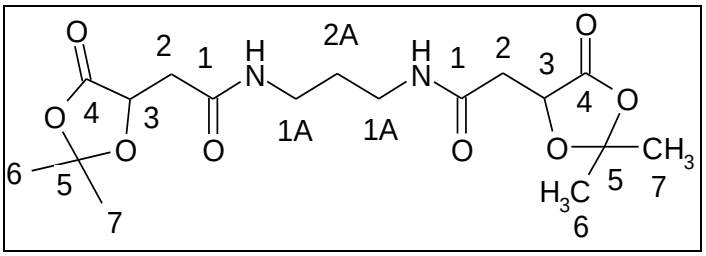
Figura 55: Mecanismo de reação para a síntese de amidas, utilizando EDC e DMAP, como agente condesante e catalisador, respectivamente (adaptado de MONAGLE, 1962; NEISES, STEGLICH, 1978 e CHRISTIE et al., 1993).

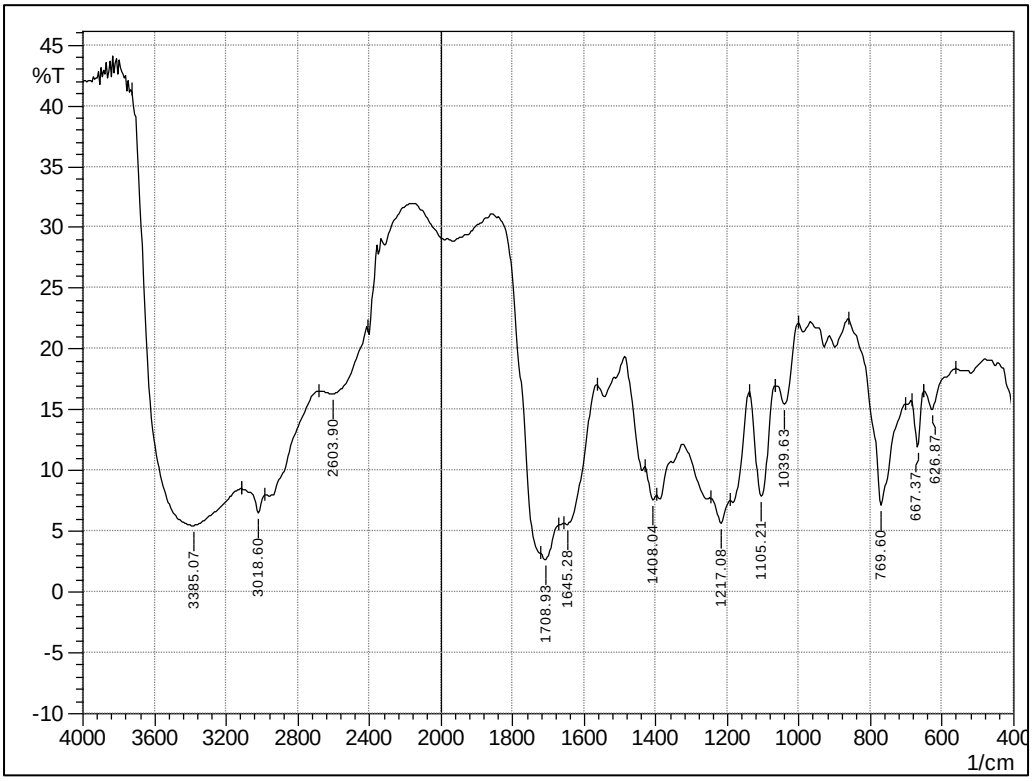
O espectro no IV (Espectro 22) é uma evidência de obtenção do intermediário IA. Neste espectro, observam-se bandas de estiramento relacionadas à carbonila de amida formada entre o AMP e a propanodiamina em 1645 cm^{-1}, bem como outras bandas em 3385 e em 1408 cm^{-1}, que caracterizam, respectivamente, as ligações NH e C-N de amida. Além disso, a banda de estiramento em 2603 cm^{-1} caracteriza CH de alquilas. Com relação à lactona observam-se as bandas em 1708 e 1217 cm^{-1} relativas às ligações C=O e C-O do AMP, respectivamente, bem como em 1105 cm^{-1} observa-se a banda de deformação axial de acetal.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 23) apresentou indicativos da formação do intermediário IA, devido à presença dos sinais em 1,54 e 1,60 ppm, referentes aos hidrogênios das metilas do ácido málico protegido. Além disso, observaram-se os sinais entre 2,80 e 3,00 ppm e em 4,70 ppm, que indicam os demais hidrogênios do espaçante, respectivamente, H_2 e H_3. Com relação ao foco central, os sinais na região de 3,00 ppm revelam a presença dos hidrogênios H_{1A} da propanodiamina, bem como os sinais próximos de 1,70 ppm mostram os hidrogênios H_{2A} do foco central. No entanto, o RMN ^{1}H apresentou sinais referentes ao material de partida, AMP. No espectro existem sinais duplicados correspondentes ao ácido málico protegido nas regiões de 2,6-3,00 ppm e 4,70 ppm, provavelmente, relativos ao AMP acoplado à propanodiamina e ao material de partida. Portanto, nesse espectro temos a mistura do material de partida e do produto. Neste método, realizou-se o processo de extração com o uso de solução de bicarbonato de sódio, como base, para remoção do AMP que não reagiu, mas este procedimento não foi suficiente para eliminação do material de partida e purificação do produto de interesse. Portanto, o método com EDC, provavelmente, promoveu a obtenção do intermediário IA, ainda que impuro (Espectro 23).

Tentou-se purificar o composto obtido com este método através de coluna cromatográfica com gradiente de concentração. O sistema solvente utilizado para a separação foi hexano/acetato de etila nas proporções 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 5:5 (100 mL de cada fase móvel). A coluna isolou mancha que na cromatografia em camada delgada apresentou Rf de 0,81.

No entanto, o RMN ^{1}H da fração isolada (espectro não mostrado) apresentou excesso de sinais na região entre 1 e 2 ppm, e ausência dos sinais relativos ao composto de interesse, indicando que, possivelmente, este composto sofreu hidrólise na coluna. Portanto, esses resultados sugerem que o composto obtido é instável e foi degradado durante a realização deste método de purificação. Desta forma, o intermediário IA puro não foi obtido.

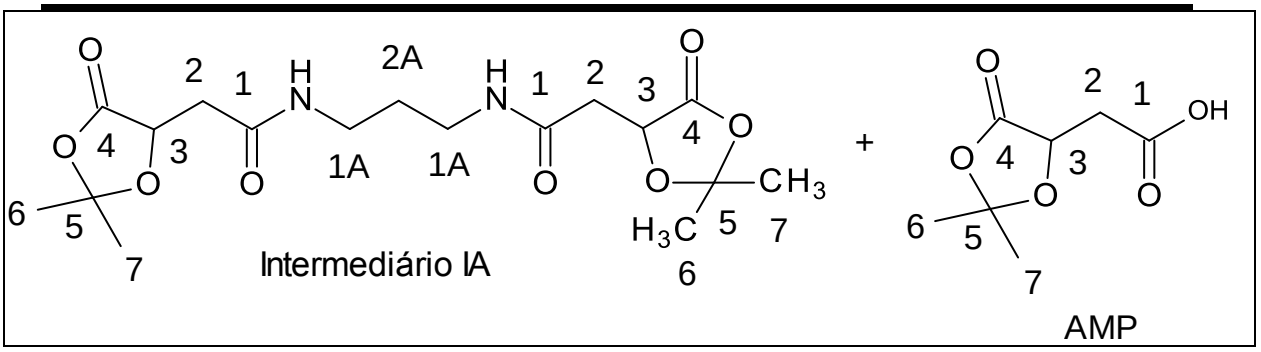


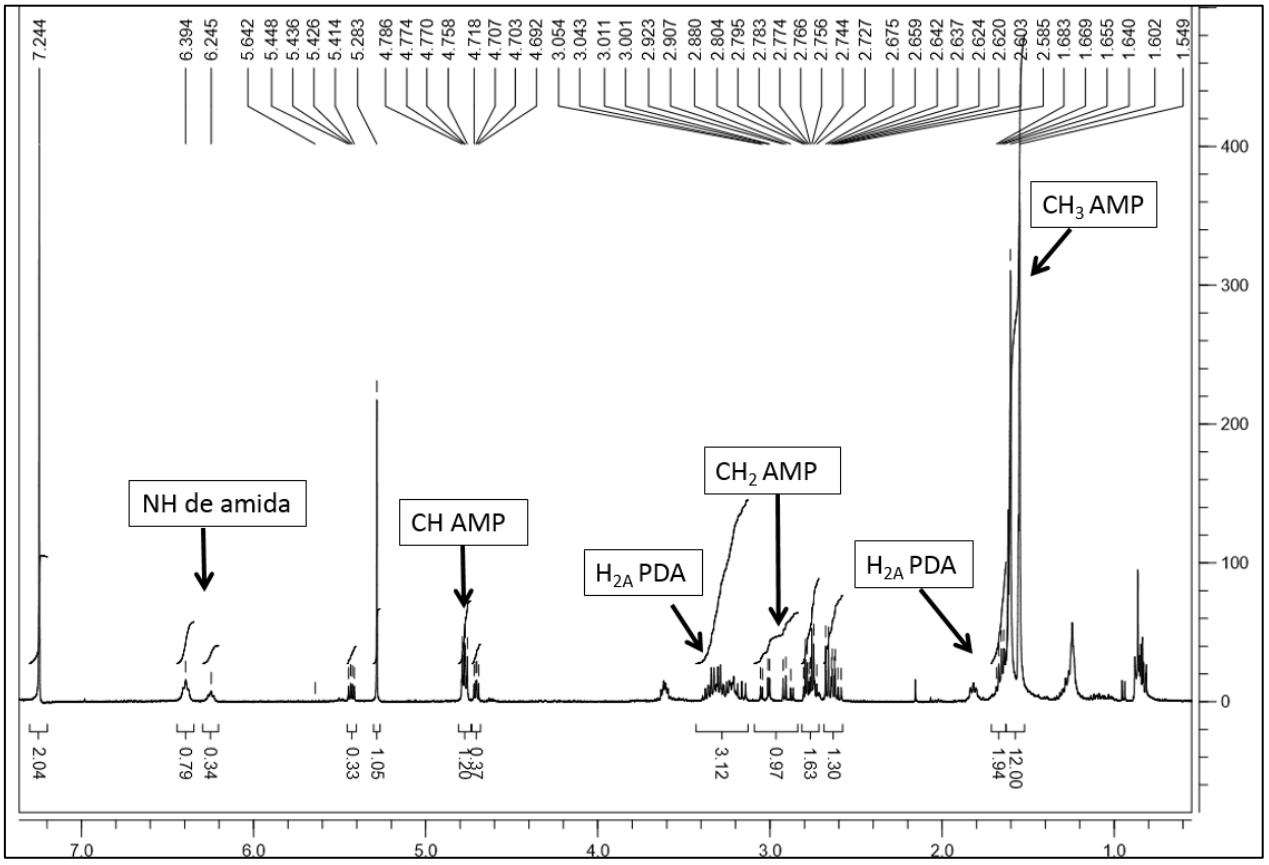


Espectro 22: Espectro no IV do intermediário IA (AMP e propanodiamina) obtido com o experimento H.

IV (ν, KBr, cm^{-1})
3385 (ν_{NH} amida); 3018 (ν_{OH} ácido carboxílico); 2603 (ν_{CH} alquilas); 1708 ($\nu_{C=O}$ éster da lactona); 1645 ($\nu_{C=O}$ amida); 1408 (ν_{CN} amida); 1217 (ν_{C-O}

lactona); 1105 ($\delta_{C\text{-}O\text{-}C}$ axial de acetal).





Espectro 23: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3O) do produto impuro da reação entre propanodiamina e ácido málico protegido, obtido com o uso do método H, utilizando EDC, como agente condensante. AMP – ácido málico protegido.

4.3.3.4 <u>Método I – síntese do intermediário IA, utilizando DCC, como agente condensante</u>

Diante das dificuldades encontradas para obtenção do intermediário IA, buscaram-se outros métodos de síntese e purificação da amida de interesse. Os

métodos I, J, L e M consistem no uso de DCC e DMAP, como agente condensante e catalisador, respectivamente. Na síntese com DCC, há a formação do subproduto DCU (dicicloexiluréia) (Figura 56). Para purificação utilizou-se a precipitação com mistura de solventes. No experimento I, o núcleo utilizado foi a propanodiamina e empregou-se a proporção molar entre foco central e o ácido málico protegido de 1:2,8, respectivamente, com o intuito de obter a substituição nos dois grupos amínicos.

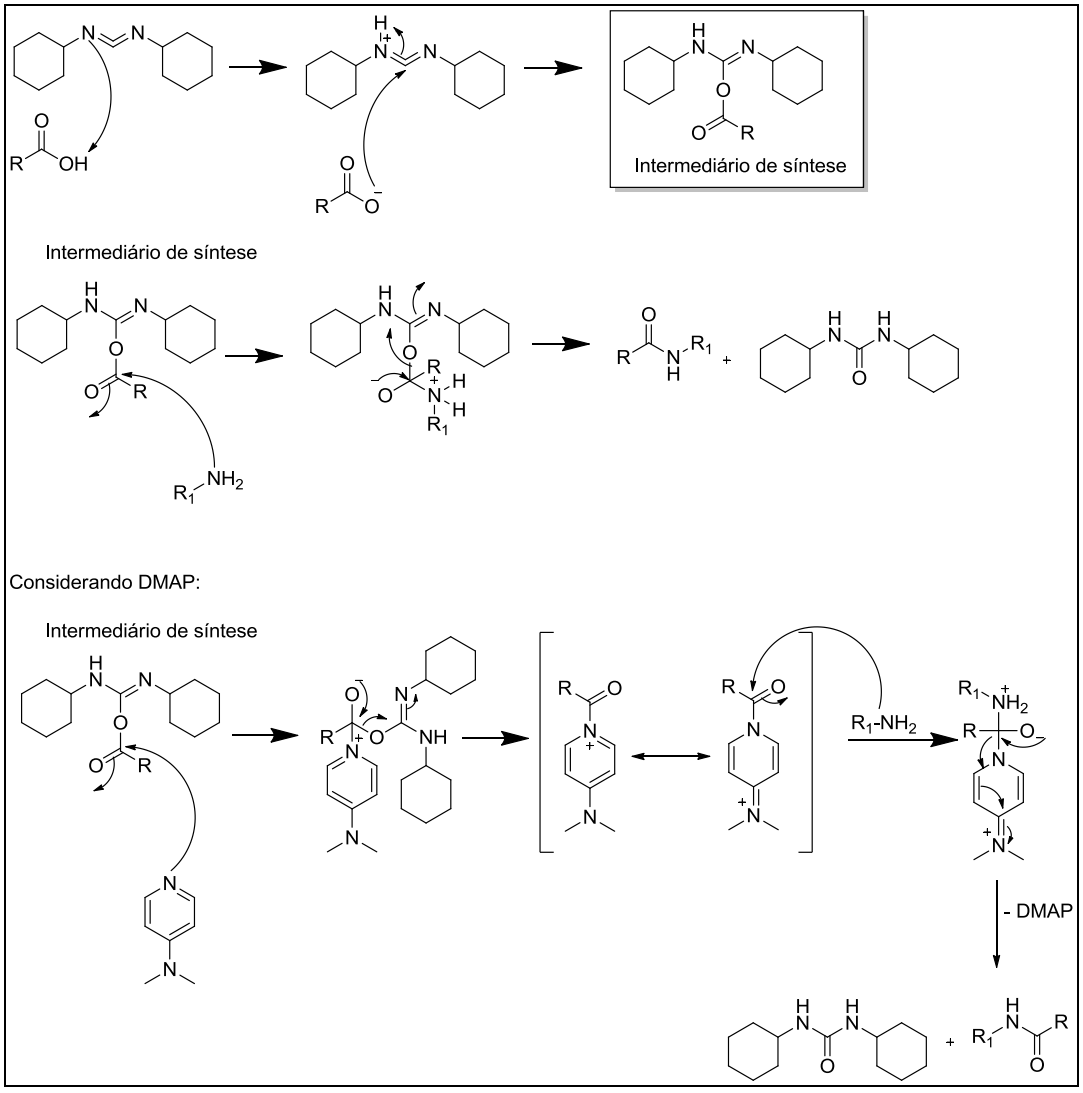
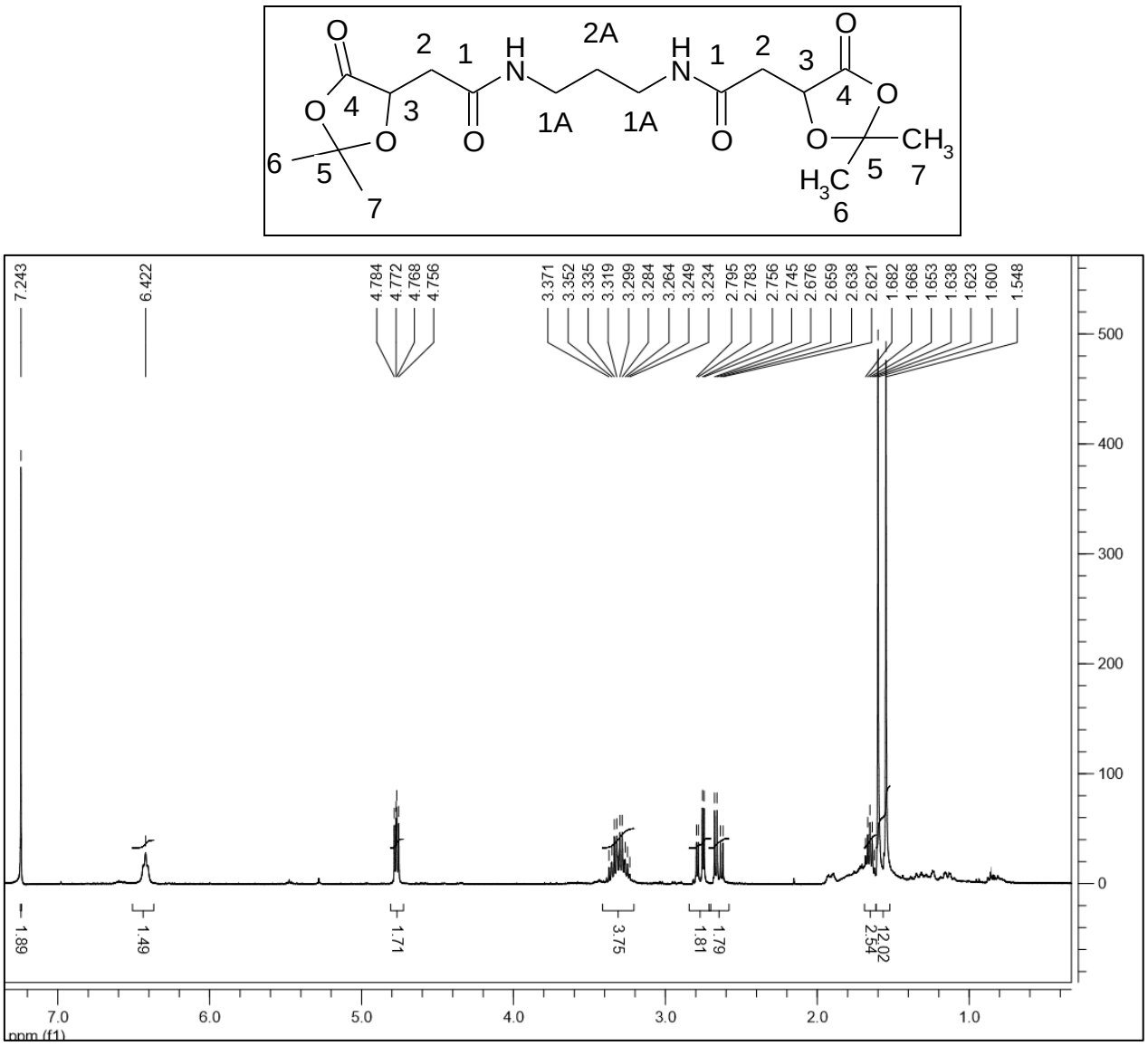


Figura 56: Mecanismo de reação para a síntese de amidas, utilizando DCC e DMAP, como agente condesante e catalisador, respectivamente (adaptado de MONAGLE, 1962; NEISES, STEGLICH, 1978 e CHRISTIE et al., 1993).

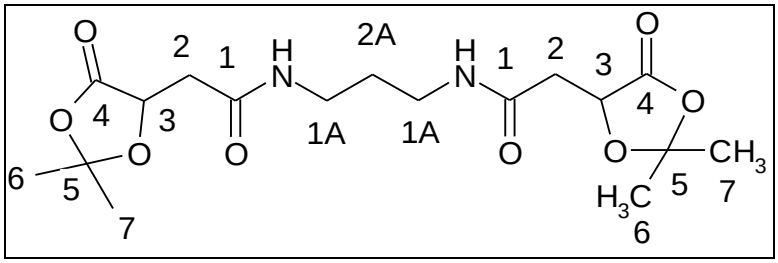
No espectro de RMN ^{1}H (Espectro 24) aparecem singletos em 1,60 e 1,62 ppm, referentes aos hidrogênios dos carbonos 6 e 7 do ácido málico protegido. Em adição, observam-se os duplos dubletos do CH_2 do AMP 2,63 e 2,79 ppm, deslocados para campo mais alto, em relação ao material de partida. Ainda com relação ao espaçante, os sinais em 4,70 ppm são relativos aos H_3 do ácido málico protegido. A respeito do foco central, estão presentes os multipletos em 1,63-1,68 e em 3,23-3,37 ppm, que indicam, respectivamente, os hidrogênios dos carbonos 2A e 1A da propanodiamina. No espectro, ainda é possível observar a presença do sinal em 6,42 ppm, relativo ao hidrogênio da ligação amida formada.

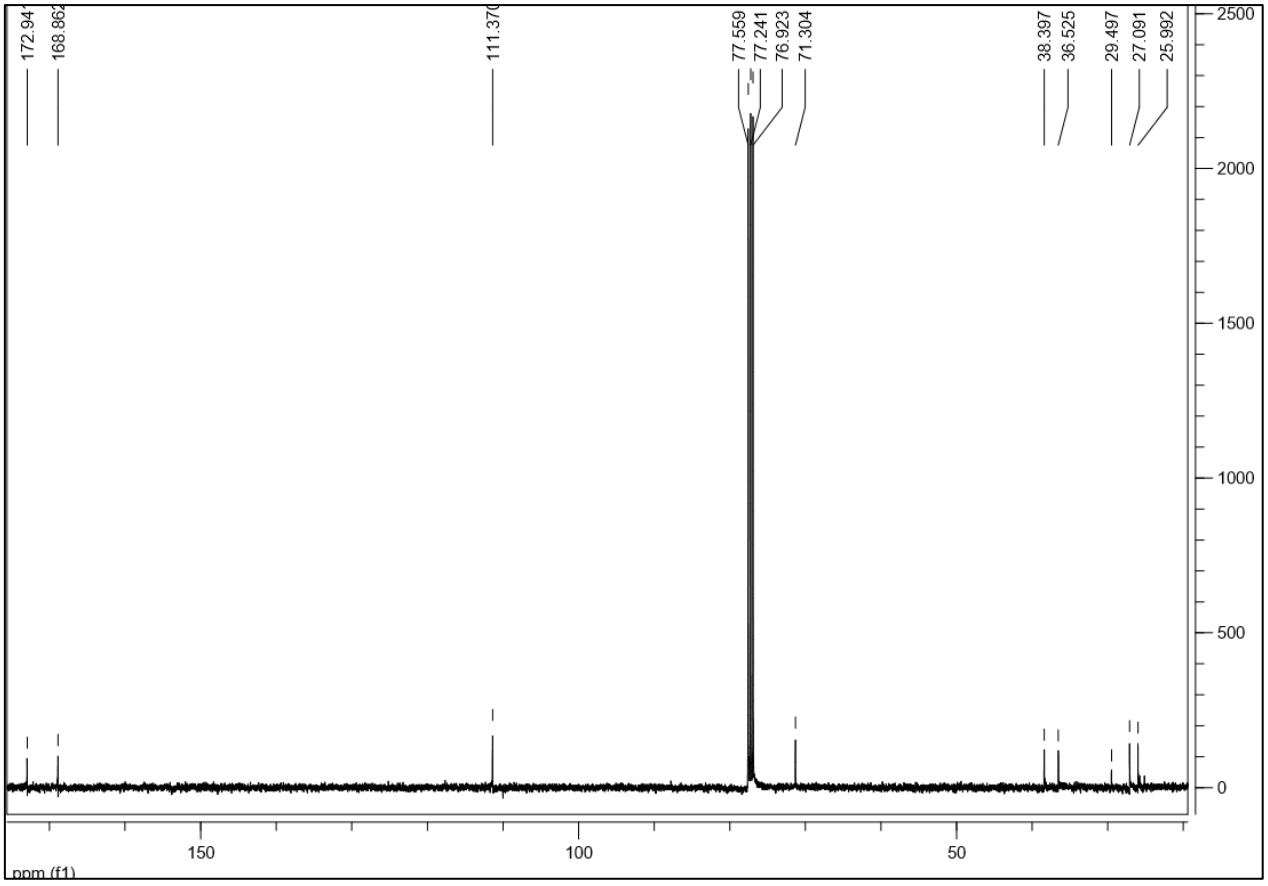
Outro indicativo da obtenção do intermediário IA com esta metodologia é o espectro de RMN ^{13}C (Espectro 25), que mostrou sinais em 25,99 e 27,09 ppm, que caracterizam os carbonos metílicos da proteção do ácido málico. Os sinais em 36, 71, 111 e 172 ppm, caracterizam os carbonos 2, 3, 5 e 4 do agente espaçante, respectivamente. Adicionalmente, o sinal em 168,86 ppm mostrou a carbonila de amida formada, deslocada para campo mais alto em relação à carbonila de ácido do AMP. Os sinais relativos aos carbonos 1A e 2A da propanodiamina apareceram em 29,49 ppm e em 38,39 ppm.



Espectro 24: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do intermediário IA (AMP-propanodiamina), obtido com o uso do método I, utilizando DCC, como agente condensante.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 400 MHz, δ
7,24 ($CDCl_3$); 1,54, 1,60 (s, 12H, H_6, H_7); 1,60-1,68 (m, 2H, H_{2A}); 2,62 (dd, 2H, H_2, J = 8 Hz, J = 4 Hz); 2,74 (dd, 2H, H_2, J = 8 Hz, J=4 Hz); 3,23-3,37 (m, 4H, H_{1A}); 4,75 (dd, 2H, H_3, J = 8 Hz, J = 4 Hz).

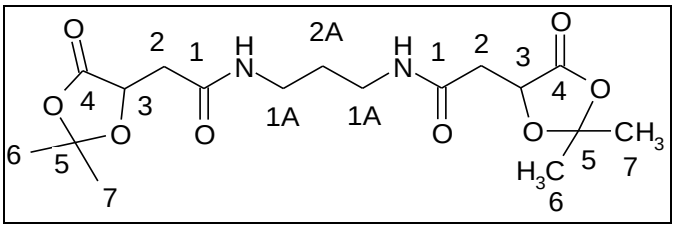


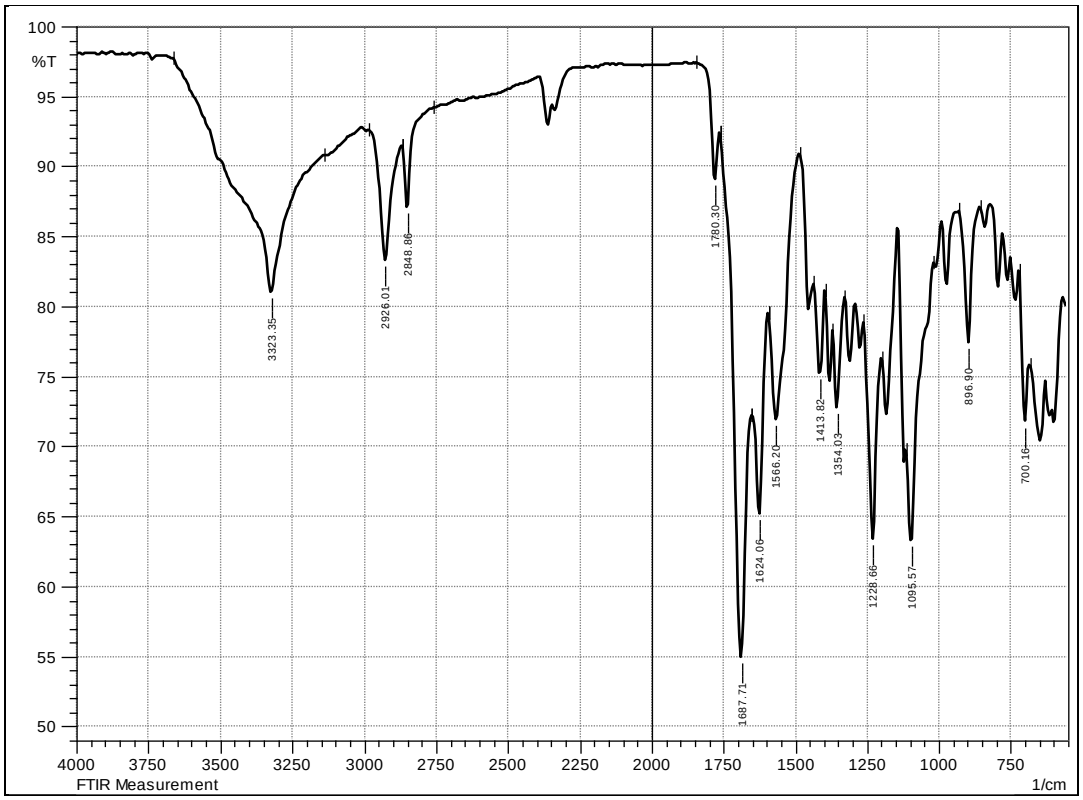


Espectro 25: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) do intermediário IA (AMP-propanodiamina), obtido com o uso do método I, utilizando DCC, como agente condensante.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 100 MHz, δ
77,00 ($CDCl_3$); 25,99 (C_7); 27,09 (C_6); 29,49 (C_{2A}); 36,52 (C_2); 38,39 (C_{1A}); 71,30 (C_3); 111,37 (C_5); 168,86 (C_1); 172,94 (C_4).

Em adição, o espectro no IV (Espectro 26) mostrou a obtenção do intermediário IA. Observam-se no espectro as bandas de estiramento de NH e CH_2 alifático em 3323 e 2926-2848 cm^{-1}, respectivamente. Neste espectro, é possível identificar as bandas de estiramento em 1780 e 1687 cm^{-1} referentes a lactona da proteção e a função amida formada.

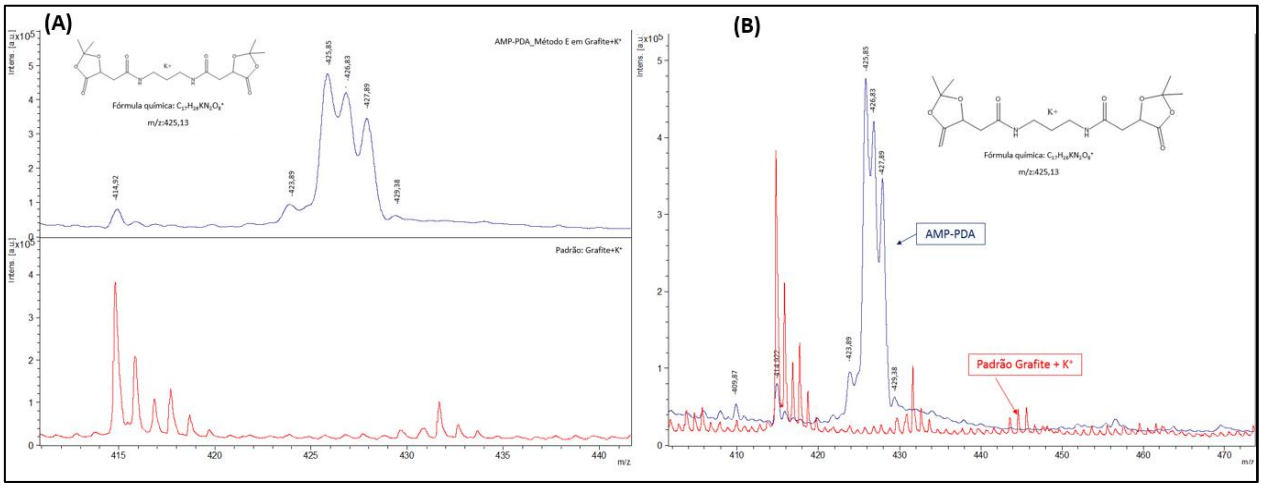




Espectro 26: Espectro no IV do intermediário IA (AMP e propanodiamina) obtido com o experimento I.

IV (ν, ATR, cm^{-1})
3323 (ν_{NH} associado de amida); 2926 (ν CH_2 alifático); 2848 (ν CH_2 alifático); 1780 ($\nu_{C=O}$ lactona); 1687 ($\nu_{C=O}$ amida); 1566 (δ_{NH} angular); 1413 (δ CH_2 adjacente a carbonila); 1228 (δ_{C-O} angular de éster).

Na espectrometria de massas no modo positivo (EM-MALDI-ToF-(+)) (Espectro 27) observou-se a presença dos picos relativos ao intermediário IA cationizado com potássio em *m/z* 425,85 $[M+K]^+$, sendo que o valor calculado para $C_{17}H_{26}N_2O_8K^+$ é 425,13. Também foram observados sinais referentes ao padrão isotópico M+1 e M+2 com m/z 426,83 e 427,89, respectivamente. Portanto, estes resultados mostram que o intermediário IA puro foi obtido com sucesso por esta metodologia. Esse produto será utilizado para as próximas etapas de síntese do dendrímero com propanodiamina. O próximo passo é o acoplamento deste intermediário ao composto bioativo.



Espectro 27: Espectro de massas – MALDI-ToF (+) do intermediário IA (AMP-propanodiamina), obtido com o uso do método I, utilizando DCC, como agente condensante. A – intermediário IA (em azul) e padrão (trifluoracetato de potássio e matriz grafite – em vermelho); B - sobreposição dos espectros do intermediário IA (em azul) padrão (trifluoracetato de potássio e matriz grafite – em vermelho).

4.3.3.5 Métodos J, L e M – síntese dos intermediários IB, IC e ID, utilizando DCC, como agente condensante

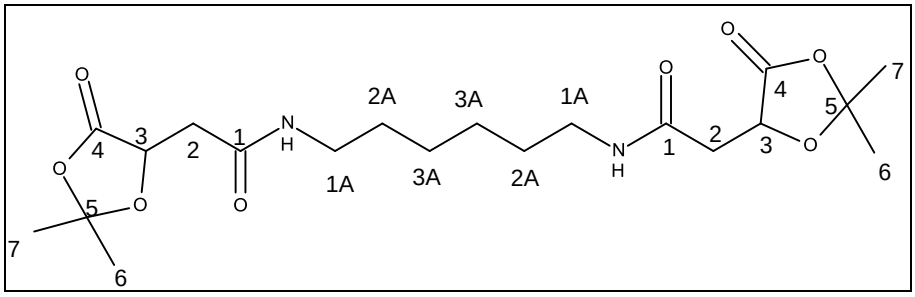
Com os bons resultados obtidos na síntese do intermediário IA, em que se utilizou DCC/DMAP para a síntese e purificação por precipitação, este método foi aplicado para a síntese dos demais intermediários IB, IC e ID, que correspondem ao AMP acoplado, respectivamente, a butano-, hexano-diamina e melamina.

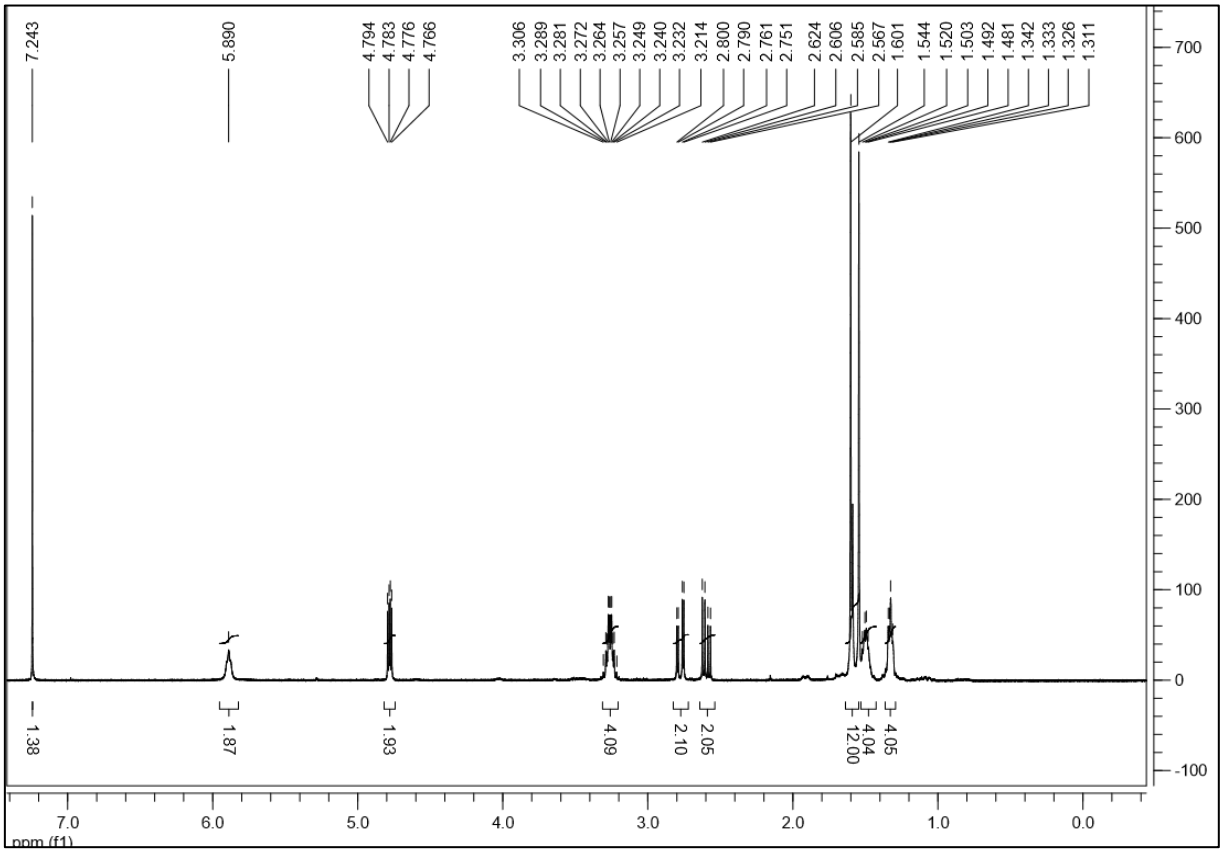
Os métodos J e L utilizaram como focos centrais, butanodiamina e melamina, respectivamente. Em ambos os métodos, esses focos centrais apresentaram problemas durante o experimento, os quais, provavelmente, prejudicaram a síntese dos respectivos intermediários de interesse. No método J, a melamina é insolúvel na maioria dos solventes. Durante o experimento, houve dificuldade na solubilização deste núcleo. Assim, provavelmente, a melamina não reagiu. Realizaram-se testes de solubilidade a quente e a frio nos seguintes solventes: acetato de etila, acetona, acetonitrila, água, metanol, trietilamina, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, piridina e tetraidrofurano e, em todos estes, a melamina foi insolúvel. Provavelmente, este fator influenciou a reatividade deste foco central. O método L consiste no uso de butanodiamina, como núcleo. Este composto mostrou-se altamente higroscópico, gerando problemas na sua pesagem, o que, possivelmente, prejudicou a obtenção do intermediário IB. Desta forma, com os métodos J e L não se obtiveram os respectivos intermediários ID e IB.

Em contrapartida aos resultados obtidos com os métodos J e L, o método M em que foi utilizado hexanodiamina, como foco central, bem como DCC/DMAP, como agente de acoplamento e catalisador, respectivamente, foi bem-sucedido na síntese do intermediário IC. O RMN ^{1}H (Espectro 28) mostrou os singletos em 1,54 e 1,60 ppm, referentes aos hidrogênios dos carbonos 6 e 7 do ácido málico protegido. Em adição, observam-se os duplos dubletos em 2,56-2,80 ppm, relativos aos hidrogênios do carbono 2 e os sinais próximos de 4,70 ppm referentes aos hidrogênios do carbono 3 do ácido málico protegido. Os sinais que correspondem aos hidrogênios 3A e 2A do foco central são observados em 1,31-1,34 ppm e entre 1,48-1,52 ppm. Ainda com relação à hexanodiamina, observa-se a presença dos hidrogênios 1A em 3,20-3,30 ppm, bem como o sinal em 5,89 ppm relativo ao hidrogênio da função amida formada.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 29) mostrou sinais em 25,81 e 25,96 ppm, que caracterizam carbonos metílicos da proteção do ácido málico. Os sinais em 38,45 ppm e em 71,35 e 111,31 ppm caracterizam os carbonos 2, 3 e 5 do agente espaçante, respectivamente. Adicionalmente, os sinais em 168,34 e 172,98 ppm indicam as carbonilas da amida formada e da lactona do AMP. Os sinais relativos aos carbonos 1A, 2A e 3A da hexanodiamina apareceram em 39,21; 29,35 e 27,11 ppm. Portanto, estes

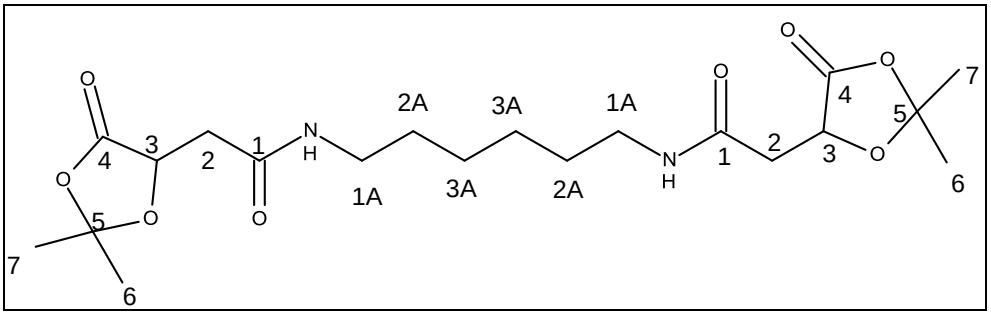
resultados mostram que o método M foi eficiente para a síntese do intermediário IC puro.

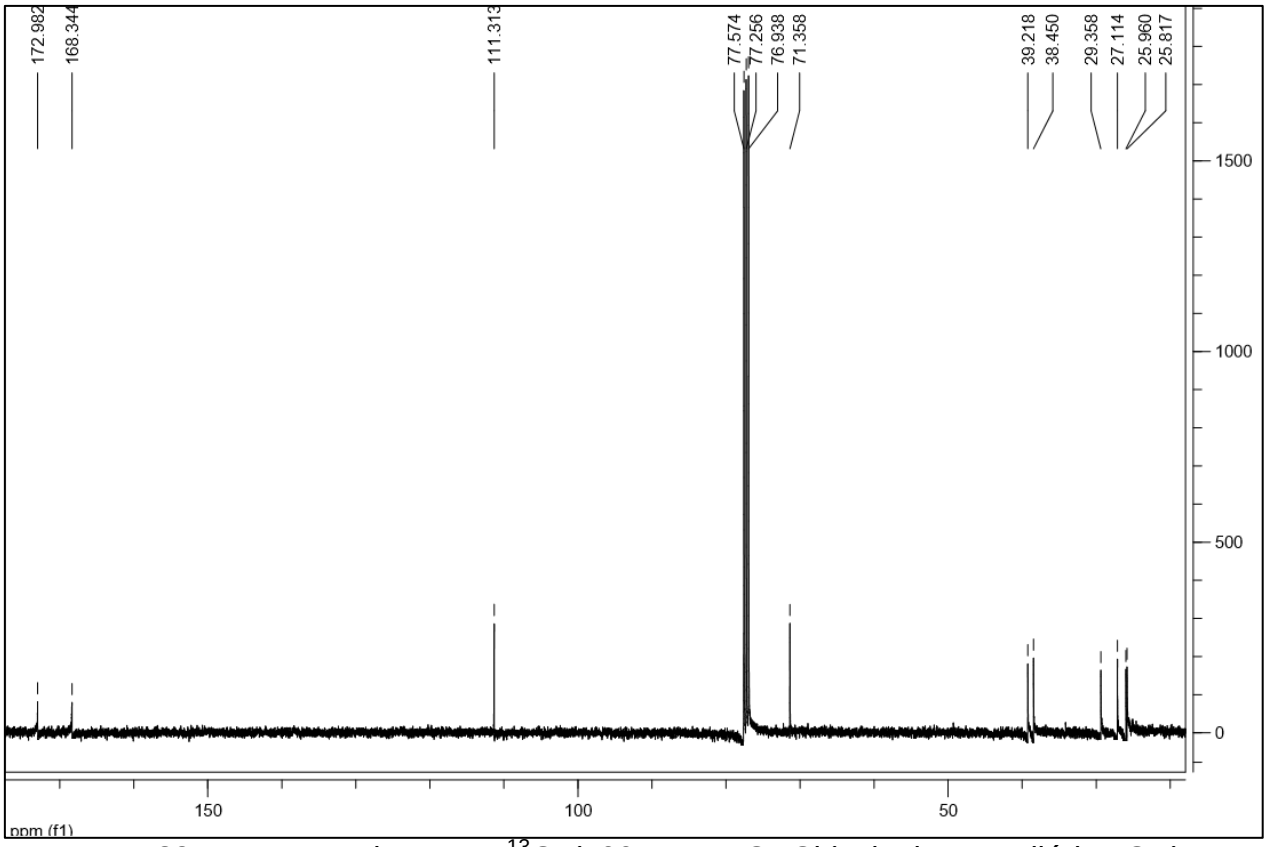




Espectro 28: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do intermediário IC (AMP-hexanodiamina), obtido com o uso do método M, utilizando DCC, como agente condensante.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 400 MHz, δ
7,24 ($CDCl_3$); 1,31-1,34 (m, 4H, H_{3A}); 1,48-1,52 (m, 4H, H_{2A}) 1,54, 1,60 (s, 12H, H_6, H_7); 2,60 (dd, 2H, H_2, J = 16 Hz, J = 8 Hz); 2,76 (dd, 2H, H_2, J = 16 Hz, J=4 Hz); 3,21-3,30 (m, 4H, H_{1A}); 4,77 (dd, 2H, H_3, J = 7 Hz, J = 4 Hz).



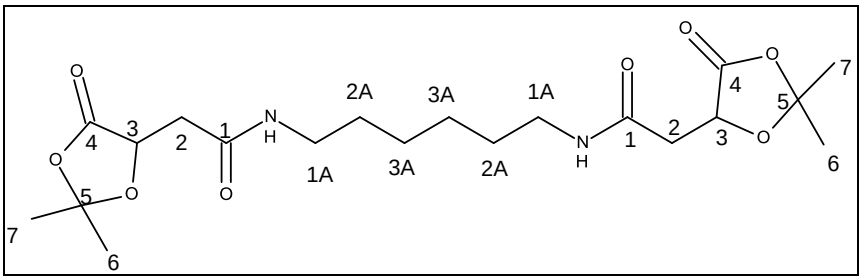


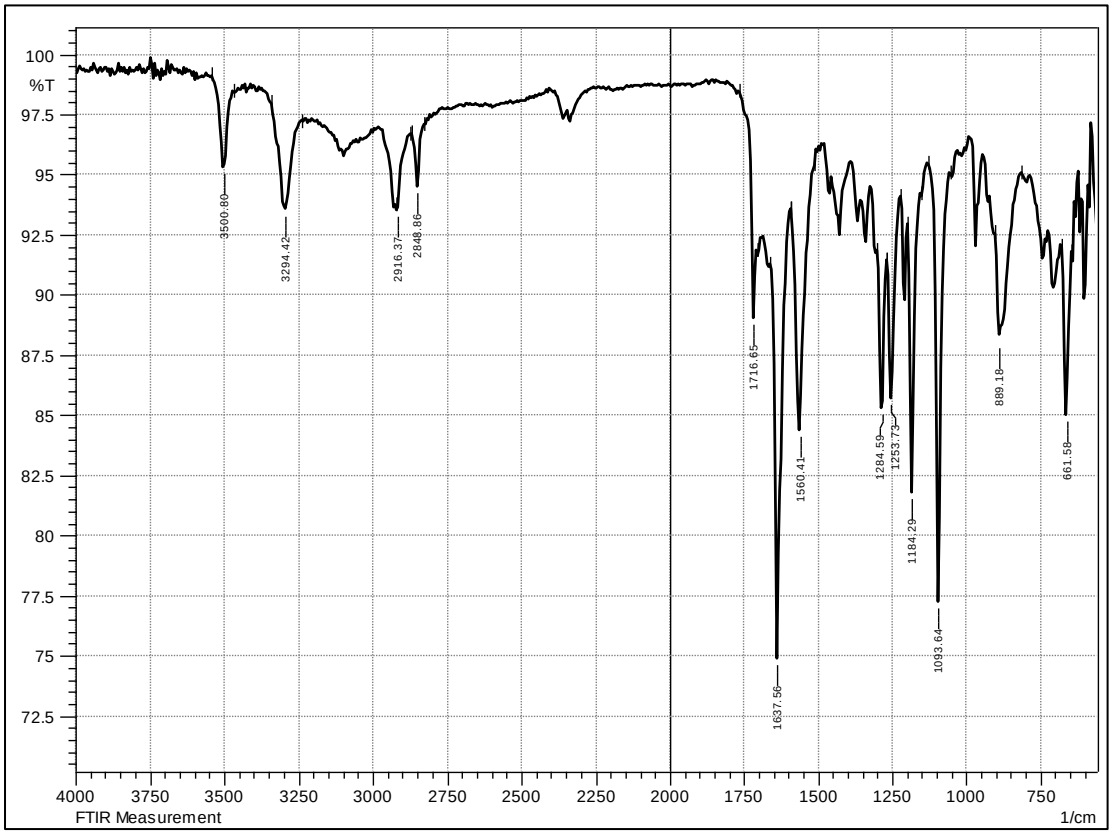
Espectro 29: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) do intermediário IC (AMP-hexanodiamina), obtido com o uso do método M, utilizando DCC, como agente condensante.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 100 MHz, δ
77,00 ($CDCl_3$); 25,81 (C_7); 25,96 (C_6); 27,11 (C_{3A}); 29,35 (C_{2A}); 38,45 (C_2); 39,21 (C_{1A}); 71,35 (C_3); 111,31 (C_5); 168,34 (C_1); 172,98 (C_4).

O espectro no IV (Espectro 30) revelou a obtenção do intermediário IC, principalmente pela presença da banda de estiramento de carbonila de amida em

1637 cm^{-1}, o que caracteriza a função do produto de interesse. Além disso, constatou-se a banda de estiramento de NH de amida em 3294 cm^{-1}, de CH_2 alifático em 2916 e 2848, bem como a banda da carbonila da lactona em 1716 cm^{-1}.

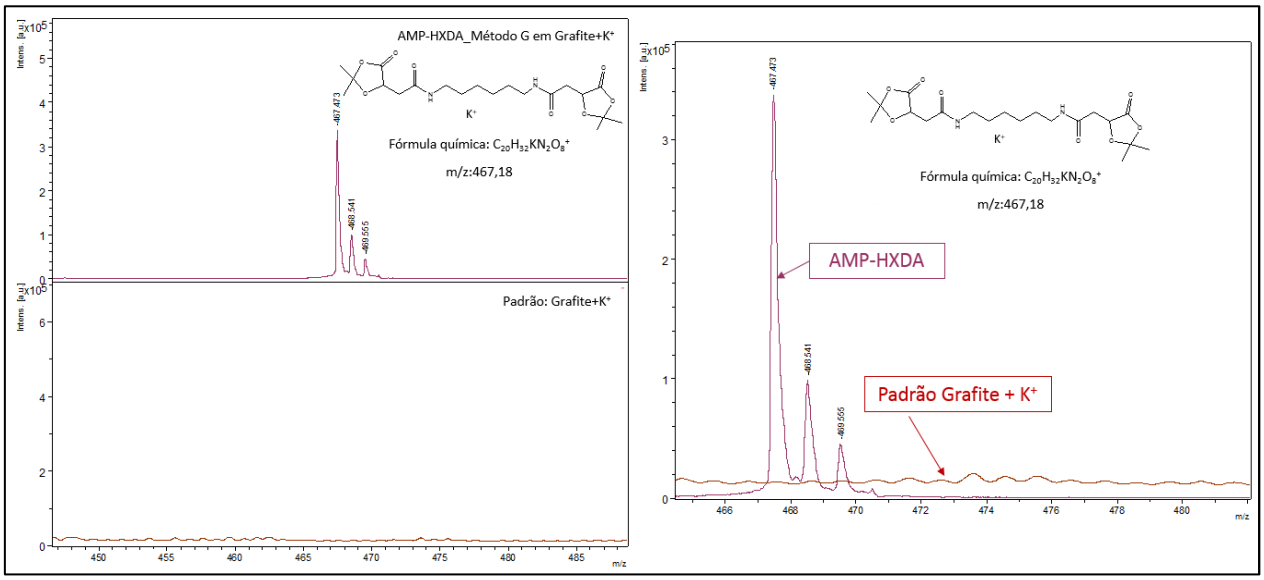




Espectro 30: Espectro no IV do intermediário IC (AMP e hexanodiamina) obtido com o experimento M.

IV (ν, ATR, cm^{-1})
3294 (ν_{NH} associado de amida); 2916 (ν CH_2 alifático); 2848 (ν CH_2 alifático); 1716 ($\nu_{C=O}$ lactona); 1637 ($\nu_{C=O}$ amida); 1560 (δ_{NH} angular); 1284 (δ_{C-O} angular de éster); 1253 (δ_{C-N} angular alifático); 1184 (δ_{C-O-C} axial de acetal).

Adicionalmente, no espectro de massas MALDI-ToF (+) (Espectro 31) observou-se a presença dos picos relacionados ao intermediário IC cationizado com potássio em *m/z* 467,47 $[M+K]^+$, os sinais referentes ao padrão isotópico M+1 e M+2 apareceram em *m/z* 428,54 e 469,55, respectivamente. O valor teórico para o composto de interesse somado ao K^+ é *m/z* igual a 467,18. Deste modo, conclui-se que o pico observado é referente ao intermediário IC.



Espectro 31: Espectro de massas – MALDI-ToF (+) do intermediário IC (AMP-hexanodiamina), obtido com o uso do método M, utilizando DCC, como agente condensante. A – intermediário IC (em roxo) e padrão (trifluoracetato de potássio e matriz grafite – em vinho); B - sobreposição dos espectros do intermediário IA (em roxo) padrão (trifluoracetato de potássio e matriz grafite – em vinho).

4.3.4 Síntese do pró-fármaco dendrimérico contendo isoniazida como MODELO, a partir do intermediário I por aminólise da lactona

Com a síntese dos intermediários IA e IC puros, partiu-se para a etapa de acoplamento do composto bioativo ao intermediário I. Optou-se por esta abordagem, utilizando como modelo a isoniazida, pois os derivados desprotegidos do ácido málico com 3-hidroxiflavona mostraram-se instáveis. Neste contexto, para evitar a síntese de intermediários desprotegidos instáveis utilizou-se a aminólise, em que ocorre o

acoplamento entre a lactona e o nucleófilo amínico (Figura 57). Portanto, não houve a desproteção da lactona para a tentativa de síntese do pró-fármaco dendrimérico.

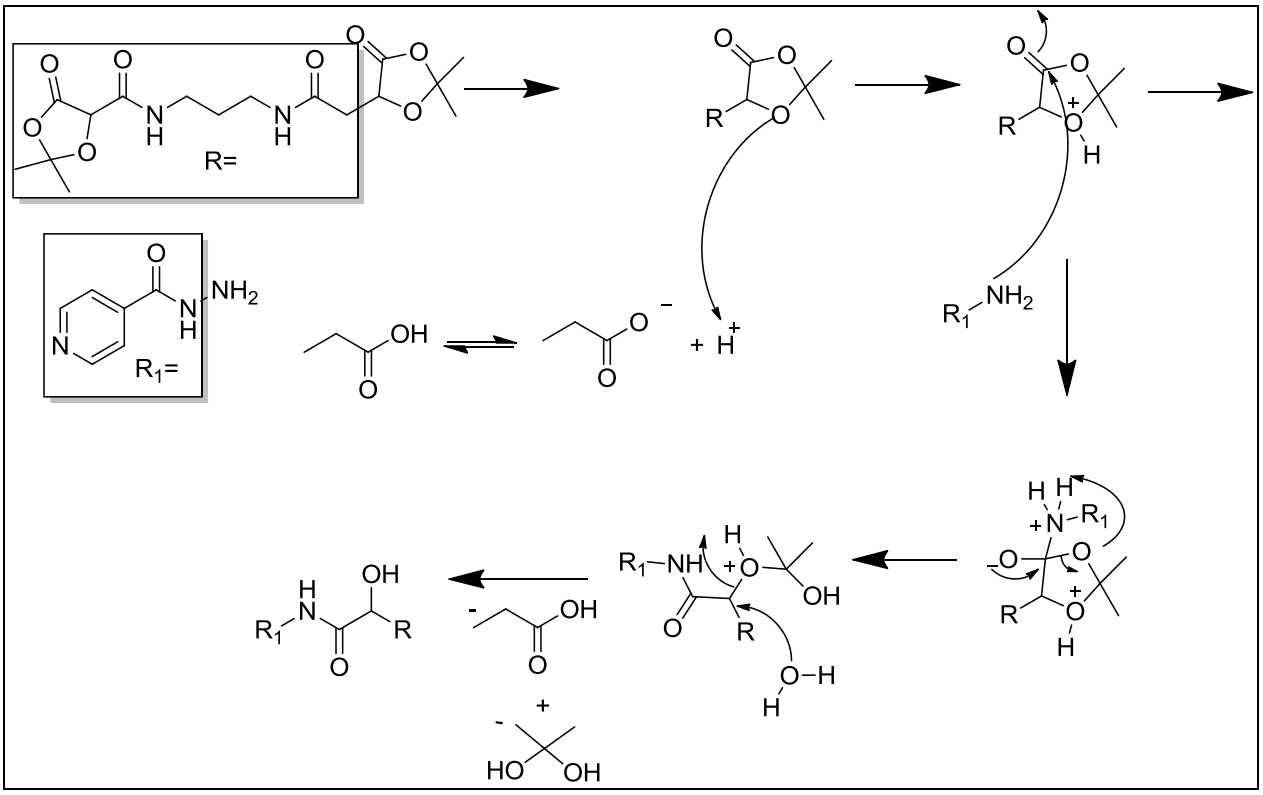


Figura 57: Mecanismo de reação por aminólise, utilizando o intermediário IA e isoniazida (adaptado de FOLEY, JAMISON, 2010).

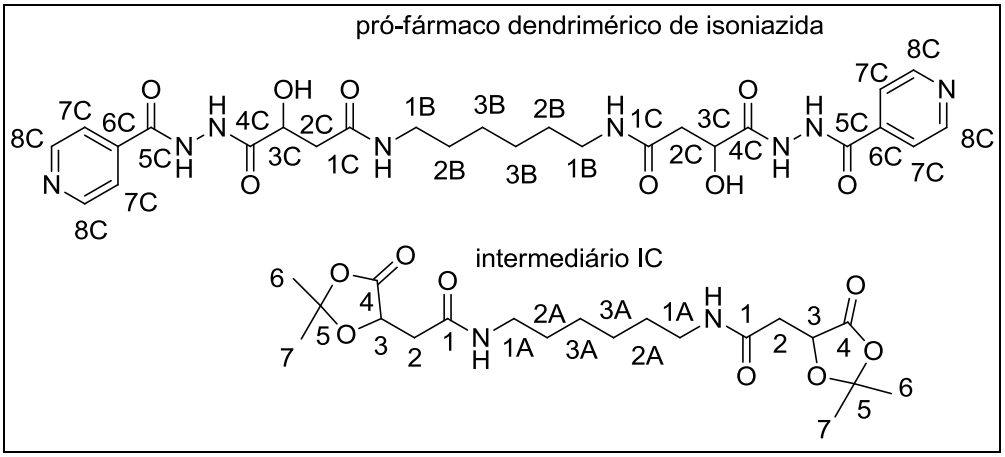
Vale mencionar que se utilizou como modelo a isoniazida, que é um fármaco que apresenta em sua estrutura nucleófilo NH_2. Dessa forma, tentou-se adaptar o procedimento descrito na referência que utiliza grupo NH_2 como nucleófilo. Além disso, apesar de não estar no projeto inicial, a isoniazida é um dos fármacos mais eficientes contra tuberculose (TB), utilizado como fármaco de primeira escolha no esquema terapêutico, na terapia padrão em crianças, no tratamento de infecções latentes em monoterapia e como terapia preventiva, com o intuito de reduzir a forma ativa da doença. Estudos mostraram que a isoniazida reduz a reativação da TB em pacientes infectados com HIV. No entanto, a terapia por longos períodos reduz a aceitação e adesão do paciente ao tratamento e o uso inadequado é fator crítico, que leva ao

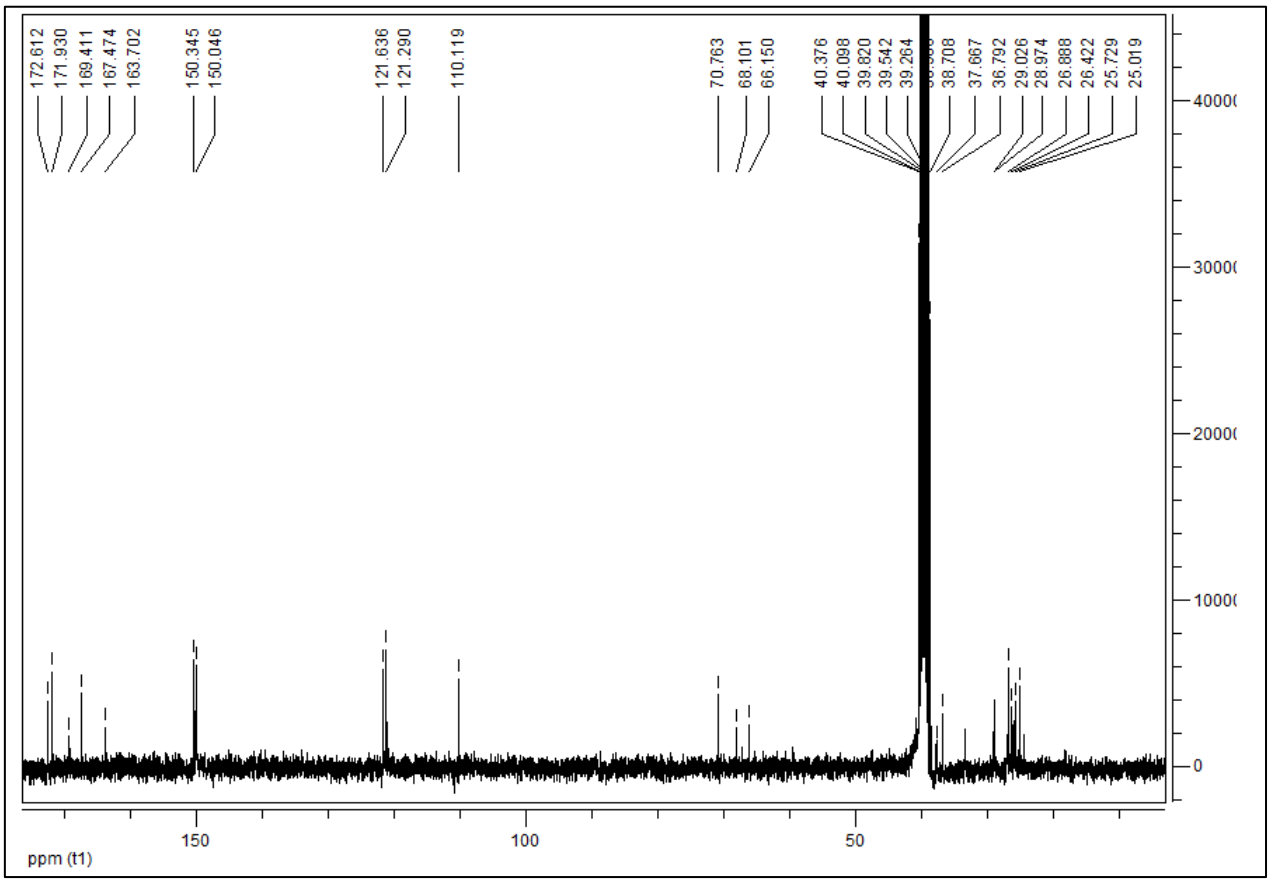
surgimento de cepas resistentes a este fármaco. Com a síntese de pró-fármacos dendriméricos de isoniazida pode-se ter a liberação controlada desse fármaco, o que posteriormente, poderá proporcionar a redução do número de doses a serem administradas. Cabe destacar que um dos grandes problemas relacionados ao tratamento da TB está na falta de adesão do paciente a terapia medicamentosa (YUEN et al., 2013; GÉNISSON et al., 2013; ADAMS et al., 2014; BOCCHINO, MATARESE, SANDUZZI, 2014; MAKANJUOLA, TADDESE, BOOTH, 2014; NOURBAKHSH, STÜVE, 2014; AYELE et al., 2015; GETAHUN et al., 2015; HARRIES et al., 2015; YUEN et al., 2015).

Realizaram-se tentativas de acoplamento do intermediário IC (AMP-HXDA) e a isoniazida. A cromatografia em camada delgada revelou que o intermediário IC (R*f*= 0,75) foi totalmente consumido. Além disso, observou-se mancha diferente dos materiais de partida (isoniazida R*f*= 0,30) com valor de R*f* igual a 0,10. Além disso, o caráter mais polar dessa mancha é outro indicativo da obtenção do produto de interesse.

O RMN ^{13}C (Espectro 32) apresentou excesso de sinais, o que mostra que apesar da CCD apresentar apenas uma mancha, há a presença de impurezas no produto desta reação. Observam-se no espectro, ainda, sinais relativos ao material de partida, o intermediário IC, como os carbonos relativos à lactona do ácido málico protegido, que não sofreu a desproteção, em 25,01 e 25,72 ppm, referentes às metilas da proteção, bem como o sinal em 110,11 ppm do carbono 5 da lactona. Observam-se sinais duplicados dos carbonos C_2 e C_3 do ácido málico em 36 ppm e 70-68 ppm, o que mostra que há tanto o intermediário IC como o produto de interesse. É possível constatar os sinais do foco central devido à presença dos sinais, também duplicados, em 26, 28-29 ppm e 36-37 ppm, que correspondem, respectivamente aos carbonos 3A-3B, 2A-2B e 1A-1B, do intermediário IC e do pró-fármaco dendrimérico de isoniazida. Com relação ao fármaco observam-se os sinais 163, 121 e 150 ppm, que são relativos à carbonila 5C e os carbonos aromáticos 7C e 8C. O espectro apresenta cinco grupos carbonílicos, dois deles referentes a C_1 e C_4 do intermediário IC em 167,47 e 172,61 ppm. Com relação ao produto, existem as carbonilas em 171, 169 e 163 ppm, relacionados aos carbonos 1C, 4C e 6C. Portanto, com esse método obteve-se o

produto de interesse ainda que impuro. Tentou-se a purificação desse composto por coluna cromatográfica (acetato de etila e metanol em gradiente de concentração), no entanto, o composto mostrou-se muito polar, apresentando grande interação com a sílica, não sendo possível recuperar o material de interesse. Desta forma, necessita-se aprimorar a purificação desse produto.





Espectro 32: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-$_{d6}$) do produto impuro da reação do intermediário IC (AMP-hexanodiamina) e isoniazida.

4.4 SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS – MÉTODO CONVERGENTE

O método convergente inicia-se com a síntese das ramificações, para posterior ligação ao núcleo. O intermediário II é composto pela formação do éster entre 3-hidroxiflavona e o ácido málico protegido. Em seguida, este intermediário sofrerá a desproteção da lactona do AMP, levando à formação do intermediário III (ramificação), que, posteriormente, será ligado ao foco central para a obtenção dos respectivos dendrímeros.

4.4.1 **Síntese do intermediário II**

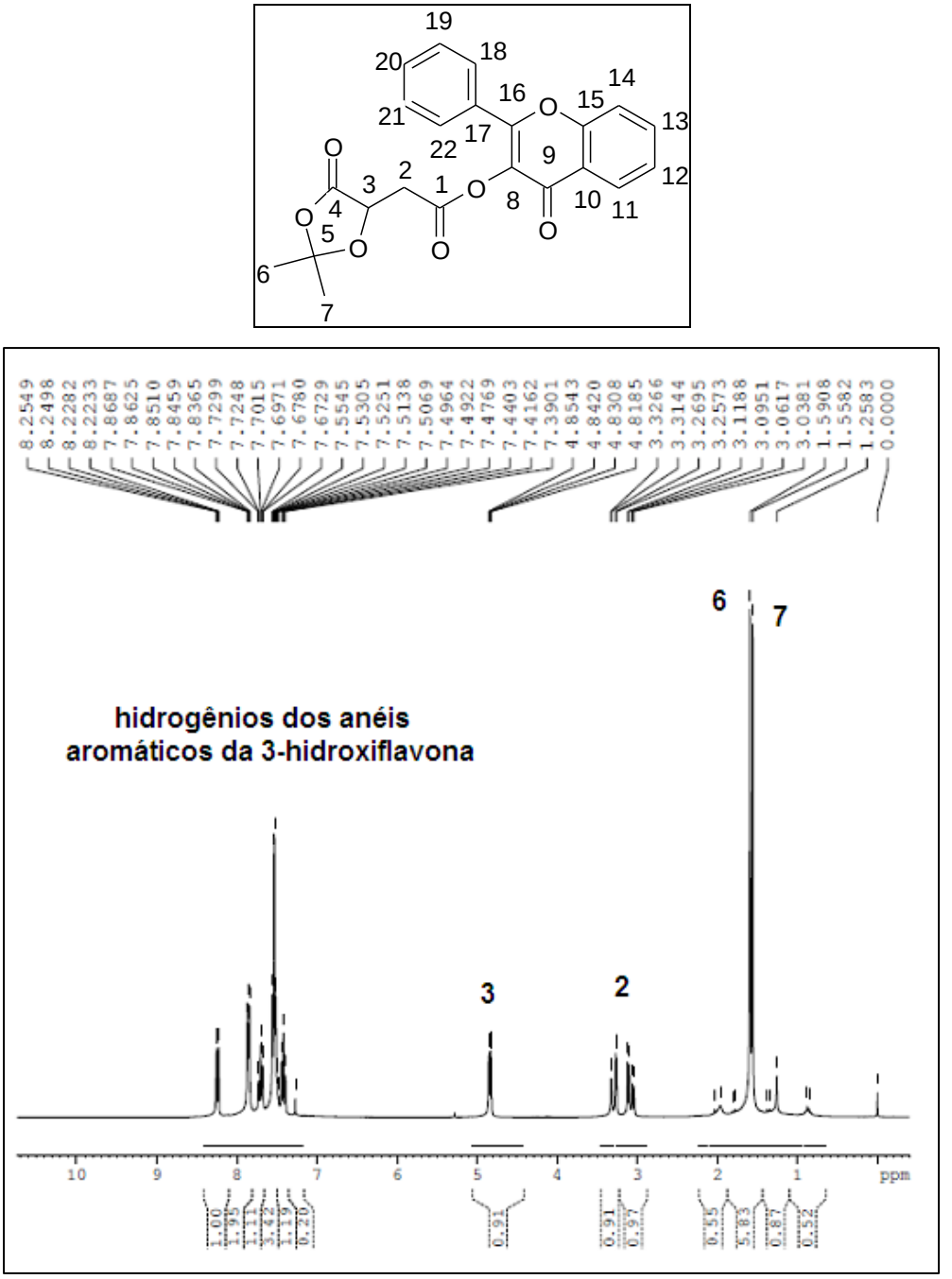
A cromatografia de camada delgada do intermediário II mostrou duas manchas com Rf iguais a 0,61 e 0,76. Estes valores foram diferentes dos observados para os materiais de partida 3-hidroxiflavona, 0,81 e ácido málico protegido, 0,23, o que é indicativo de que o intermediário II desejado foi obtido. Este produto foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando eluente hexano/acetato de etila com gradiente de concentração dos solventes, como descrito anteriormente.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 33) apresentou sinais em 1,55 e 1,59 ppm, relacionados às metilas da lactona presente na proteção do ácido málico protegido. Os sinais próximos de 3,25 e em 4,80 ppm, relativos aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do agente espaçante, e os sinais na região de 7-8 ppm se referem aos hidrogênios característicos dos anéis aromáticos da 3-hidroxiflavona. Esses sinais indicam que o intermediário II foi obtido.

Além disso, observaram-se no espectro de RMN ^{13}C (Espectro 34) sinais relacionados ao intermediário II, como em 25,82 e 26,78 ppm, correspondentes às metilas do ácido málico protegido. Ainda em relação ao espaçante, os sinais em 36,24 ppm (C_2), em 70,55 ppm (C_3) e em 111,39 ppm (C_5) o caracterizam. Em adição, existem sinais na região entre 118-155 ppm, que indicam a 3-hidroxiflavona. Ademais, no espectro de RMN ^{13}C observam-se sinais em 171 ppm, relativos à função éster formada entre o álcool da 3-hidroxiflavona e o ácido carboxílico do ácido málico protegido e que, também, correspondem à carbonila da lactona do AMP.

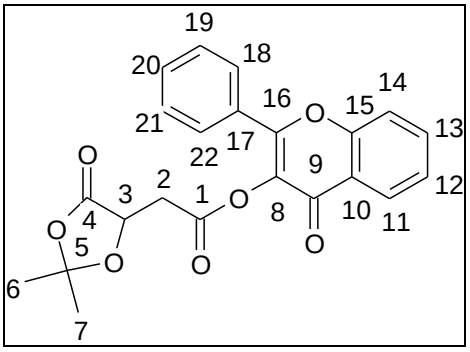
O espectro no IV (Espectro 35) é mais uma evidência de obtenção do intermediário II. Neste espectro, observam-se bandas de estiramento relacionadas à 3-hidroxiflavona em 3070, 1653 e 1566 cm^{-1} referentes, respectivamente, a CH aromático, carbonila e dupla ligação conjugada da 3-hidroxiflavona, bandas que caracterizam a presença deste composto bioativo. Também, observam-se bandas fortes de estiramento de CH alifático em 2938 e 2989 cm^{-1}, relativas às metilas da lactona. Em adição, são evidentes as bandas em 1787 e 1762 cm^{-1}, relacionadas à presença de carbonila de lactona e da função éster formada, respectivamente.

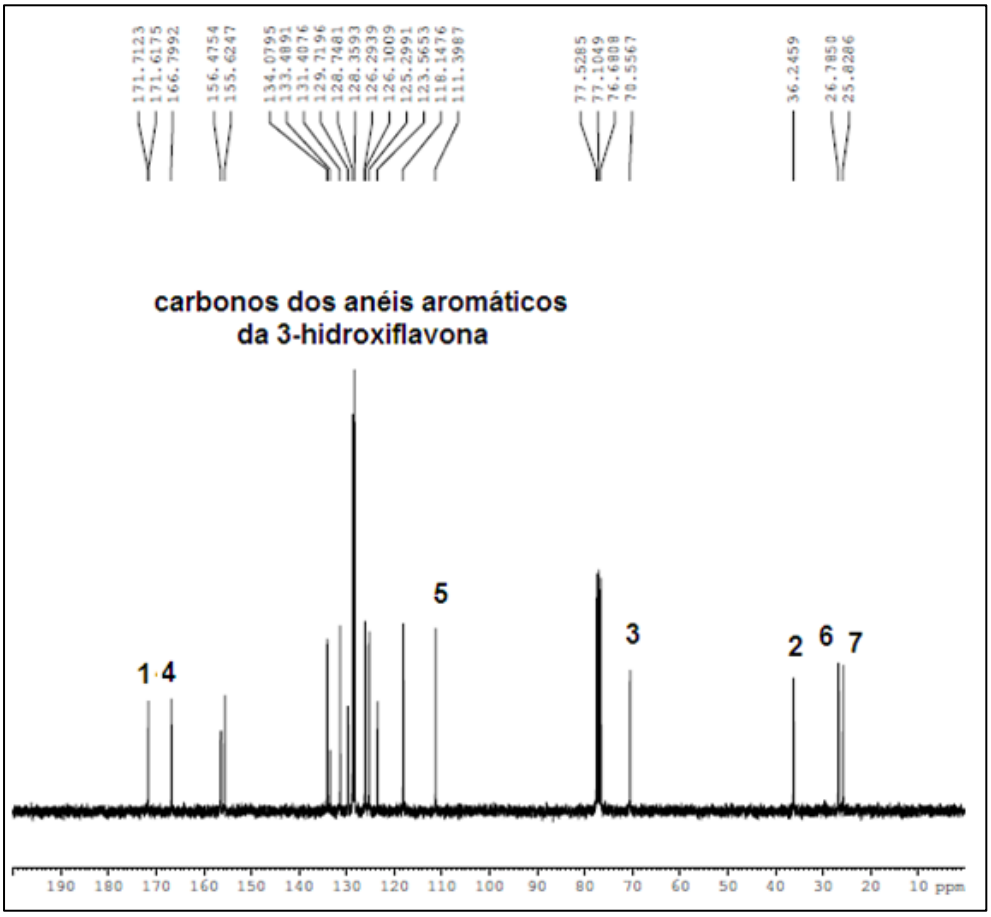
O mecanismo de reação utilizado para a síntese do intermediário II, a partir de anidridos mistos, é apresentado na Figura 52. O produto final foi obtido com 60% de rendimento e é um sólido amorfo amarelo claro, solúvel em clorofórmio e diclorometano.



Espectro 33: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do intermediário II.

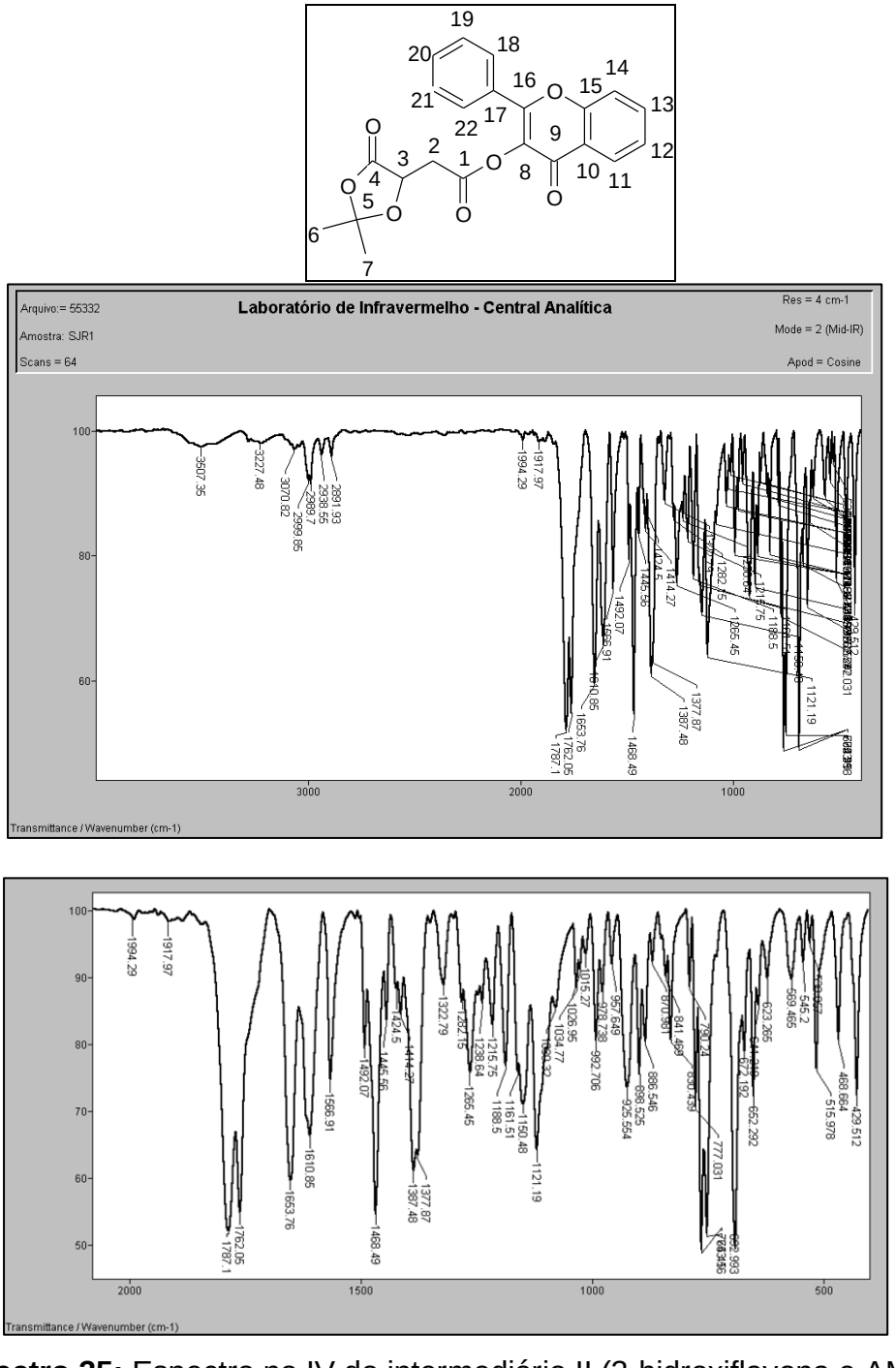
RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ
7,39 ($CDCl_3$); 1,55, 1,59 (s, 6H, H_6, H_7); 3,03 (dd, 1H, H_2, J = 17 Hz, J = 6 Hz); 3,25 (dd, 1H, H_2, J = 17 Hz, J=3 Hz); 4,84 (dd, 1H, H_3, J = 6 Hz, J = 3 Hz); 7,41-8,25 (m, H_{11} – H_{22}).





Espectro 34: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do intermediário II.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75 MHz, δ
77,00 ($CDCl_3$); 25,82 (C_7); 26,78 (C_6); 36,24 (C_2); 70,55 (C_3); 111,39 (C_5); 118,14 (C_{14}); 123,56 (C_{10}); 125,29 (C_{12}); 126,10 (C_{11}); 126,89 (C_{18}); 128,35 (C_{20}); 128,74 (C_{22}); 129,71 (C_{19}); 131,40 (C_{21}); 133,48 (C_{17}); 134,07 (C_8); 155,62 (C_{15}); 156,47 (C_{16}); 166,79 (C_9); 171,61 (C_4); 171,71 (C_1).



Espectro 35: Espectro no IV do intermediário II (3-hidroxiflavona e AMP).

IV (ν, KBr, cm^{-1})
3070 (ν CH aromáticos); 2989 e 2938 (ν CH_3 lactona); 1787 (ν $_{C=O}$ lactona); 1762 (ν $_{C=O}$ éster); 1653 (ν $_{C=O}$ flavona); 1610 e 1566 (δ $_{C=C}$ aromáticos); 1468 (δ CH_2 angular assimétrica); 1215 (ν $_{C-O}$ éster); 777 (δ CH_2 angular assimétrica).

4.4.2 **Desproteção do intermediário II, obtenção do intermediário III**

Com a obtenção do intermediário II, partiu-se para a etapa seguinte, a síntese do intermediário III. Esta etapa consiste na desproteção dos grupos álcool e ácido carboxílico do ácido L(-)-málico protegido, para posterior ligação aos respectivos focos centrais. O mecanismo de reação pode ser observado na Figura 58.

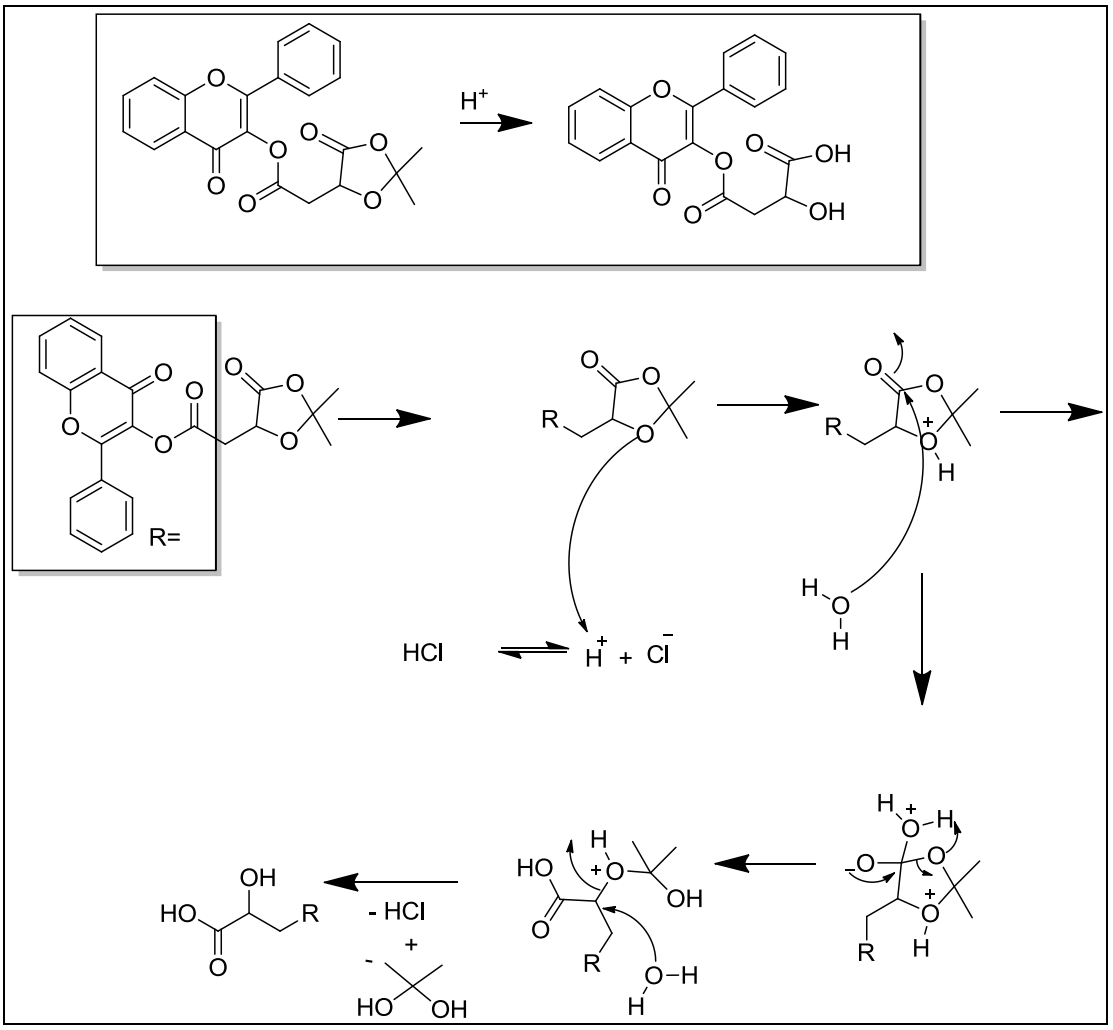


Figura 58: Mecanismo de reação da hidrólise da lactona do intermediário II (adaptado de BOMBARELLI, CALLE, CASADO, 2013).

Esta reação de hidrólise é muito sensível, ou seja, variações de tempo e nas condições de tratamento da reação promovem a hidrólise não apenas da lactona, mas, também, da ligação éster formada entre o ácido málico protegido e a 3-hidroxiflavona.

Diante desse problema, algumas condições reacionais foram testadas para hidrólise da proteção sem a hidrólise da função éster obtida e, para isso, realizaram-se algumas adaptações da patente de MANTELL (2007).

Com relação ao isolamento e à purificação do produto obtido, as condições testadas para remoção do ácido do meio reacional foram: lavagens exaustivas com etanol e posterior remoção do solvente sob pressão reduzida sucessivas vezes; extrações com água e acetato de etila seis vezes para obtenção do intermediário III. Estes testes foram realizados nos experimentos N2A e N2B. A melhor condição para a remoção da água e do ácido clorídrico presentes no meio reacional, que se não devidamente removidos continuam provocando a hidrólise do intermediário III, foi a extração com acetato de etila, pois o produto obtido apresentou-se mais puro. Com este resultado, o conteúdo reacional dos demais experimentos foi tratado por extração líquido/líquido com acetato de etila e água.

Essas reações de hidrólise são acompanhadas por cromatografia em camada delgada, sendo o principal indício da obtenção do intermediário III o desaparecimento na CCD da mancha referente ao intermediário II, que tem Rf de 0,61, e pelo surgimento de mancha na linha de base da placa cromatográfica, que não corre com o solvente.

No experimento N1, o tempo reacional foi de 21 horas. A cromatografia em camada delgada desta reação apresentou forte mancha com Rf 0,81, que corresponde à 3-hidroxiflavona, o que indica a hidrólise da ligação éster formada entre a 3-hidroxiflavona e o ácido málico protegido.

A partir do resultado obtido com o experimento N1, realizou-se o experimento N2, cujo tempo de reação foi de 9 horas. A placa cromatográfica apresentou forte mancha com Rf da 3-hidroxiflavona e, também, forte mancha que não corre em CCD. A partir desse achado, realizou-se o método N3, com tempo de reação de 6 horas. A cromatografia desse experimento apresentou leve mancha com Rf 0,81 e forte mancha na base da CCD. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 36) não apresentou sinais em 1,55 e 1,59 ppm, o que indica a hidrólise da lactona do ácido málico protegido. Ainda em relação a este último, observou-se sinal alargado na região de 6,00 ppm, indicando o hidrogênio da hidroxila liberada na hidrólise da proteção, e também, sinais próximos de 2,90 e 3,00 ppm e em 4,80 ppm, que caracterizam a presença do ácido málico. Além

disso, no espectro são evidentes os sinais entre 7-8 ppm, referentes aos hidrogênios da 3-hidroxiflavona. Dessa forma, o espectro mostra a obtenção do intermediário III por esse método. O produto foi obtido com rendimento de 50%.

Este composto foi analisado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinação da pureza cromatográfica (CLAE). A curva de calibração e o estabelecimento do método fizeram parte dos trabalhos de Iniciação Científica e Doutorado respectivamente, das alunas Júlia e Lorena Paes, que colaboraram com esta análise.

A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água/ácido trifluoracético (40:60:0,1, v/v/v). Nesta fase móvel, o tempo de retenção do intermediário III (3OH-AM) foi de 7,170 minutos. O cromatograma revelou, ainda, a presença do material de partida utilizado para hidrólise, o intermediário II, composto por 3-hidroxiflavona e ácido málico protegido (3OH-AMP), que apresenta tempo de retenção de 19,032 minutos, e, também, 3-hidroxiflavona (3OH-flavona), resultante da hidrólise da ligação éster com tempo de retenção de 17,741 minutos. A análise em CLAE determinou a pureza de 94,7% do intermediário III, sendo a porcentagem restante referente ao intermediário II e à 3-hidroxiflavona, correspondente, respectivamente, a 4,13 e a 5,81% do produto analisado (Figura 59).

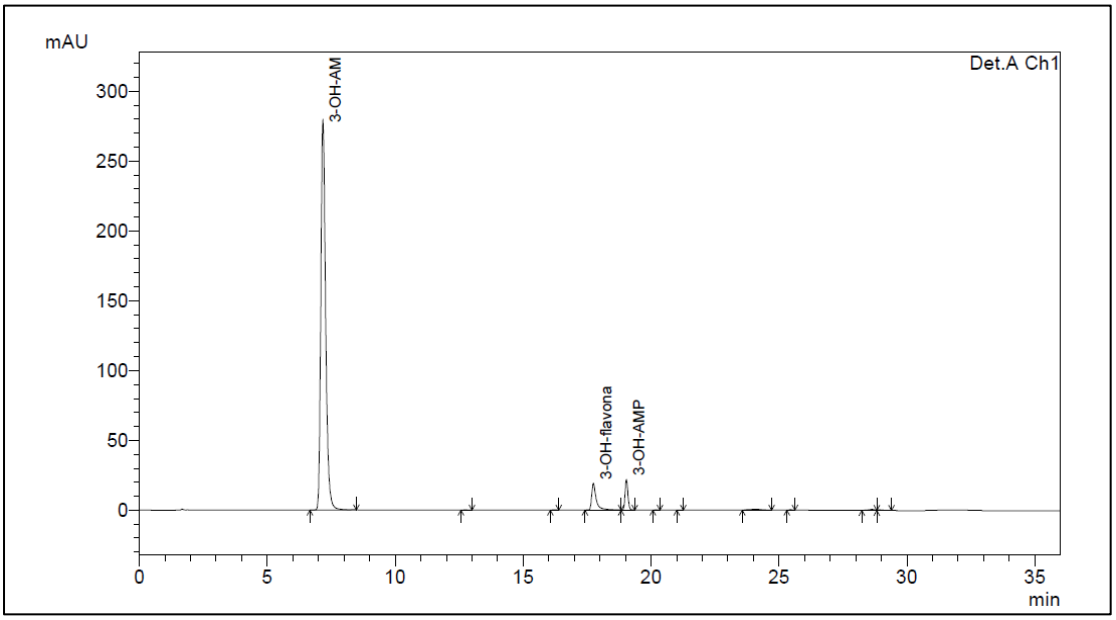
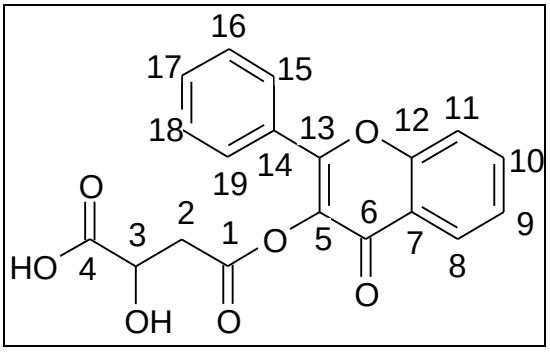
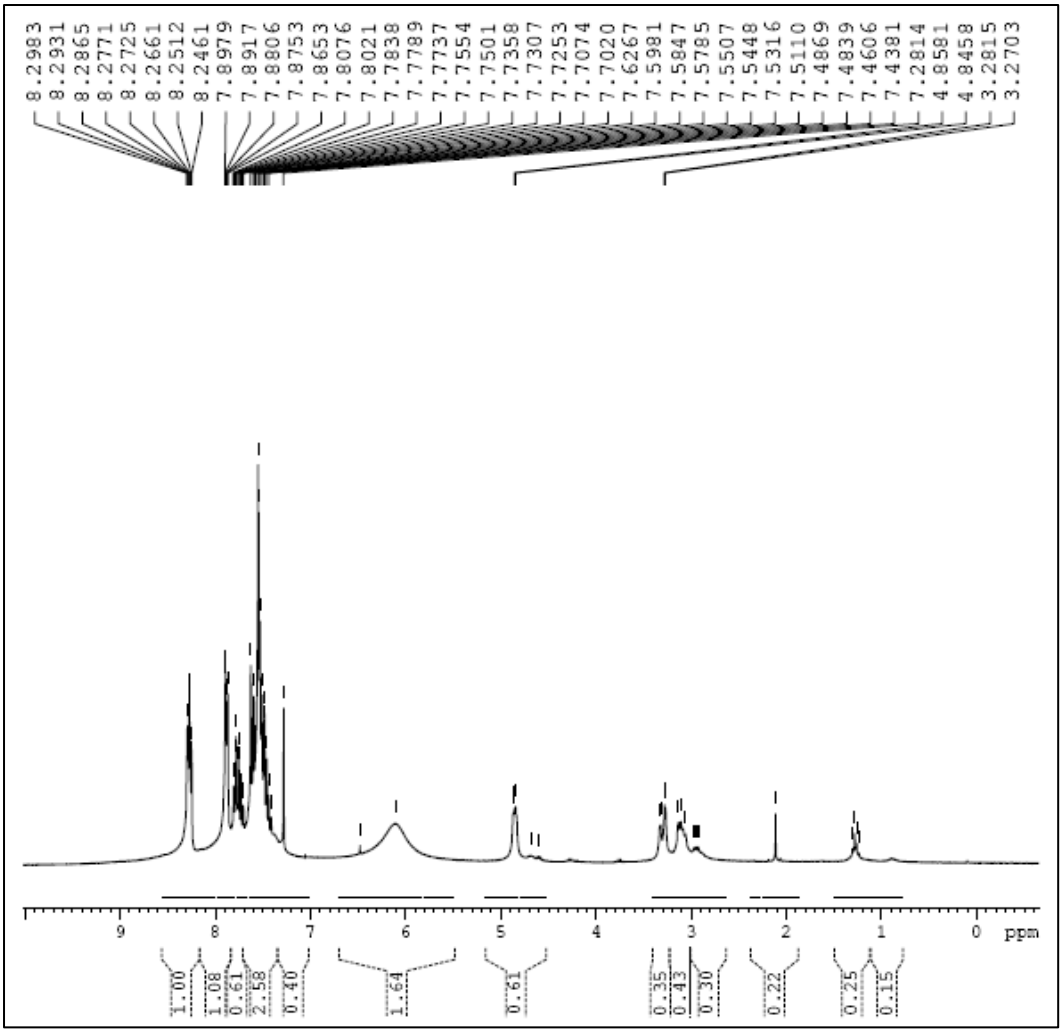


Figura 59: Cromatograma de CLAE do intermediário III (3OH-AM).





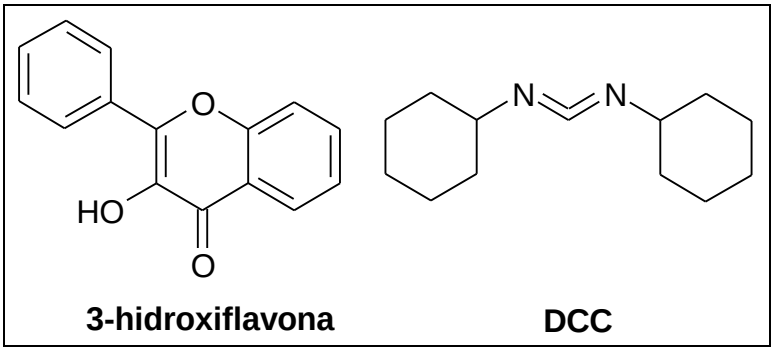
Espectro 36: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto da reação entre 3-hidroxiflavona e ácido málico, obtido após a hidrólise da lactona.

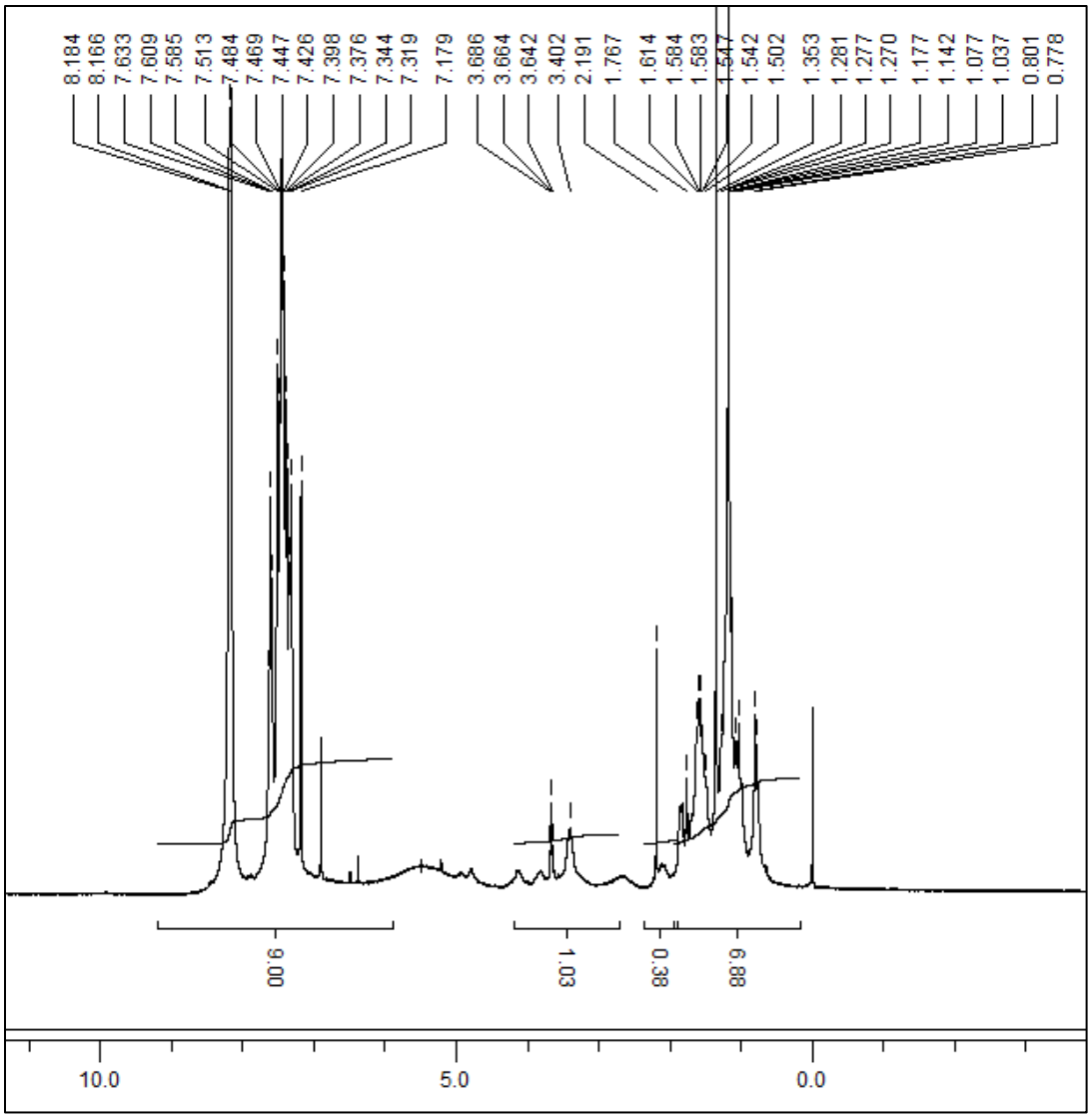
RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ
7,28 ($CDCl_3$); 3,27 (dd, 1H, H_2, J = 17 Hz, J = 3 Hz); 4,84 (dd, 1H, H_3, J = 17 Hz, J = 3 Hz); 7,43-8,29 (m,H_{11} – H_{22}).

4.4.3 **Ligação do intermediário III ao foco central etilenodiamina**

Com as evidências de obtenção do intermediário III, partiu-se para a etapa de ligação ao foco central para a síntese do dendrímero de 3-hidroxiflavona. Neste caso, utilizou-se a etilenodiamina como foco central. Este foco central foi utilizado como modelo. Esta reação foi realizada com o uso de DCC e DMAP, como agente condensante e catalisador, respectivamente.

Após 22 horas de reação, a cromatografia em camada degada não mostrou a formação de mancha diferente dos materiais de partida, o que indica que não se obteve o composto desejado. Ainda com relação ao meio reacional, não se observou a formação do DCU, outro indício que a reação de acoplamento não aconteceu (Figura 56). Além disso, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 37) revelou apenas os sinais relativos à 3-hidroxiflavona na região entre 7 e 8 ppm. Adicionalmente, os sinais na região entre 1 e 2 ppm estão relacionados aos hidrogênios dos anéis alifáticos do condensante DCC, material de partida para a reação de acoplamento. A ausência dos sinais dos hidrogênios do ácido málico entre 2,80 e 3,00 ppm e, também, em 4,70 ppm, sugere que houve a degradação do produto. O intermediário III se mostrou altamente instável, especialmente em condições básicas. Portanto, este método não foi eficiente para a síntese do pró-fármaco dendrimérico de 3-hidroxiflavona, com etilenodiamina como foco central.



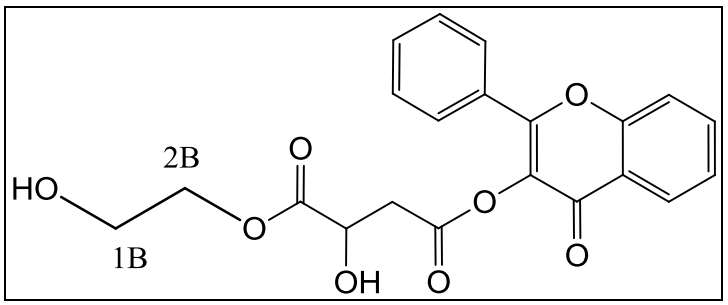


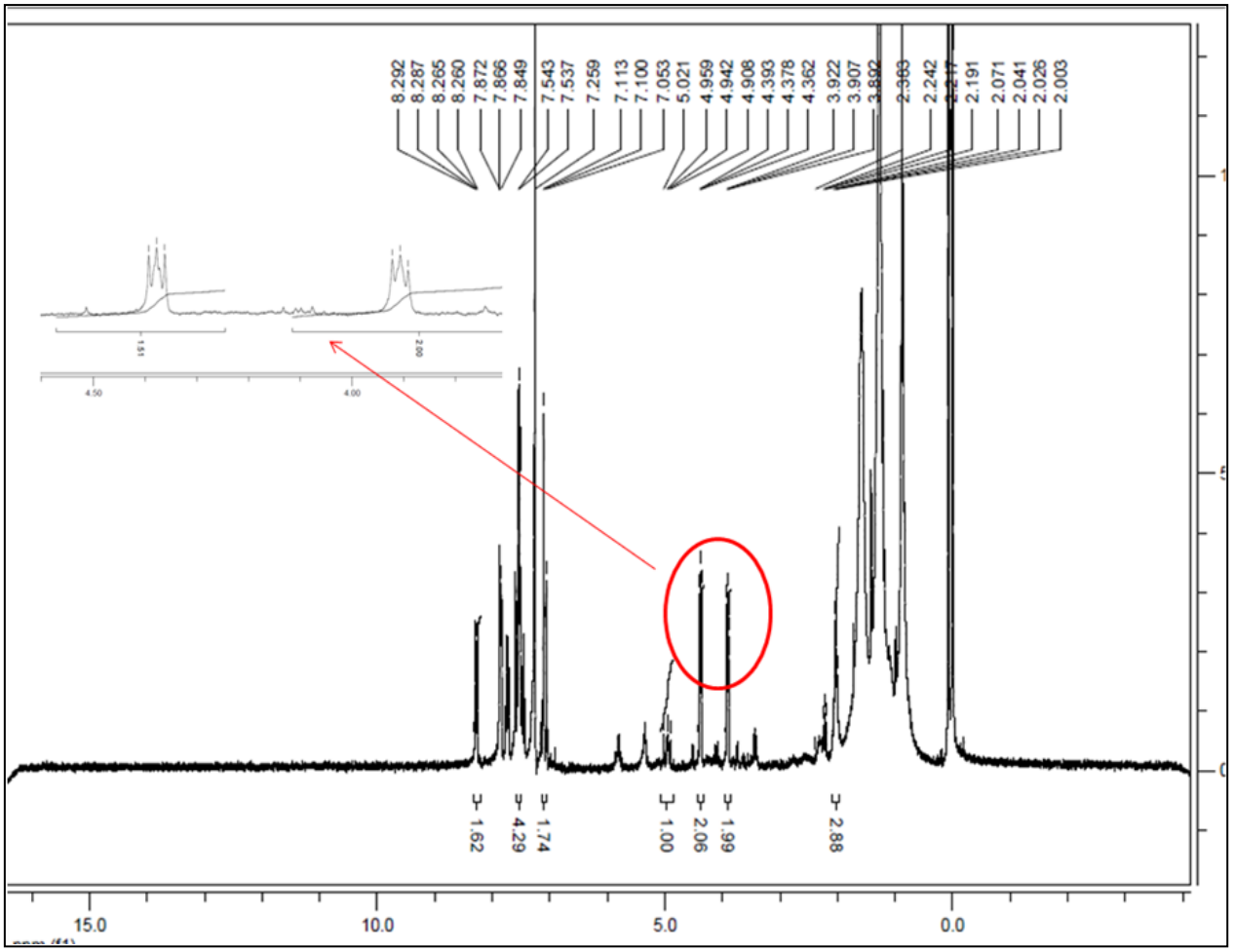
Espectro 37: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre o intermediário III e etilenodiamina, síntese do pró-fármaco dendrimérico de 3-hidroxiflavona com etilenodiamina (núcleo), obtido com o uso de DCC, como agente condensante.

4.4.4 **Ligação do intermediário III ao foco central etilenoglicol**

Com a obtenção do intermediário III, realizou-se outra tentativa de ligação do intermediário 3-hidroxiflavona e ácido málico ao foco central, utilizando-se etilenoglicol. Optou-se por utilizar o etilenoglicol, pois nos trabalhos de estabilidade do intermediário III (dados não apresentados), este composto apresentou grande instabilidade em meios básicos. Desta forma, evitou-se o uso de aminas, que poderiam promover basicidade no meio reacional. Para a reação de esterificação do intermediário III ao núcleo, o método realizado consiste no uso de EDC, como agente condensante. Devido à instabilidade do intermediário III em meio básico, optou-se por não utilizar o aceptor de próton amínico DMAP. O mecanismo de reação pode ser visualizado na Figura 55.

O intermediário III apresenta sensibilidade à temperatura, o que provoca a sua hidrólise, observando-se a liberação de 3-hidroxiflavona na CCD. Desta forma, realizou-se o experimento em banho de gelo. O acompanhamento da reação em CCD mostrou a presença de duas manchas no meio reacional, uma delas correspondente à 3-hidroxiflavona (R*ƒ* 0,81) e a outra com R*ƒ* equivalente a 0,91, que poderia estar relacionada ao pró-fármaco dendrimérico de 3-hidroxifavona. Esta mancha foi isolada em cromatógrafo automático Isolera Prime, em gradiente de concentração. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 38) da fração isolada após a cromatografia dá indícios da obtenção do pró-fármaco de 3-hidroxiflavona com uma ramificação. O RMN ^{1}H apresentou os sinais referentes à 3-hidroxiflavona na região entre 7 e 8 ppm. Além disso, observam-se os sinais dos hidrogênios 1B e 2B do foco central em 3,90 e 4,30 ppm, respectivamente. Com relação ao ácido málico, os sinais 4,90 ppm sugerem a presença do hidrogênio do grupo CH do agente espaçante. No entanto, apesar de ser o espectro da fração pura, observa-se excesso de sinais na região entre 1 a 2 ppm, o que dificulta a visualização dos demais hidrogênios relativos ao ácido málico. Apesar dos indícios de obtenção do pró-fármaco com uma ramificação, este método não foi eficiente para a purificação deste produto.





Espectro 38: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da fração isolada da coluna cromatográfica do produto obtido entre o intermediário III e etilenoglicol, síntese do pró-fármaco dendrimérico de 3-hidroxiflavona com etilenoglicol (núcleo), com o uso de EDC, como agente condensante.

4.5 SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS – OUTRAS ABORDAGENS

4.5.1 **Síntese do intermediário IV (ácido succínico e propanodiamina)**

O intermediário IV composto pela reação entre o anidrido succínico e a propanodiamina foi sintetizado com o intuito de obter um modelo para a síntese utilizando outros anidridos, que poderiam atuar como agentes espaçantes para os *dendrons*, como por exemplo, o anidrido do ácido málico protegido. O mecanismo da reação com a utilização do anidrido para a obtenção de amidas e ésteres é apresentado na Figura 51. Além disso, este intermediário poderia ser utilizado como foco central maior para os pró-fármacos dendríméricos. Neste caso, o ácido málico poderia ser ligado neste intermediário através de uma ligação éster entre a hidroxila do agente espaçante e as carboxilas do intermediário IV. Adicionalmente, com o intermediário IV é possível obter pró-fármacos de diferentes compostos bioativos. Algumas tentativas foram realizadas para a obtenção de diferentes pró-fármacos com este intermediário, usando como compostos bioativos 3-hidroxiflavona e metronidazol.

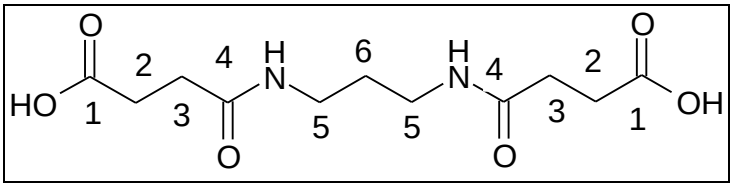
No experimento O1, utilizou-se anidrido succínico na proporção de 1:2,5 em acetonitrila sob refluxo e o isolamento do produto por filtração. Neste procedimento, observou-se que os materiais de partida não foram totalmente solubilizados no meio reacional. Além disso, após a filtração obteve-se mistura de compostos, como os materiais de partida e o intermediário IV de interesse. Devido a esse problema, testaram-se outros solventes. No experimento O2 utilizou-se THF e acetato de etila (como solventes), em temperatura ambiente e para o isolamento, o produto foi extraído com água e liofilizado. Nesta condição, também, constatou-se que alguns reagentes não estavam totalmente solúveis no meio reacional e o produto recuperado apresentou novamente mistura de compostos.

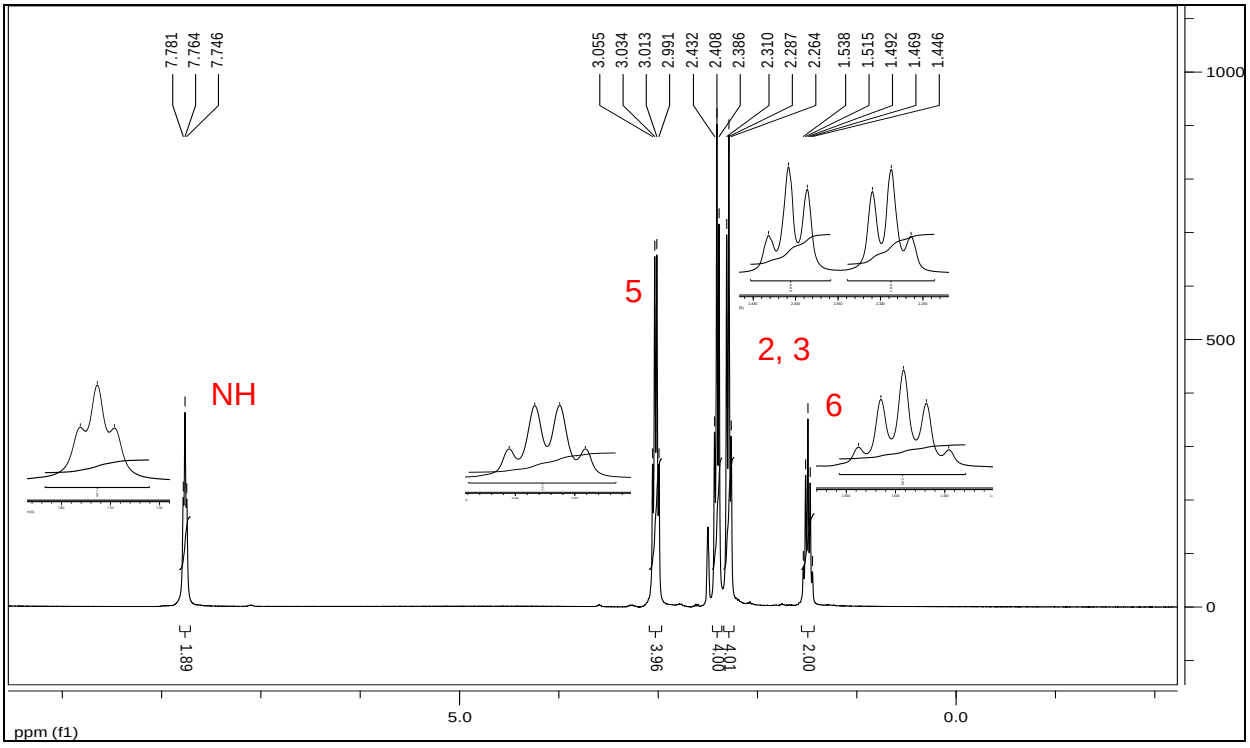
No experimento O3 utilizou-se apenas THF em temperatura ambiente e na proporção molar de anidrido succínico para propanodiamina de 2,5:1,0. Isolou-se o produto por filtração sob pressão reduzida com éter gelado. Nesta condição, observou-se melhor solubilização dos reagentes, mas não total. Então, optou-se por realizar esta reação nas mesmas condições sob refluxo a 60 °C para promover a solubilização total dos materiais de partida, o que caracterizou o experimento O4. Nestas condições, os

reagentes foram solubilizados no meio reacional e obteve-se o produto, mas, ainda com mistura de compostos.

Desta forma, realizou-se o experimento O5, em atmosfera inerte com THF sob refluxo a 60 °C e com grande excesso de anidrido succínico em relação à propanodiamina (9:1, respectivamente). O isolamento do produto consistiu em filtração com acetona gelada. Com esta metodologia, obteve-se o intermediário IV puro.

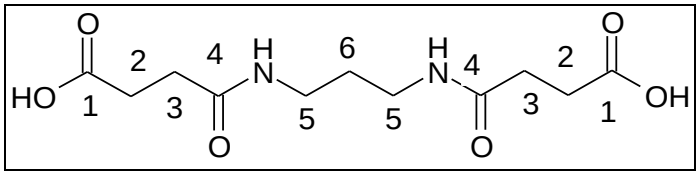
O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 39) mostrou os hidrogênios do ácido succínico, devido à presença dos tripletos em 2,29 e 2,41 ppm, referentes aos hidrogênios H_3 e H_2 do agente espaçante. Com relação à propanodiamina, observam-se os sinais em 3,02 ppm e em 1,49 ppm e o tripleto em 7,78 ppm, relativos aos hidrogênios H_5, H_6 e NH, respectivamente. No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 40) apareceram os sinais do ácido succínico em 29,15 e 30,01 ppm, relativos aos carbonos C_3 e C_2, bem como o sinal em 173,74 ppm, relacionado às carbonilas do ácido carboxílico livre (C_1). Ainda neste espectro, observaram-se os carbonos da propanodiamina em 36,30 e 170,83 ppm, referentes a C_5, e as carbonilas das amidas formadas entre os ácidos succínicos e a propanodiamina (C_4). O produto foi obtido com sucesso e apresentou aspecto de sólido de cor branca e rendimento de 91%.

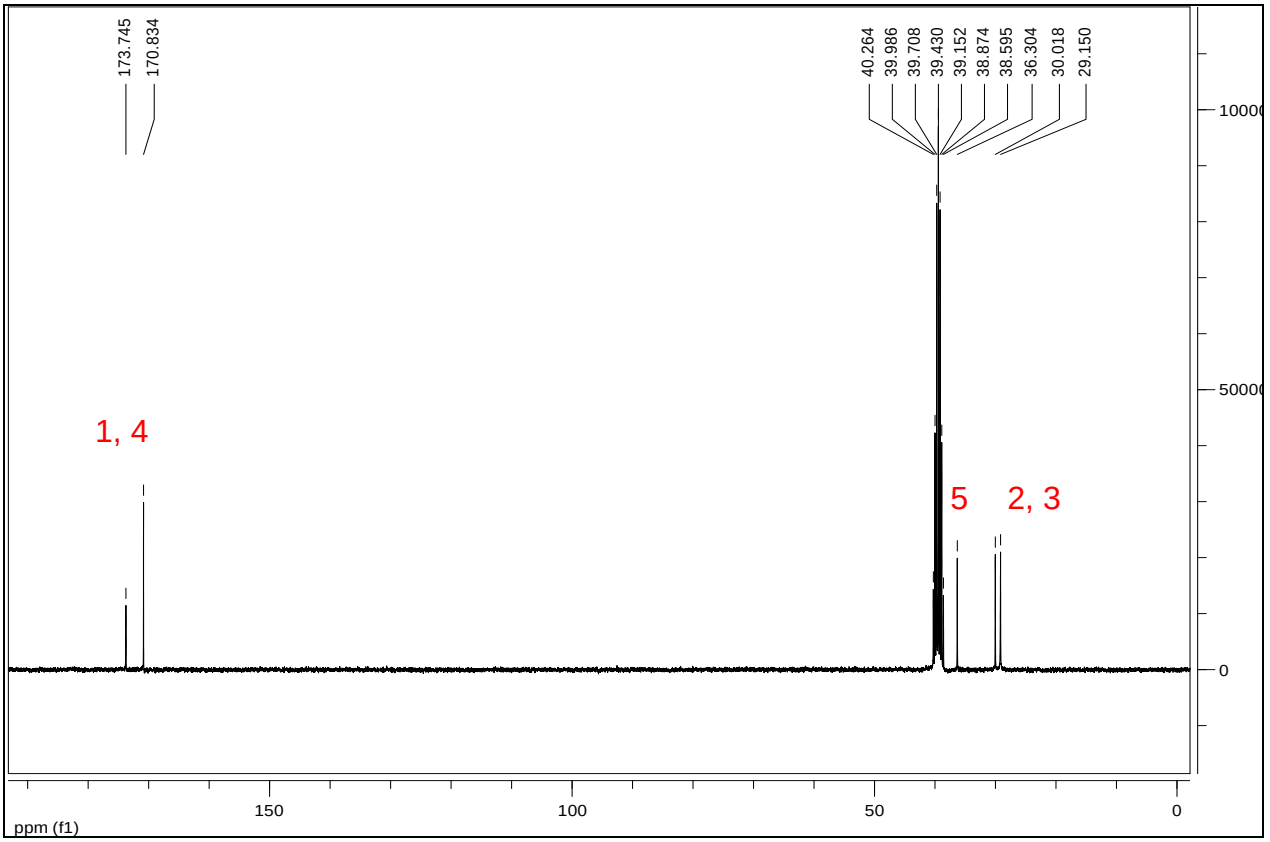




Espectro 39: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$_{d6}$) do intermediário IV formado pelo anidrido succínico e a propanodiamina, experimento O5.

RMN ^{1}H (DMSO-$_{d6}$), 300 MHz, δ
7,76 (t, 2H, J = 6 Hz); 3,02 (q, 4H, J = 6 Hz); 2,41 (t, 4H, J = 7 Hz); 2,29 (t, 4H, J = 7 Hz); 1,49 (q, 2H, J = 6 Hz).





Espectro 40: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-$_{d6}$) do intermediário IV formado pelo anidrido succínico e a propanodiamina, experimento O5.

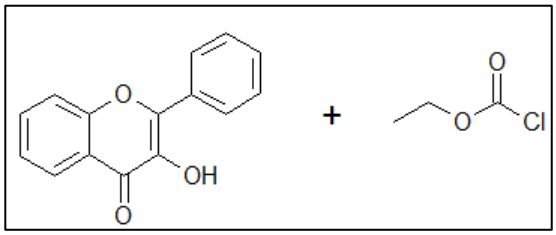
RMN ^{13}C (DMSO-$_{d6}$), 75 MHz, δ
39,46 (DMSO-$_{d6}$); 29,15 (C_3); 30,01 (C_2); 36,30 (C_5); 170,83 (C_4); 173,74 (C_1).

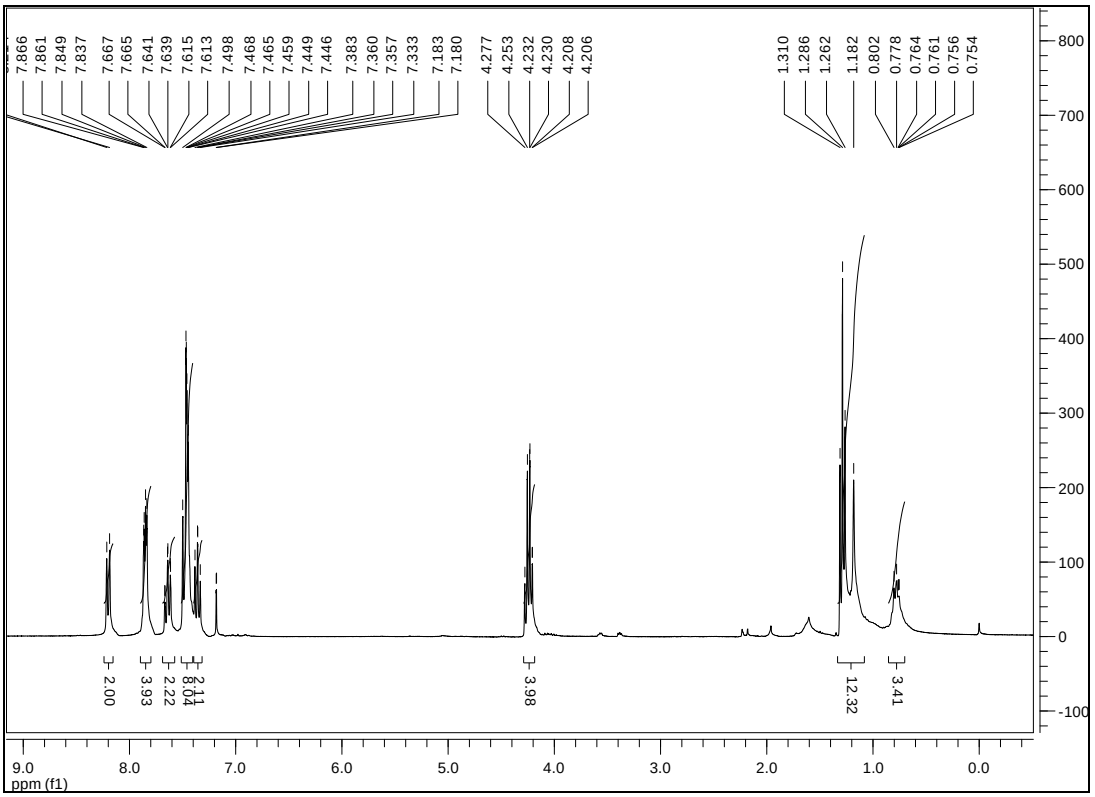
4.5.1.1 Síntese de pró-fármacos a partir do intermediário IV

4.5.1.1.1 *Método P*

No método P utilizou-se cloroformato de etila e *N*-metilmorfolina, a exemplo da síntese do intermediário II (Figura 52). No experimento P1 tentou-se a síntese do pró-fármaco formado pelo intermediário IV e a 3-hidroxiflavona. A cromatografia em camada

delgada desta reação apresentou apenas duas manchas com valores de R*f* 0,47 e 0,63, que correspondem, respectivamente, às manchas dos materiais de partida intermediário IV e 3-hidroxiflavona (fase móvel clorofórmio/metanol 1:9). O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 41) do produto isolado desta reação mostrou apenas os sinais relativos à 3-hidroxiflavona na região entre 7,1 e 8,2 ppm. Além disso, os sinais em 4,20 e 1,20 ppm são referentes aos hidrogênios CH_2 e CH_3, respectivamente, do cloroformato de etila utilizado na reação. Os sinais relacionados ao intermediário IV não estão presentes no espectro nas regiões entre 2 e 3 ppm. Portanto, com este método não se obteve o pró-fármaco de 3-hidroxiflavona.





Espectro 41: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre o intermediário IV e a 3-hidroxiflavona, experimento P1.

Face à dificuldade de obtenção do derivado com 3-hidroxiflavona e a instabilidade destes compostos no meio reacional, utilizaram-se métodos sintéticos com o intuito de obter pró-fármacos de metronidazol. Com este pró-fármaco, busca-se atividade antichagásica, já que o metronidazol apresenta ação antichagásica conhecida (MORELLO, 1988). Desta forma, o experimento P2 fez uso de metronidazol, como composto bioativo. Durante a reação, a cromatografia em camada delgada apresentou duas manchas, uma delas relacionada ao material de partida, metronidazol (Rf 0,82). A outra mancha com valor de Rf equivalente a 0,60 indicava a obtenção do pró-fármaco de metronidazol de interesse. Entretanto, após o processo de extração em que se utilizaram, sucessivamente, soluções: básica, salina e ácida, e novamente solução salina, a CCD apresentou única mancha relativa ao metronidazol. A fase aquosa foi analisada e a mancha de interesse não estava nesta fração. Com esta observação, concluiu-se que o produto, provavelmente, sofreu hidrólise durante o processo de extração.

A partir disso, realizou-se o experimento P3. Neste procedimento, também, observou-se a presença da mancha na CCD com Rf de 0,60, que poderia estar relacionada à obtenção do pró-fármaco de metronidazol. Para a extração, optou-se por não utilizar as soluções ácidas e básicas, que podem ter provocado a hidrólise do produto de interesse. Portanto, utilizou-se apenas a solução saturada de cloreto de sódio por várias vezes. No entanto, após a extração do produto, novamente, a CCD revelou apenas a mancha referente ao material de partida, metronidazol.

4.5.2 **Síntese de pró-fármacos dendriméricos derivados dos ácidos 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico (*Bis*MPA) e 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico (*Bis*MBA)**

Outra abordagem foi realizada para a síntese de pró-fármacos dendriméricos. Utilizaram-se, como *dendrons* e agentes espaçantes os ácidos 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico (*Bis*MPA) e 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico (*Bis*MBA) e os núcleos propano-, butano- e hexano-diamina, para a síntese de dendrímeros.

4.5.2.1 Proteção dos ácidos 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico e 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico – Síntese dos ácidos benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)propiônico e benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)butírico

A primeira etapa de síntese consiste na reação de proteção dos ácidos 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico e 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico, que são multifuncionais, e, desta forma, evitar reações cruzadas nas próximas estapas reacionais. O mecanismo de proteção está representado na Figura 60.

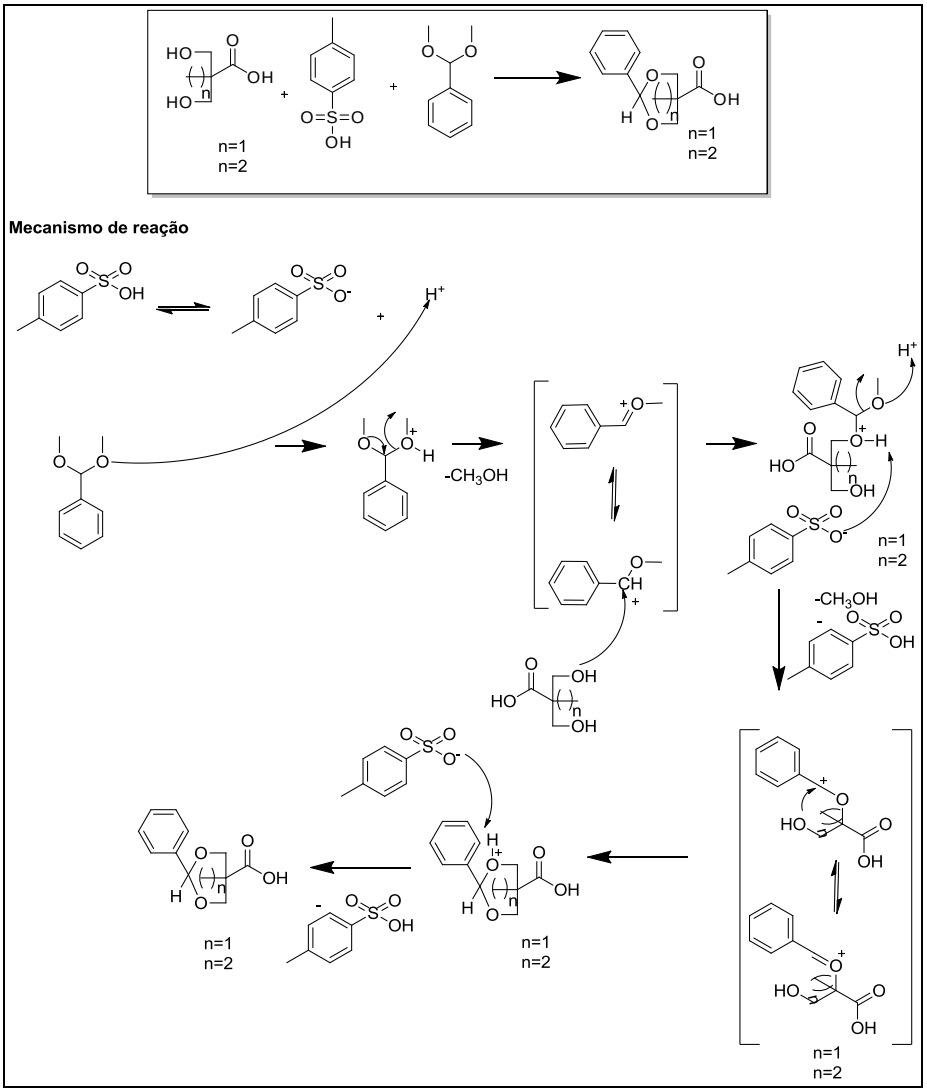


Figura 60: Mecanismo de reação para a proteção dos ácidos 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico e *bis*(hidroximetil)butírico (adaptado de CLAYDEN et al., 2008).

4.5.2.1.1 *Proteção do ácido 2,2*-bis*(hidroximetil)propiônico*

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 42) mostrou sinais relativos aos hidrogênios do grupo protetor benzilideno, devido à presença dos multipletos em 7,33-7,44 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos do grupo protetor. Ainda com relação ao grupo protetor, observa-se o singleto em 5,47 ppm relacionado ao hidrogênio do carbono 5 do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)propiônico.

Apesar dos hidrogênios geminais dos C3 (grupos metilenos) estarem em um mesmo ambiente químico, os mesmos conferem ao espectro um sinal bem definido de duplo dupleto. Este fenômeno ocorre, pois ambos os grupos metilenos não podem rotacionar em seu eixo de simetria nem por reflexão em seu plano, pois o grupo de proteção não permite a rotação (FRIEBOLIN; 1993). Desta forma, a Figura 61 mostra que os hidrogênios HA sentem maior efeito do campo magnético, oriundo da carbonila do ácido comparado aos hidrogênios HB, que se encontram em posição equatorial. A partir disto, pode-se dizer que a carbonila está desblindando mais os hidrogênios HA, o que leva ao deslocamento químico diferente dos hidrogênios HB no C3 (ALVES, 2016).

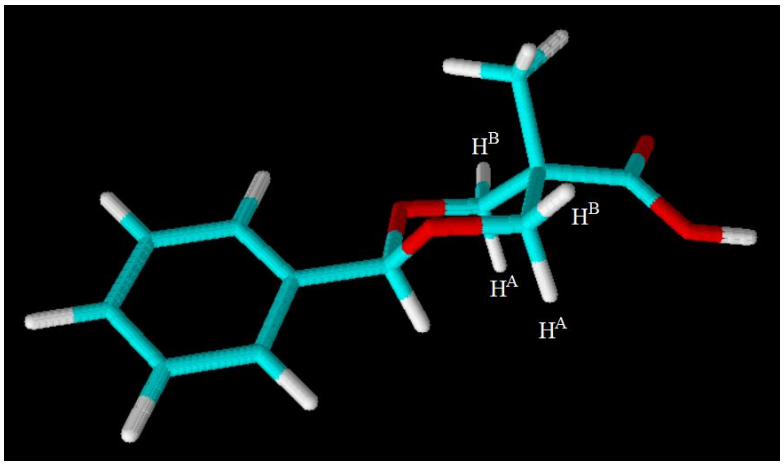
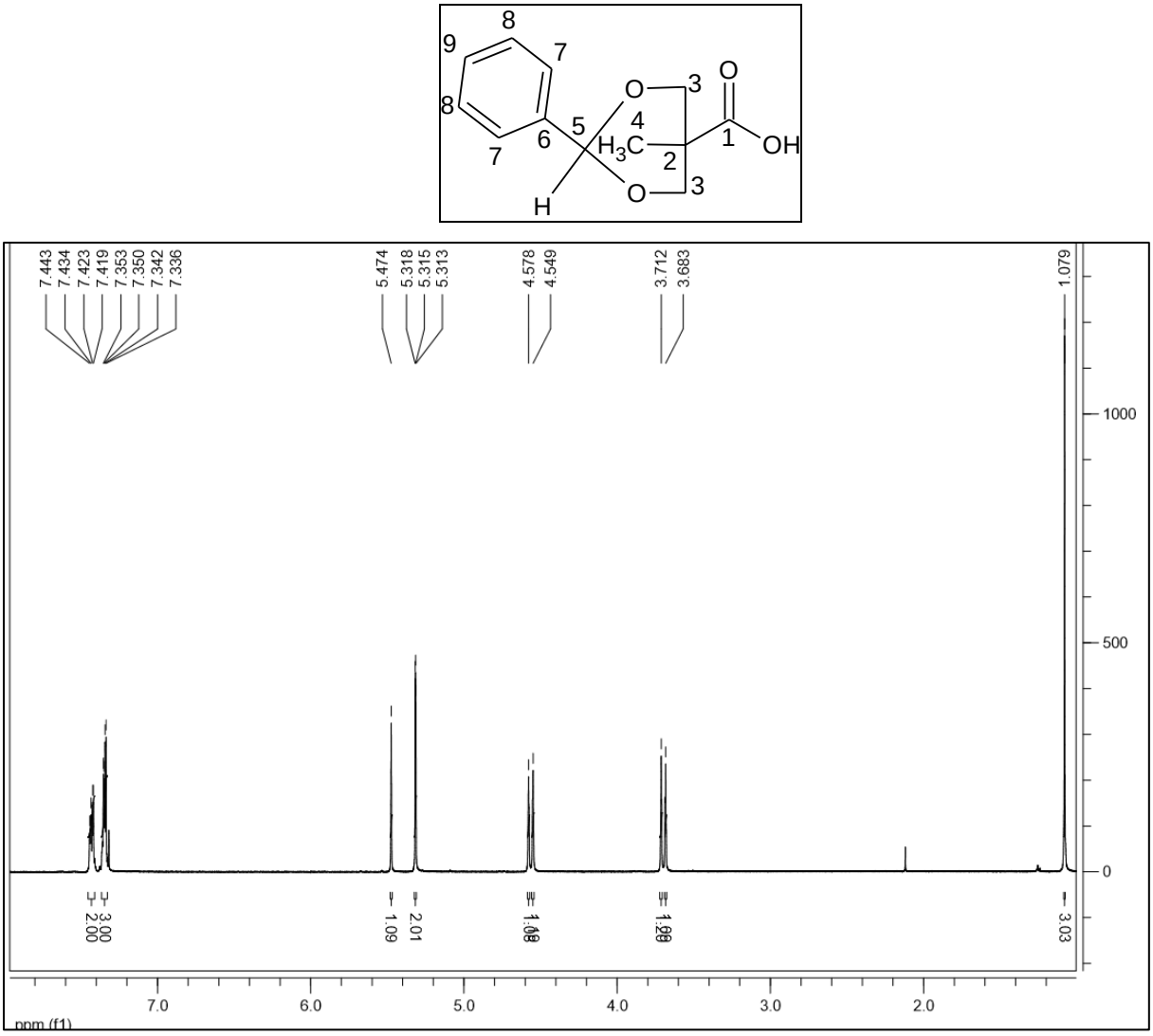


Figura 61: Estrutura tridimensional do *Bis*MPAP (ALVES, 2016).

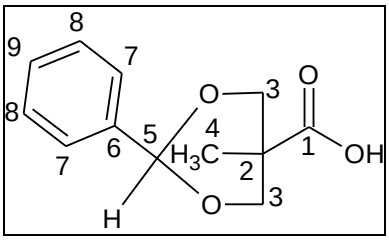


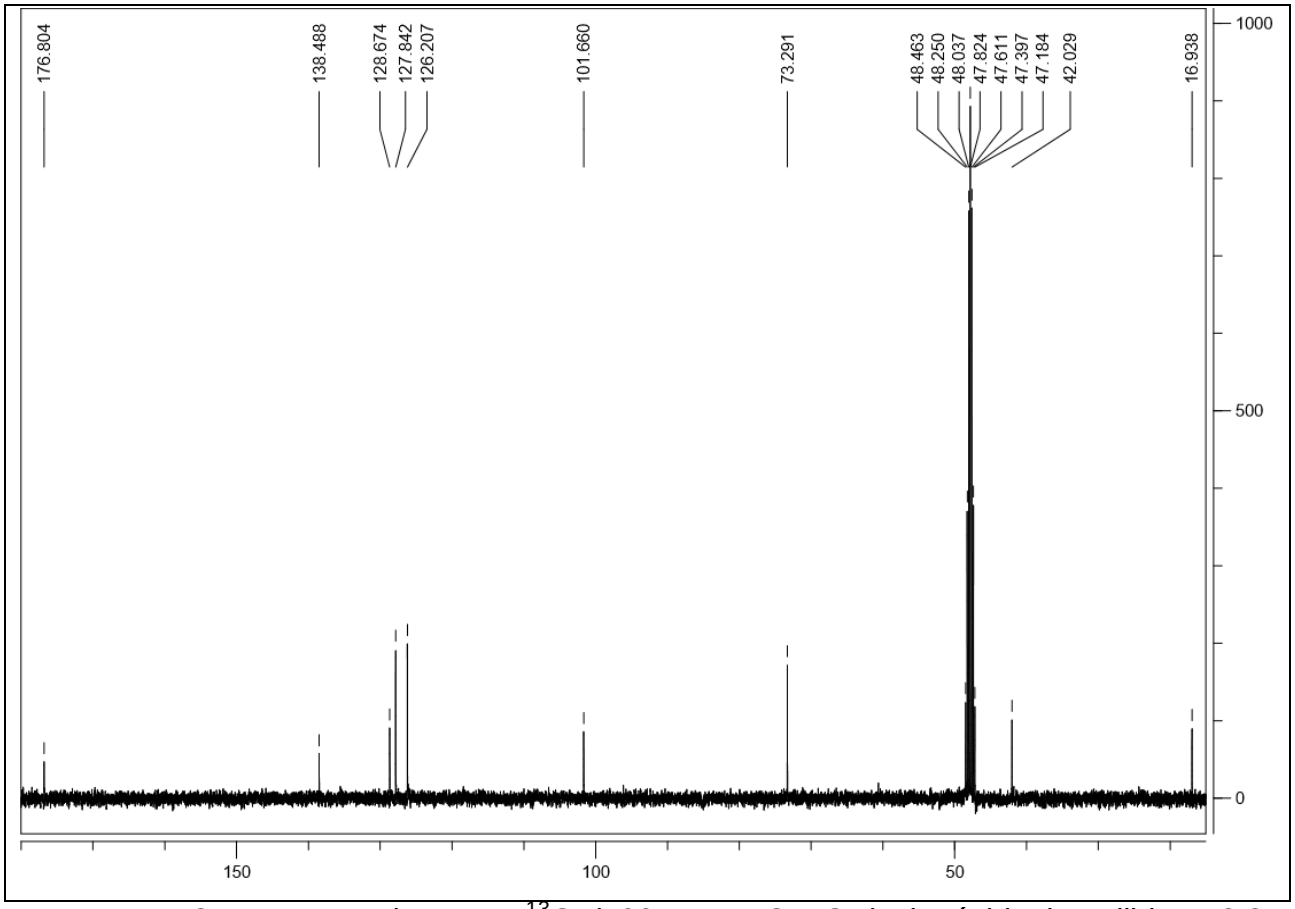
Espectro 42: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, CD_2Cl_2) do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)propiônico (*Bis*MPAP).

RMN ^{1}H (CD_2Cl_2), 400 MHz, δ
5,31 (CD_2Cl_2) 1,07 (s, 3H, H_4); 3,71 (d, 2H, H_3, J=11 Hz); 4,57 (d, 2H, H_3, J=11,6); 5,47 (s, 1H, H_5); 7,33-7,35 (m, 3H, H_8 e H_9); 7,41-7,44 (m, 2H, H_7).

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 43) é outra evidência da síntese do ácido 2,2-*bis*(oximetil)propiônico protegido (*Bis*MPAP). Neste é possível observar os carbonos do grupo protetor em 101,66 ppm, referente ao carbono 5. O espectro apresentou outros sinais relativos ao grupo protetor em 138,48, 126,20, 127,84 e 128,67 ppm, que se

referem, respectivamente, aos diferentes carbonos aromáticos C_6, C_7, C_8 e C_9. Portanto, o ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)propiônico ou *Bis*MPAP puro foi obtido com sucesso e apresentou aspecto de cristal de cor branca e rendimento em torno de 60%.





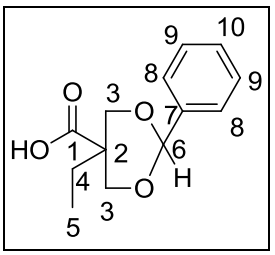
Espectro 43: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)propiônico (*Bis*MPAP).

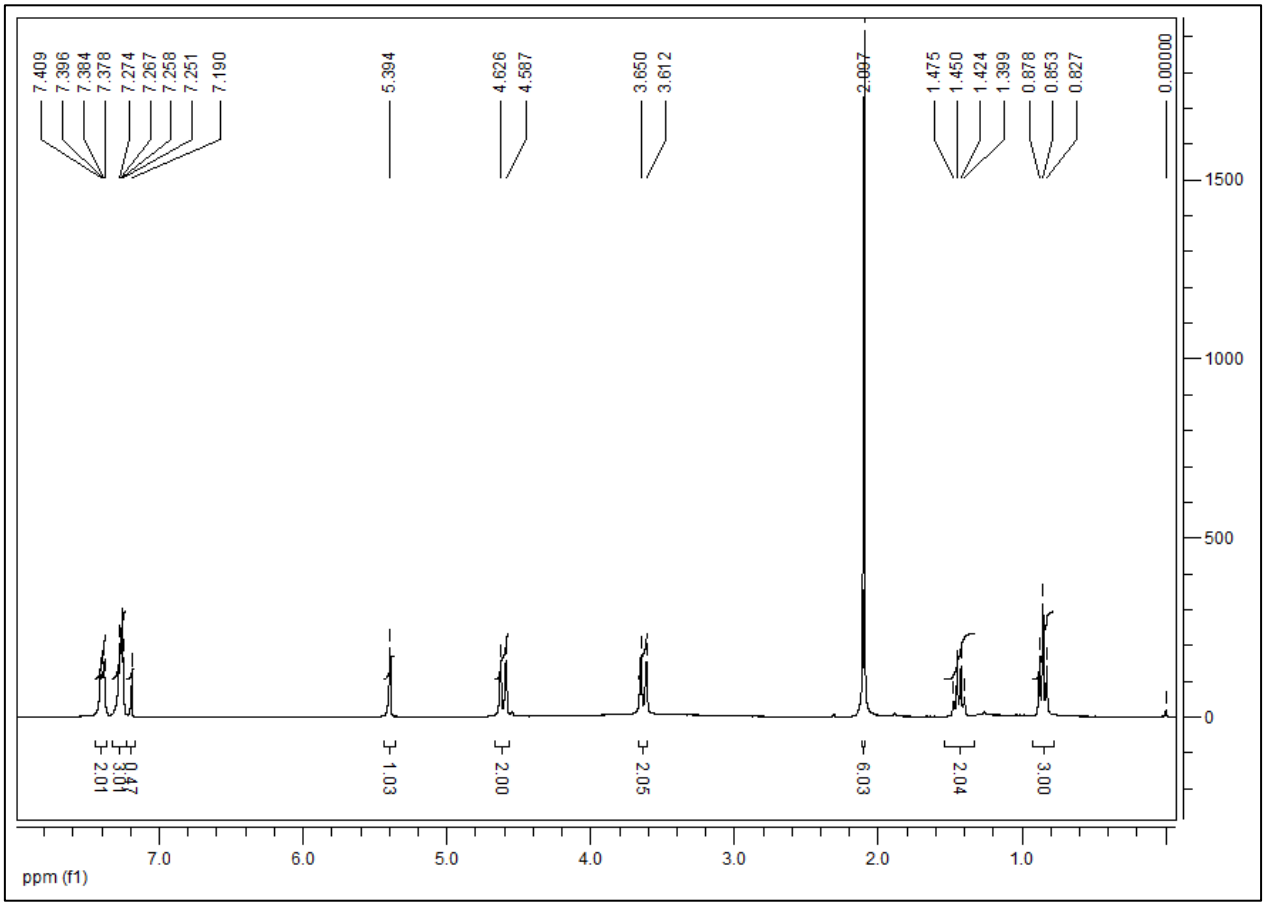
RMN ^{13}C (CD_3OD), 100 MHz, δ
48,00 (CD_3OD); 16,93 (C_4); 42,02 (C_2); 73,29 (C_3); 101,66 (C_5); 126,20 (C_7); 127,84 (C_8); 128,67 (C_9); 138,48 (C_6); 176,80 (C_1).

4.5.2.1.2 *Proteção do ácido 2,2*-bis*(hidroximetil)butírico*

A reação de proteção do ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)butírico foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. A CCD mostrou a formação de uma mancha com valor de R*f* equivalente a 0,35, de caráter mais apolar que o material de partida (R*f*= 0,09), o que indicou a formação do ácido benzilideno 2,2-*bis*(oximetil)butírico. Em adição, o RMN ^{1}H (Espectro 44) apresentou a presença dos hidrogênios aromáticos na região de 7,00 ppm e do hidrogênio H_6 em 5,39 ppm. Além disso, observaram-se os outros sinais característicos do agente espaçante em 0,85, 1,45, 3,65 e 4,58 ppm, que correspondem, respectivamente aos hidrogênios H_5, H_4 e H_3. Em 2,10 ppm observa-se um singleto pronunciado, relativo à acetona utilizada no meio reacional, que ainda apareceu no espectro.

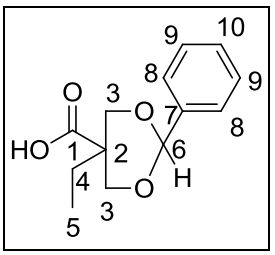
O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 45) do ácido benzilideno 2,2-*bis*(oximetil)butírico também é outra evidência de que o composto foi protegido, ao mostrar com clareza todos os sinais relacionados aos carbonos da proteção. O RMN ^{13}C apresenta os carbonos do grupo protetor em 102,11 ppm, referente ao carbono 6 e os sinais em 126, 128, 129 e 137 ppm, relacionados aos carbonos do anel aromático. O sinal em 178,97 ppm é relativo ao carbono carboxílico da estrutura. A partir destes espectros, pode-se dizer que o *Bis*MBAP foi sintetizado com êxito. Obteve-se o rendimento de 31% e o produto tem a característica de ser pó branco amorfo.

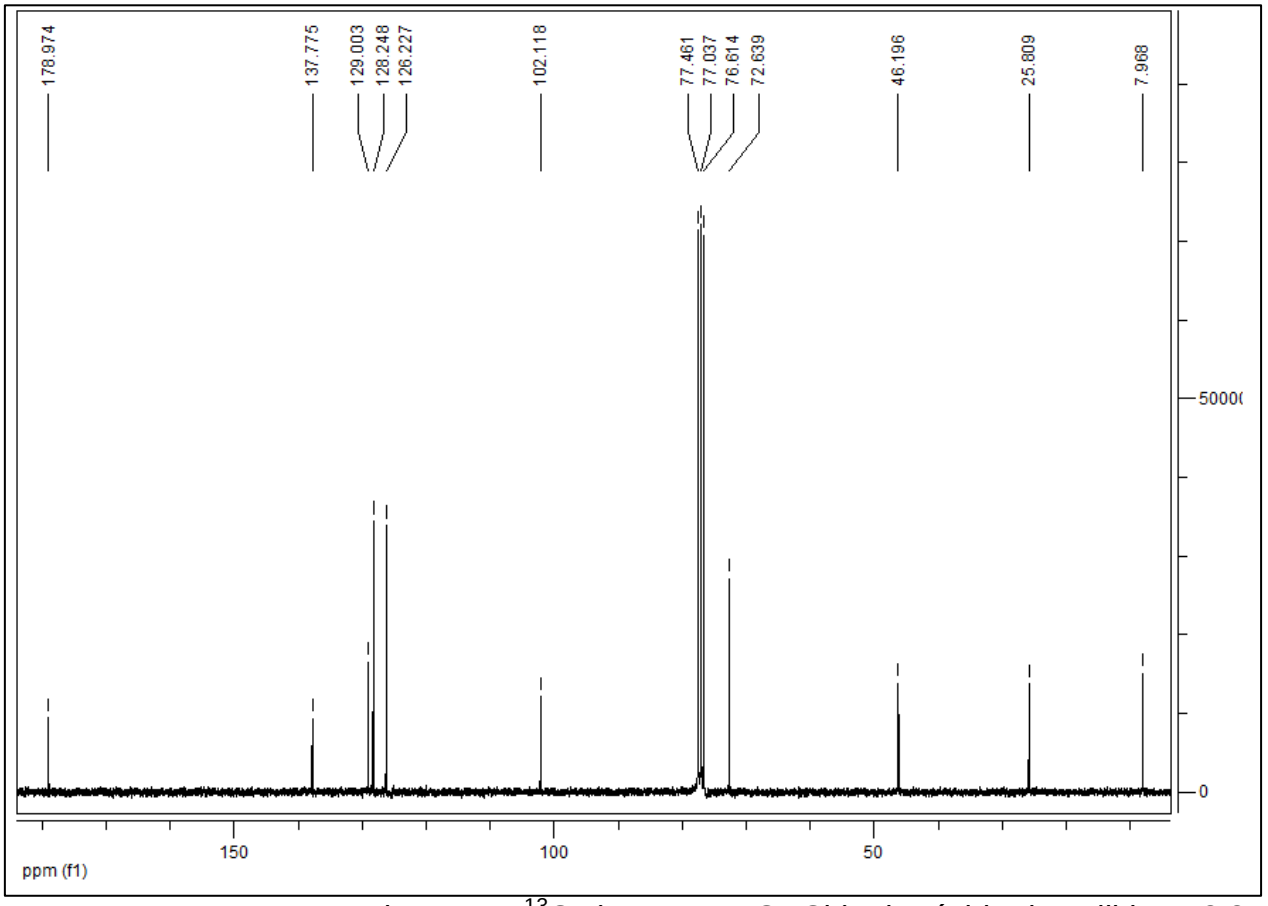




Espectro 44: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)butírico (*Bis*MBAP).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ
7,26 ($CDCl_3$) 0,85 (t, 3H, H_5, J=7 Hz); 1,45 (q, 2H, H_4, J=7 Hz); 3,65 (d, 2H, H_3, J=11); 4,62 (d, 2H, H_3, J=11 Hz), 5,39 (s, 1H, H_6); 7,25-7,27 (m, 3H, H_9 e H_{10}); 7,37-7,40 (m, 2H, H_8).





Espectro 45: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)butírico (*Bis*MBAP).

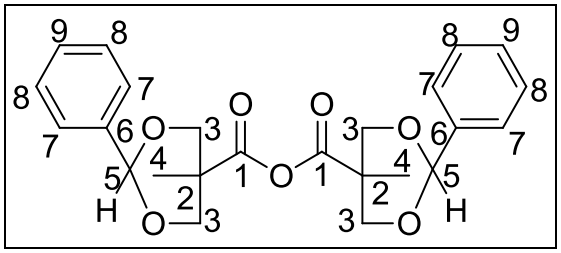
RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75 MHz, δ
77,00 ($CDCl_3$); 7,96 (C_5); 25,80 (C_4); 46,19 (C_2); 72,63 (C_3); 102,11 (C_6); 126,22 (C_8); 128,24 (C_9); 129,00 (C_{10}); 137,77 (C_7); 178,97 (C_1).

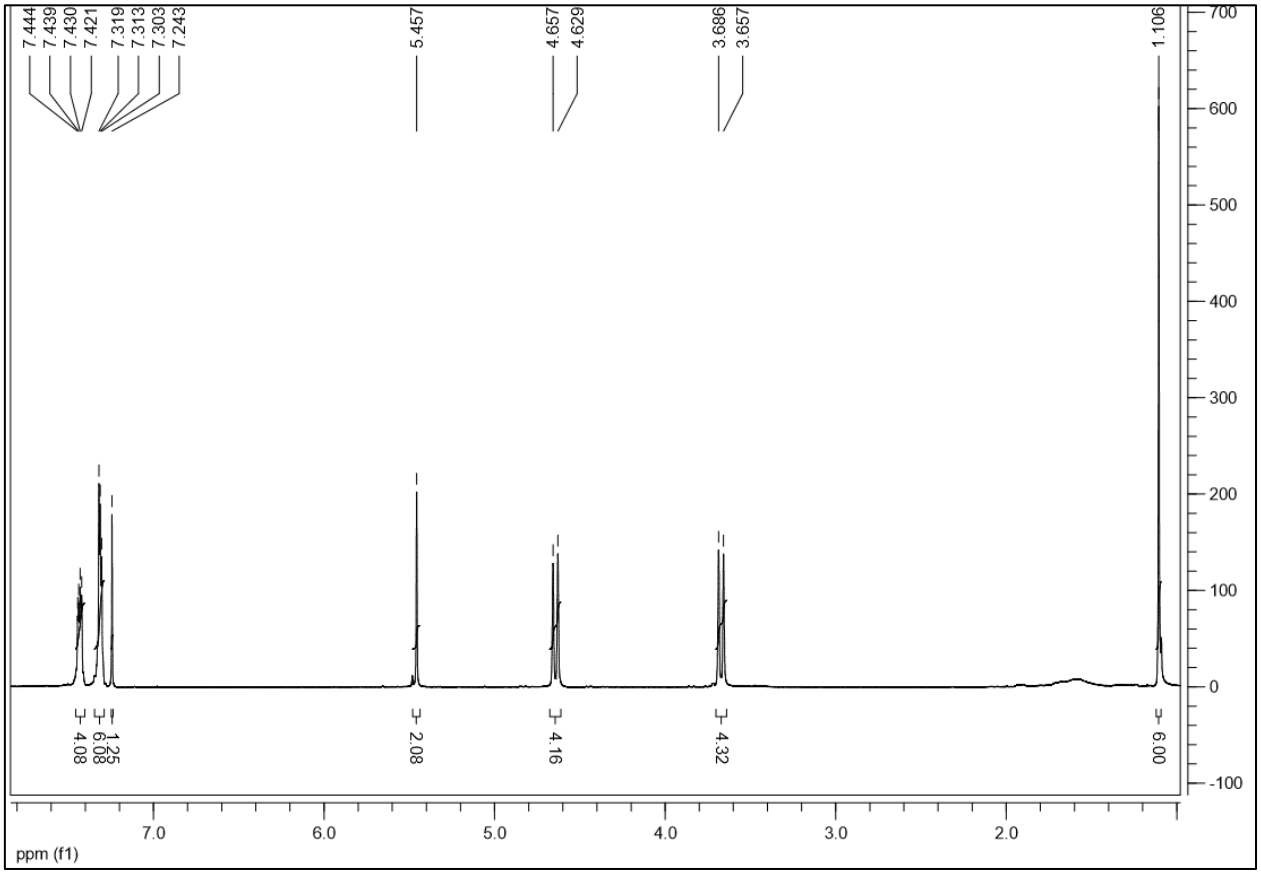
4.5.2.2 Síntese do anidrido do *Bis*MPAP e *Bis*MBAP

Para a síntese dos intermediários compostos pelo agente espaçante e foco central, sintetizaram-se os anidridos de *Bis*MPAP e *Bis*MBAP e, posteriormente, esses compostos foram utilizados para a reação de dendronização, ou seja, o acoplamento com os focos centrais amínicos. O mecanismo dessas reações é demonstrado na Figura 50.

4.5.2.2.1 *Síntese do anidrido do BisMPAP*

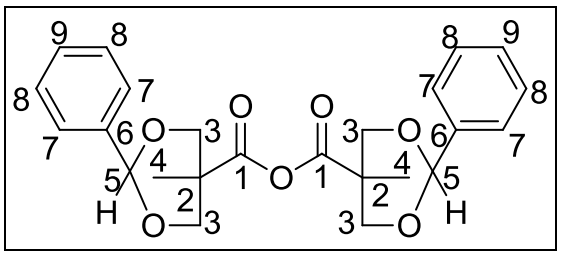
O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 46) mostrou os sinais característicos do *Bis*MPAP, como os hidrogênios aromáticos em 7,30-7,44 ppm. Além disso, observam-se os singletos em 1,10 e 5,45 ppm, que se referem, respectivamente, aos hidrogênios H_4 e H_5 do *Bis*MPAP. Ainda com relação ao espaçante, os dubletos em 3,65-3,68 ppm e em 4,62-4,65 ppm caracterizam os hidrogênios H_3 do *Bis*MPAP. O RMN ^{13}C (Espectro 47) apresentou os carbonos característicos do *Bis*MPAP C_4, C_2, C_3, C_5, C_6, C_7, C_8 e C_9 em 17, 44, 73, 102, 137, 126, 128 e 129 ppm, respectivamente. Em adição, a principal evidência da síntese deste composto é o deslocamento químico observado no carbono carbonílico do anidrido. No *Bis*MPAP, a carbonila do ácido carboxílico aparecia em 176,80 ppm e com a função anidrido formada esse carbono aparece em 169,16 ppm. Outro resultado que mostrou a síntese do anidrido do *Bis*MPAP é o espectro de massas MALDI-ToF no modo positivo (Espectro 48), em que é possível observar o sinal referente ao anidrido do *Bis*MPAP cationizado com potássio em *m/z* 465,69 $[M+K]^+$, além dos picos relativos ao padrão isotópico M+1 e M+2 com *m/z* 466 e 467, respectivamente. O valor *m/z* calculado para $C_{24}H_{26}O_7K^+$ é 465,13. Portanto, com este método obteve-se o anidrido do *Bis*MPAP puro, com rendimento de 70%.

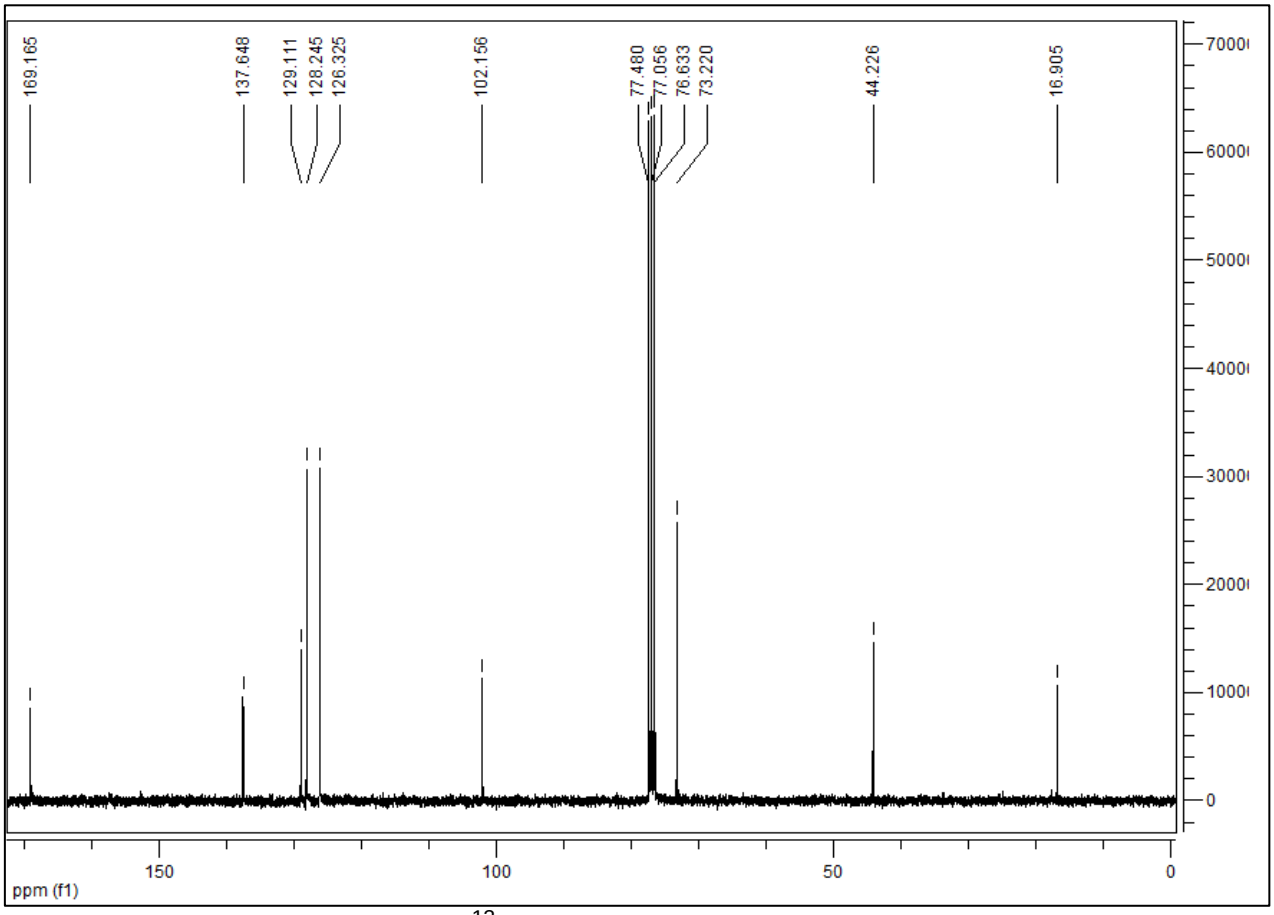




Espectro 46: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do anidrido do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)propiônico (*Bis*MPAP).

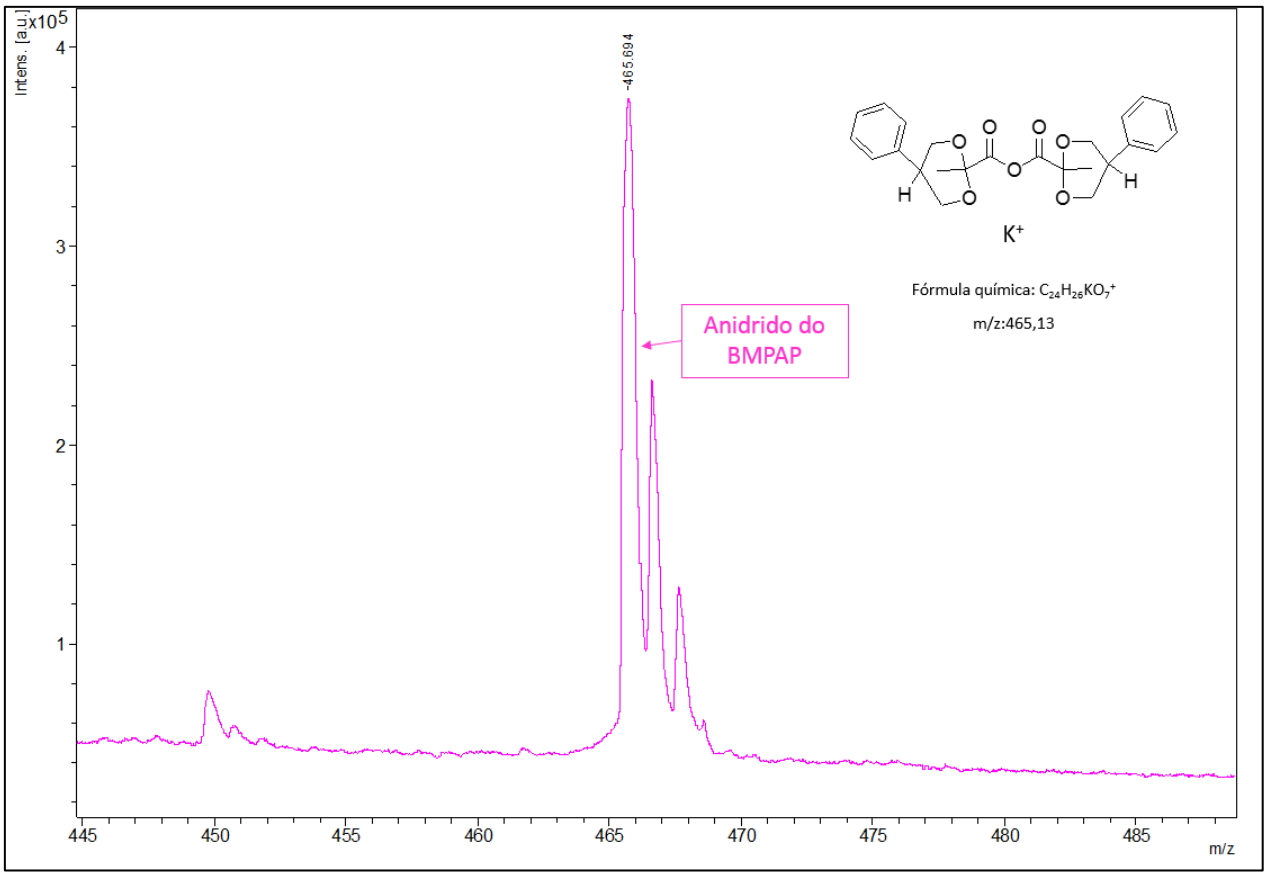
RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 400 MHz, δ
7,24 ($CDCl_3$); 1,10 (s, 6H, H_4); 3,68 (d, 4H, H_3, J=11 Hz); 4,57 (d, 4H, H_3, J=11 Hz); 5,45 (s, 2H, H_5); 7,31 (q, 6H, H_8 e H_9, J=2 Hz, J=4 Hz); 7,43 (q, 4H, H_7, J=2 Hz, J=4 Hz).





Espectro 47: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do anidrido do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)propiônico (*Bis*MPAP).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75 MHz, δ
77,00 ($CDCl_3$); 16,90 (C_4); 44,22 (C_2); 73,22 (C_3); 102,15 (C_5); 126,32 (C_7); 128,24 (C_8); 129,11 (C_9); 137,64 (C_6); 169,16 (C_1).



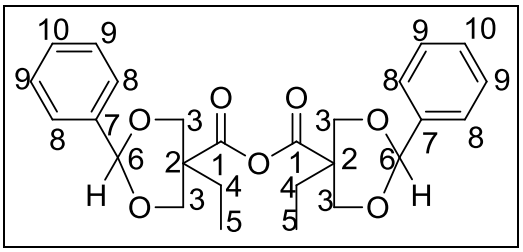
Espectro 48: Espectro de massas – MALDI-ToF (+) do anidrido do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)propiônico (*Bis*MPAP). Matriz: Galvinoxil livre.

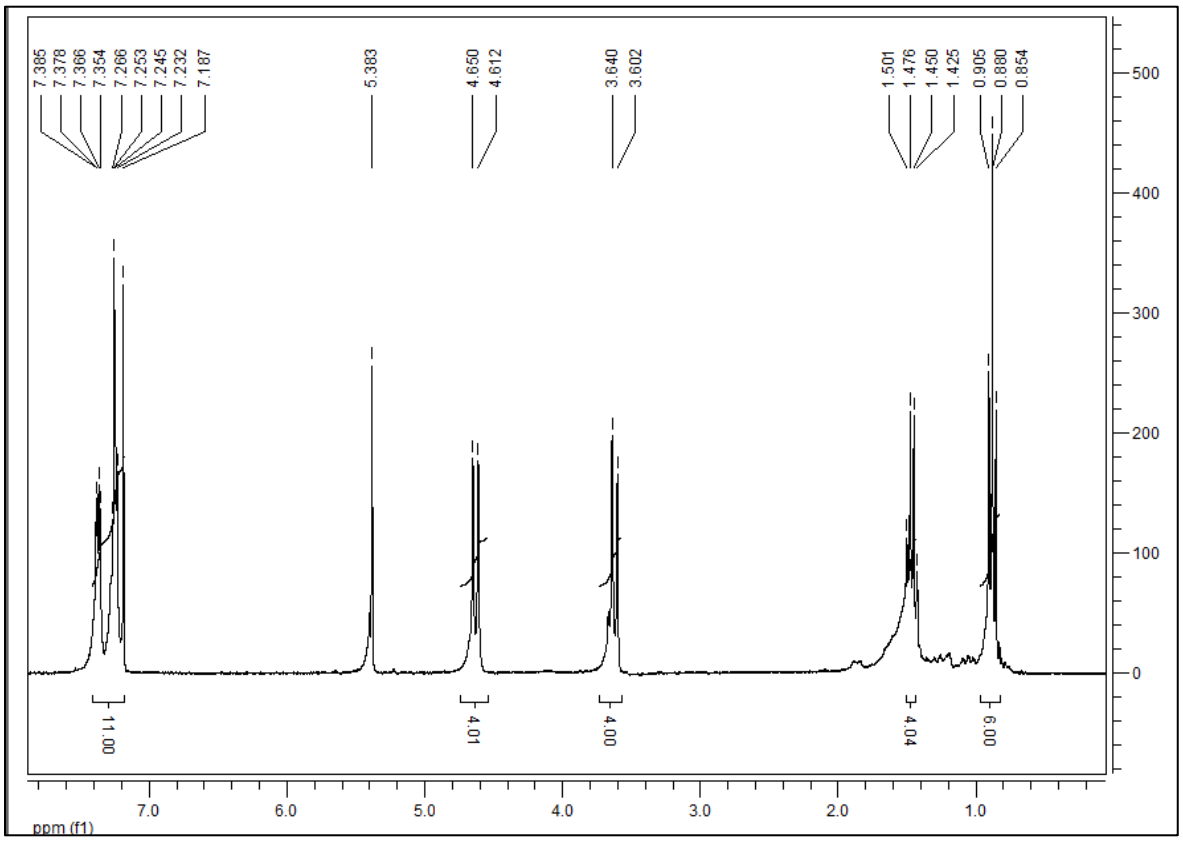
4.5.2.2.2 *Síntese do anidrido do BisMBAP*

Com a síntese do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)butírico, partiu-se para a síntese do anidrido desse agente espaçante. As placas cromatográficas revelaram uma mancha diferente do material de partida (*Bis*MBAP, R*f*= 0,35*),* que apresentou R*f* equivalente a 0,80, indicando a obtenção de composto mais apolar, o que é compatível com o anidrido de interesse.

O RMN ^{1}H (Espectro 49) apresentou os sinais característicos do *Bis*MBAP, como os hidrogênios aromáticos do grupo protetor em 7,18-7,38 ppm. Além disso, observa-se o singleto em 5,38 ppm, que se refere ao hidrogênio H_6 da proteção do *Bis*MBAP. Os dubletos em 3,60-3,64 e em 4,61-4,65 ppm caracterizam os hidrogênios H_3 do

*Bis*MBAP. Ainda com relação ao agente espaçante, o espectro apresenta o tripleto em 0,85-0,90 ppm e o quarteto entre 1,42-1,50 ppm, referentes aos hidrogênios H_5 e H_4.



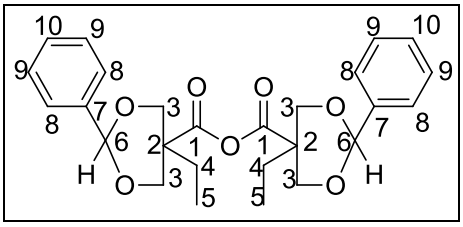


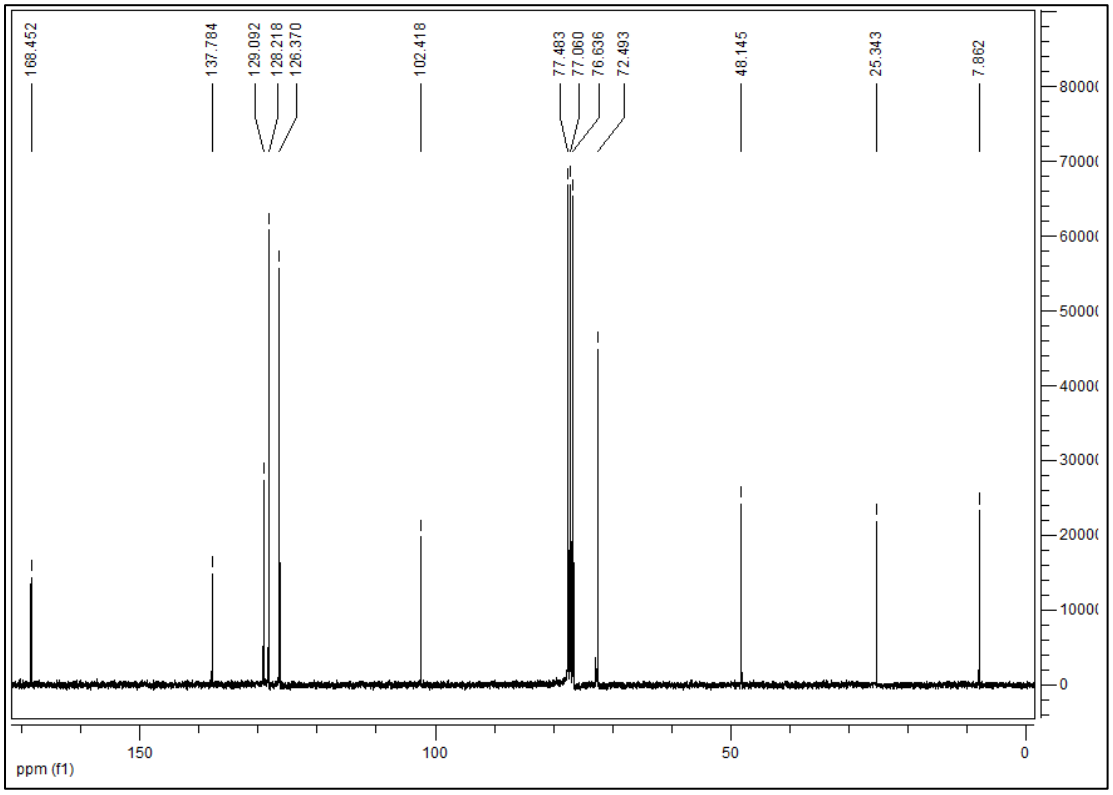
Espectro 49: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do anidrido do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)butírico (*Bis*MBAP).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ
7,24 ($CDCl_3$) 0,88 (t, 3H, H_5, J=7 Hz); 1,47 (q, 2H, H_4, J=7 Hz); 3,64 (d, 2H, H_3, J=11); 4,65 (d, 2H, H_3, J=11 Hz) 5,38 (s, 1H, H_6); 7,18-7,26 (m, 3H, H_9 e H_{10}); 7,35-7,38 (m, 2H, H_8).

O RMN ^{13}C (Espectro 50) apresentou os carbonos característicos do *Bis*MBAP C_5, C_4, C_2, C_3, C_6, C_7, C_8, C_9 e C_{10} em 7, 25, 48, 72, 102, 137, 126, 128 e 129 ppm,

respectivamente. Adicionalmente, o principal indicativo da obtenção do anidrido é o deslocamento químico observado no carbono carbonílico. No *Bis*MBAP, a carbonila do ácido carboxílico aparecia em 178,97 ppm e com a função anidrido formada esse carbono aparece em 168,45 ppm. Dessa forma, obteve-se o anidrido do *Bis*MBAP com rendimento de 56%.





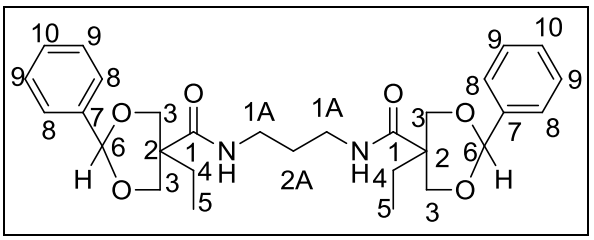
Espectro 50: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do anidrido do ácido benzilideno-2,2-*bis*(oximetil)butírico (*Bis*MBAP).

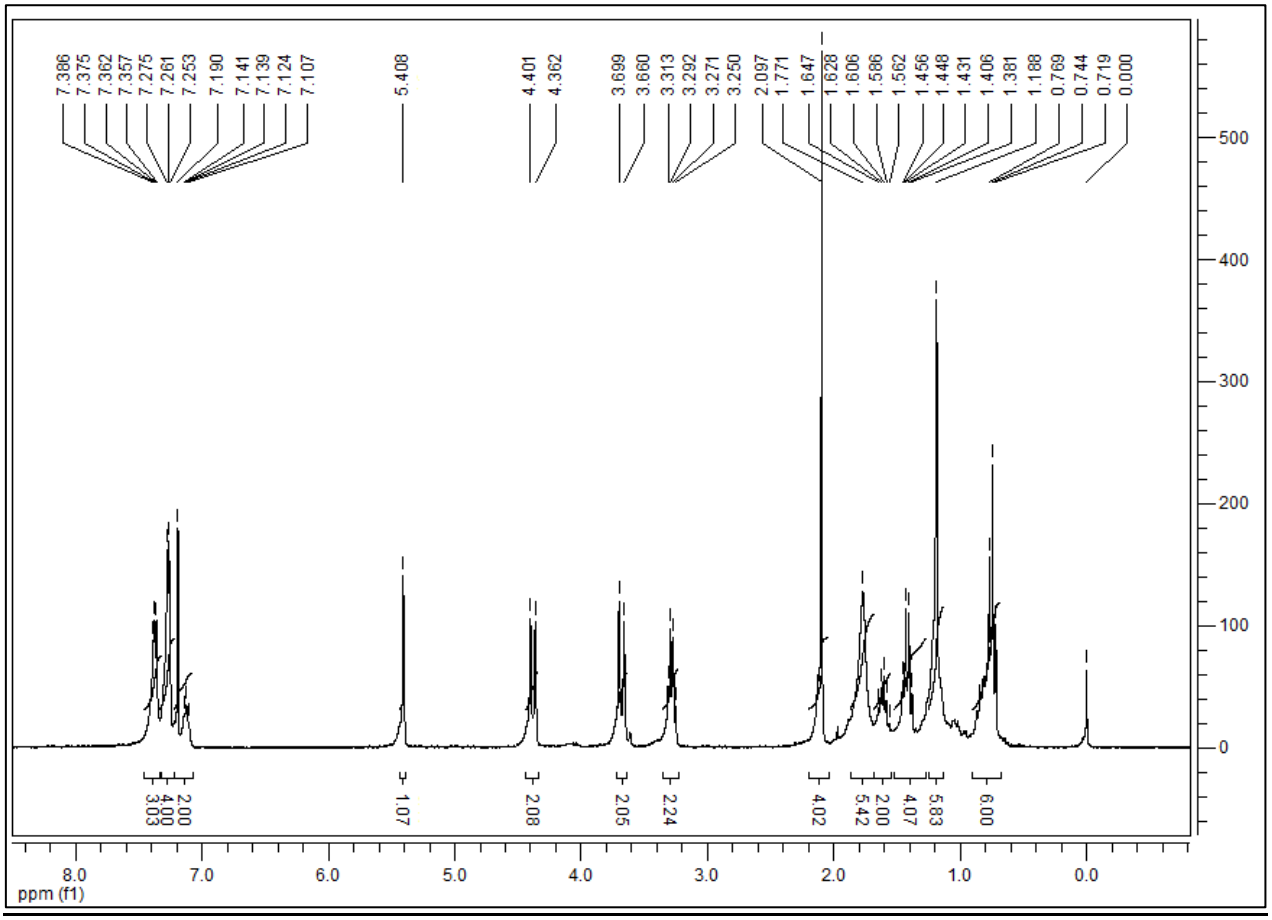
RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75 MHz, δ
77,00 ($CDCl_3$); 7,86 (C_5); 25,34 (C_4); 48,14 (C_2); 72,49 (C_3); 102,41 (C_6); 126,37 (C_8); 128,21 (C_9); 129,09 (C_{10}); 137,78 (C_7); 168,45 (C_1).

4.5.2.3 Síntese do intermediário *Bis*MBAP e propanodiamina, partindo do anidrido do *Bis*MBAP

Com a síntese do anidrido do *Bis*MBAP partiu-se para a próxima etapa sintética, que é a reação de dendronização com a propanodiamina para a obtenção do intermediário *Bis*MBAP acoplado a esse foco central. O mecanismo da reação pode ser visualizado na Figura 51. Ao término da reação, a CCD mostrou a formação de duas manchas diferentes do material de partida, anidrido do *Bis*MBAP (R*f* equivalente a 0,80), de caráter mais polar com valores de R*f* 0,41 e 0,66, a quais remetem à formação do produto.

O espectro RMN ^{1}H (Espectro 51) mostra indicativos de formação do produto de interesse, devido à presença dos sinais relacionados ao núcleo. Com relação à propanodiamina, observam-se os sinais em 3,3 ppm e 1,60 ppm, referentes aos hidrogênios 1A e 2A do foco central. Com relação ao agente espaçante, observam-se os sinais relativos aos hidrogênios H_5, H_4 e H_3 em 0,74, 1,40 e 3,60-4,4 ppm, respectivamente. Ainda a respeito do *Bis*MBAP, os sinais do grupo protetor benzilideno são observados em 5,4 ppm e entre 7,10 e 7,38 ppm, que correspondem, respectivamente, ao H_6 e os hidrogênios aromáticos (H_7, H_8, H_9 e H_{10}). Portanto, existem indicativos da obtenção do produto, no entanto, o espectro apresenta algumas impurezas na região entre 1-2 ppm. Dessa forma, com esse método obteve-se o intermediário *Bis*MBAP e propanodiamina, ainda que impuro.





Espectro 51: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do intermediário impuro *Bis*MBAP-PDA.

4.5.2.4 Síntese do intermediário *Bis*MPAP e foco central, partindo do anidrido do *Bis*MPAP

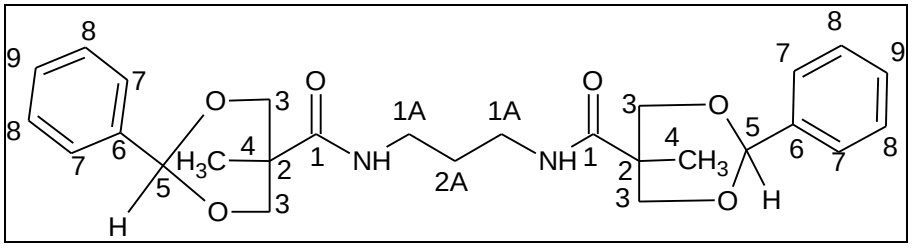
Com a obtenção do anidrido do *Bis*MPAP partiu-se para a próxima etapa sintética, que é a reação de dendronização com os focos centrais para a obtenção do intermediário *Bis*MPAP acoplado a estes. O mecanismo desta reação pode ser observado na Figura 51.

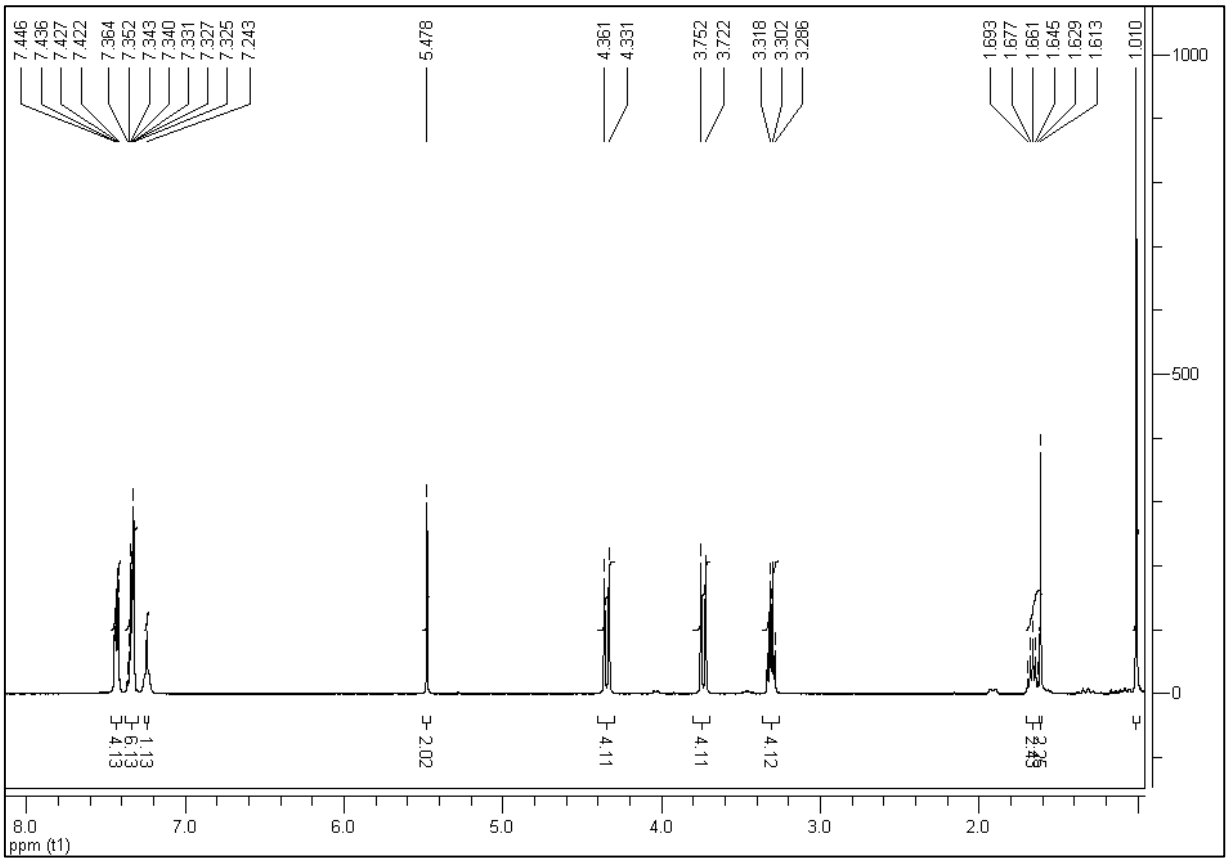
4.5.2.4.1 *Síntese do intermediário* Bis*MPAP e propanodiamina*

Realizou-se a síntese do intermediário composto por *Bis*MPAP e propanodiamina (*Bis*MPAP-PDA). No RMN ^{1}H (Espectro 52) observam-se os hidrogênios do *Bis*MPAP, como os singletos em 1,01 e 5,47 ppm, referentes aos hidrogênios H_4 e H_5. Adicionalmente, os dubletos em 3,75 e 4,36 ppm caracterizam os H_3, bem como os multipletos na região de 7,30 e 7,40 ppm revelam os hidrogênios aromáticos do grupo protetor. A respeito do foco central, o espectro apresentou os sinais em 3,33 ppm e 1,66 ppm, relacionados, respectivamente, aos hidrogênios H_{1A} e H_{2A} da propanodiamina.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 53) revelou os carbonos característicos da propanodiamina C_{2A} e C_{1A}, em 29,95 e 36,41 ppm. Os carbonos do *Bis*MPAP são observados em 17, 40, 74, 102 ppm, respectivamente, referentes aos carbonos C_4, C_2, C_3 e C_5. Adicionalmente, os respectivos carbonos aromáticos C_7, C_8, C_9 e C_6 apareceram em 126, 128, 129 e 137 ppm. A carbonila de amida (C_1) foi observada em 174,82 ppm.

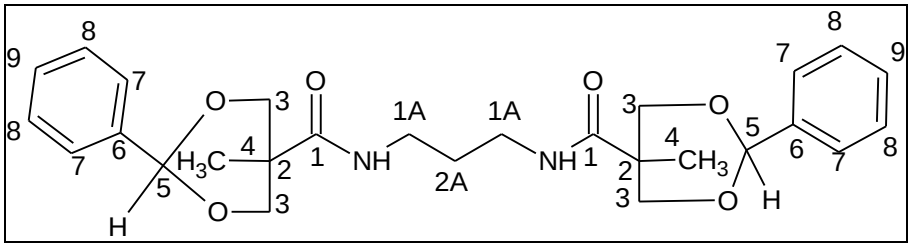
O espectro de massas MALDI-ToF no modo positivo (Espectro 54) também confirmou a síntese deste intermediário cationizado com K^+, devido à presença dos *m/z* em 521,29; 522,34 e 523,39 $[M+K]^+$, sendo que a *m/z* calculado deste composto é de 521,20. Além disso, no espectro A é possível comparar o material de partida anidrido do *Bis*MPAP que apresenta *m/z* em 465,69, bem como os padrões isotópicos M+1 e M+2 com *m/z* 466,68 e 467,68. O espectro B do intermediário *Bis*MPAP-PDA mostra o desaparecimento do pico do material de partida (anidrido do *Bis*MPAP) e revela a presença dos picos relativos ao produto de interesse com *m/z* 521,29. Portanto, o intermediário *Bis*MPAP-PDA puro foi obtido com sucesso por este método. O rendimento da reação foi de 80%.

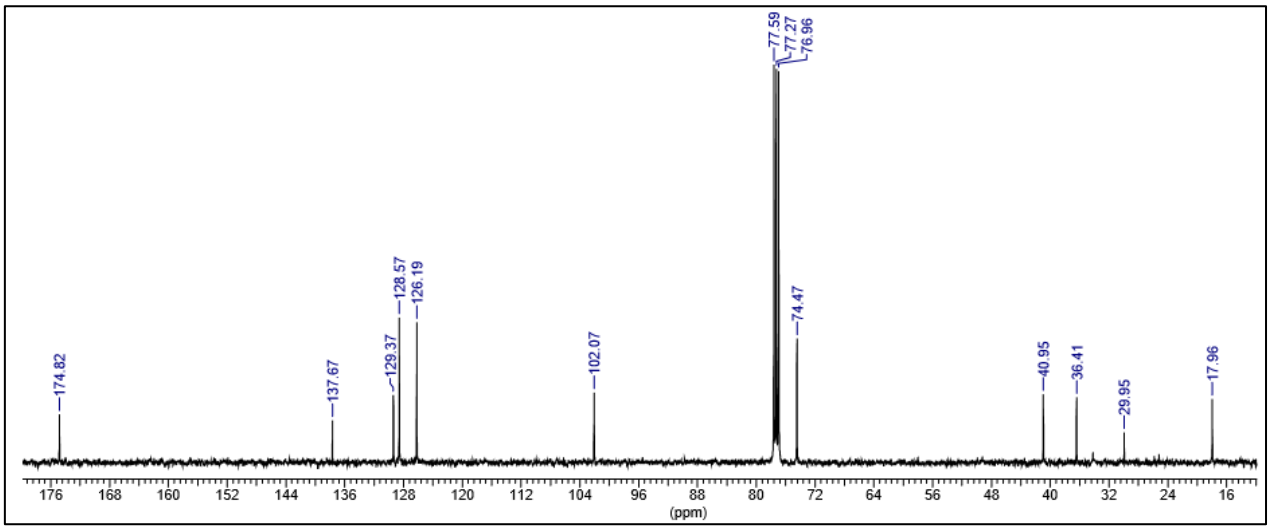




Espectro 52: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) do intermediário *Bis*MPAP-PDA.

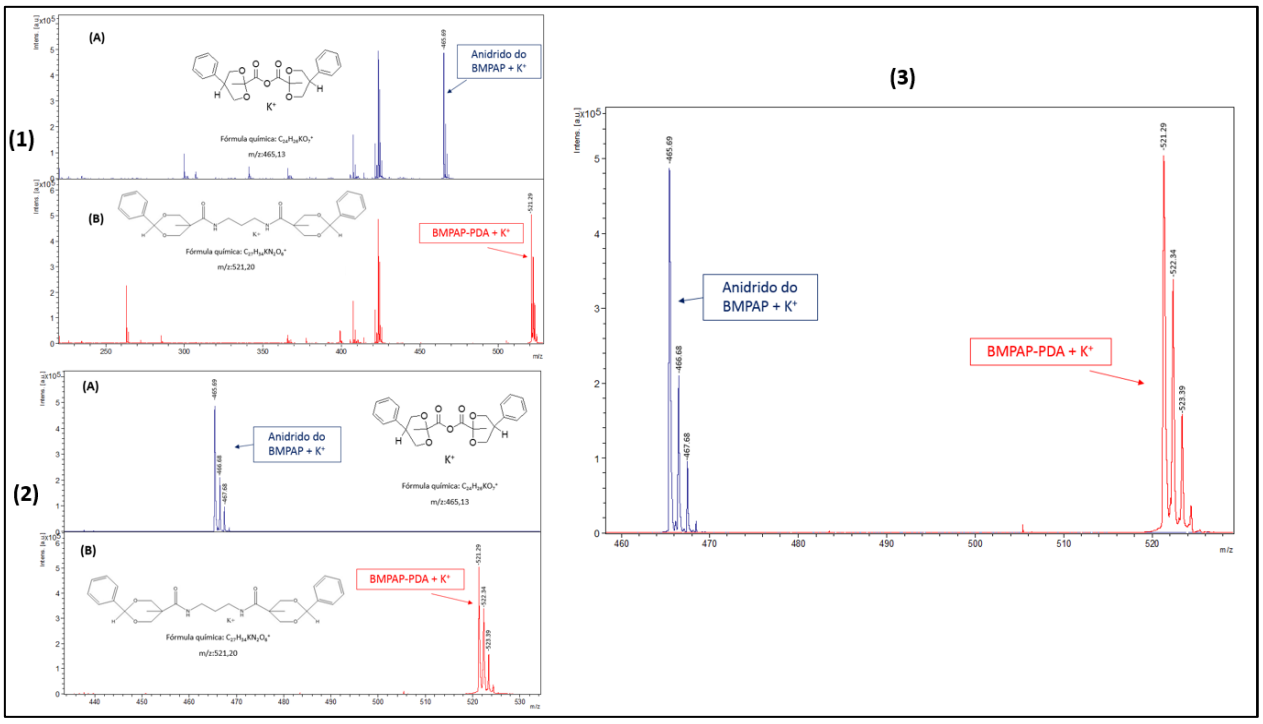
RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 400 MHz, δ
7,24 ($CDCl_3$) 1,01 (s, 6H, H_4); 1,61-1,69 (m, 2H, H_{2A}); 3,30 (t, 4H, H_{1A} J=6); 3,72 (d, 4H, H_3, J=12 Hz); 4,33 (d, 4H, H_3, J=12); 5,47 (s, 2H, H_5); 7,32-7,36 (m, 6H, H_8 e H_9); 7,42-7,44 (m, 4H, H_7).





Espectro 53: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) do intermediário *Bis*MPAP-PDA.

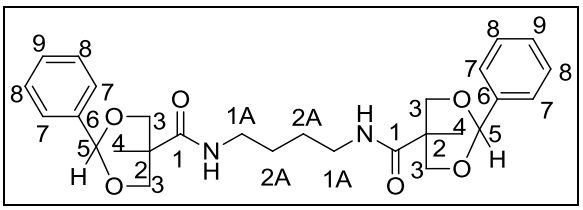
RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 100 MHz, δ
77,00 ($CDCl_3$); 17,96 (C_4); 29,95 (C_{2A}); 36,41 (C_{1A}); 40,95 (C_2); 74,47 (C_3); 102,07 (C_5); 126,19 (C_7); 128,57 (C_8); 129,37 (C_9); 137,67 (C_6); 174,82 (C_1).

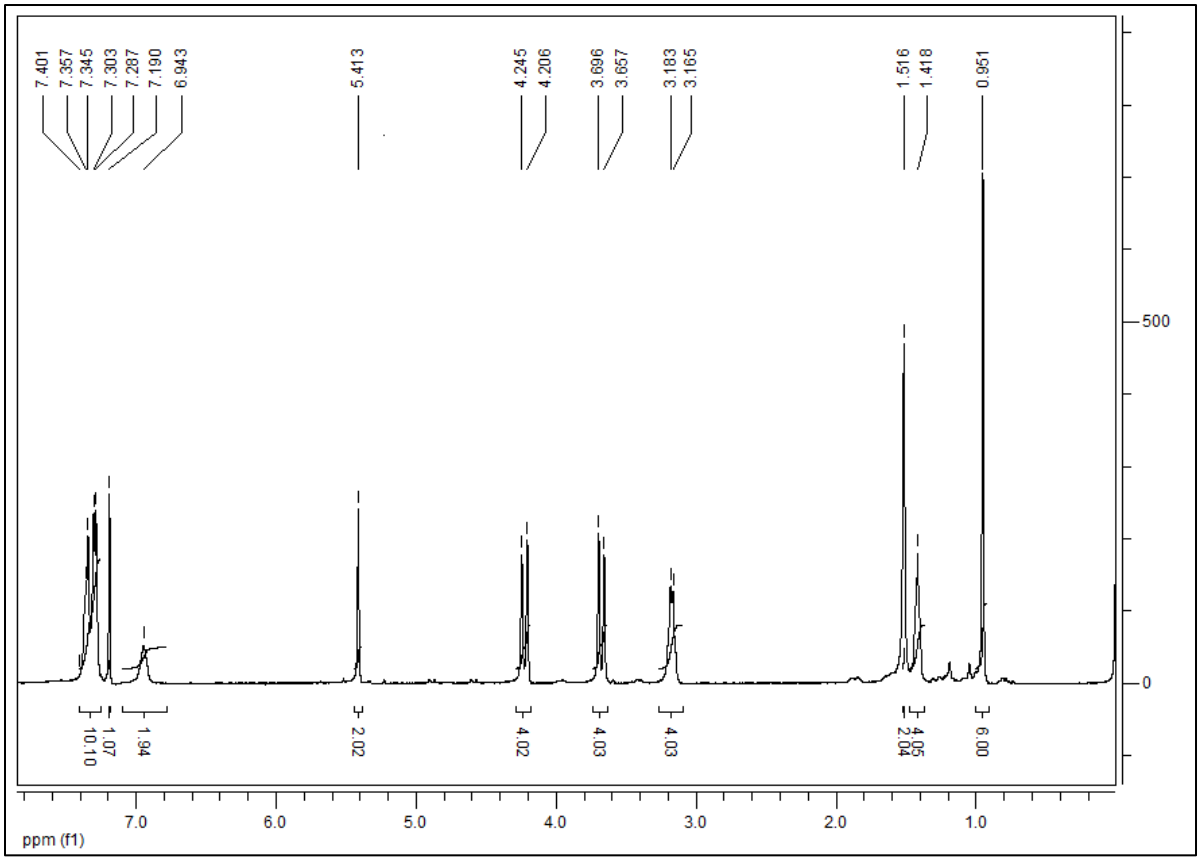


Espectro 54: Espectro de massas – MALDI-ToF (+) do intermediário *Bis*MPAP-PDA. (1) Espectro completo: A – anidrido do *Bis*MPAP (em azul) e B – intermediário *Bis*MPAP-PDA (em vermelho); (2) Ampliação do espectro: A – anidrido do *Bis*MPAP (em azul) e B – intermediário *Bis*MPAP-PDA (em vermelho); (3) Sobreposição dos espectros do anidrido do *Bis*MPAP (em azul) e intermediário *Bis*MPAP-PDA (em vermelho). Matriz: Galvinoxil livre.

4.5.2.4.2 *Síntese do intermediário* Bis*MPAP e butanodiamina*

Síntetizou-se o intermediário composto por *Bis*MPAP e butanodiamina (*Bis*MPAP-BTDA). A CCD revelou mancha diferente do material, com valor de R*f* igual a 0,34, mancha mais polar que o material de partida anidrido do *Bis*MPAP, que tem R*f* equivalente a 0,7. O RMN ^{1}H (Espectro 55) apresentou os hidrogênios característicos do espaçante, em 0,95 e 3,69-4,24 ppm, relativos, respectivamente, a H_4 e H_3. Os sinais da proteção são observados em 5,41, que se refere ao H_5. Os hidrogênios aromáticos estão na região de 7 ppm. Os sinais da butanodiamina são observados em 1,41 e 3,18 ppm, que correspondem, a H2A e H1A, respectivamente. Além disso, em 6,94 ppm encontra-se o sinal referente ao hidrogênio de NH da função amida formada.

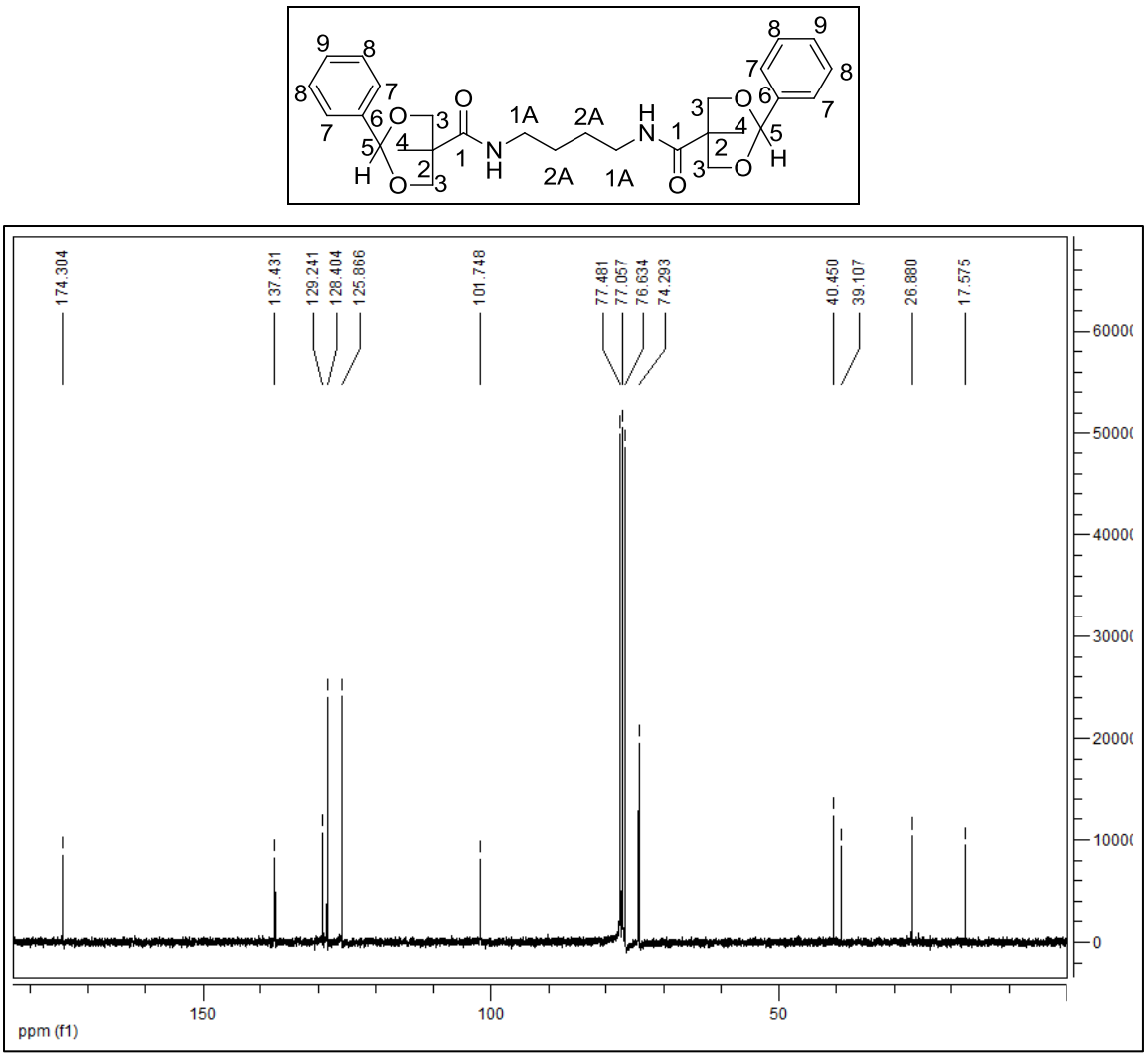




Espectro 55: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do intermediário *Bis*MPAP-BTDA.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ
7,19 ($CDCl_3$) 0,95 (s, 6H, H_4); 1,41 (s, 4H, H_{2A}); 3,16 (d, 4H, H_{1A} J=6); 3,65 (d, 4H, H_3, J=11 Hz); 4,20 (d, 4H, H_3, J=11); 5,41 (s, 2H, H_5); 7,28-730 (m, 6H, H_8 e H_9); 7,34-7,40 (m, 4H, H_7).

O RMN ^{13}C (Espectro 56) apresentou os sinais dos carbonos do *Bis*MPAP anteriormente discutidos, bem como os carbonos 1A e 2A relativos ao foco central butanodiamina, que aparecem em 26,88 e 39,10 ppm, respectivamente. Em adição, o carbono carbonílico 1 surge deslocado em 174,30 ppm, comparativamente à carbonila do anidrido do *Bis*MPAP, que aparecia na região de 169 ppm.

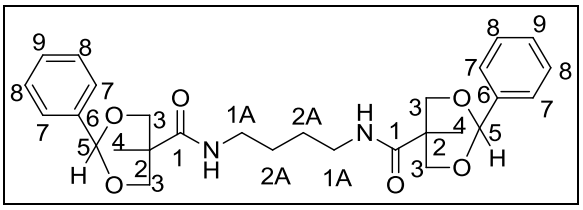


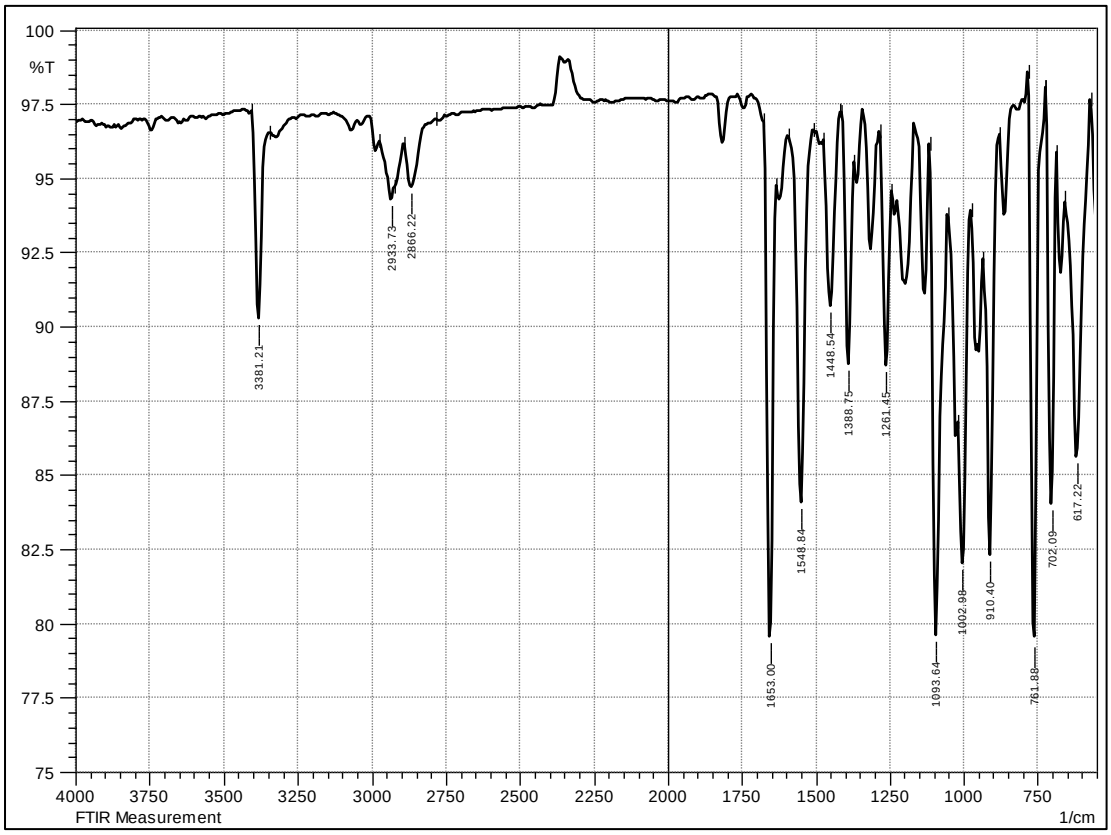
Espectro 56: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do intermediário *Bis*MPAP-BTDA.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75 MHz, δ
77,00 ($CDCl_3$); 17,57 (C_4); 26,88 (C_{2A}); 39,10 (C_{1A}); 40,45 (C_2); 74,29 (C_3); 101,74 (C_5); 125,86 (C_7); 128,40 (C_8); 129,24 (C_9); 137,43 (C_6); 174,30 (C_1).

O IV (Espectro 57) é mais um indicativo de síntese do intermediário *Bis*MPAP-BTDA. Neste espectro, observam-se bandas relacionadas à função amida formada em 3381, 1653 e 1548 cm^{-1} referentes, respectivamente, a NH associado de amida, carbonila de amida e de deformação angular de ligação NH. Com relação ao *Bis*MPAP, existem as bandas em 1448, 910, 761 e 702 cm^{-1}, bandas que caracterizam a presença

do anel aromático benzilideno. Também, observam-se bandas de estiramento de CH alifático em 2933 e 2866 cm^{-1}, relativas aos CH_2 alifáticos presentes no foco central. Portanto, obteve-se o intermediário *Bis*MPAP-BTDA com rendimento de 50% e o produto apresenta-se na forma de pó branco amorfo.





Espectro 57: Espectro no IV do intermediário *Bis*MPAP-BTDA.

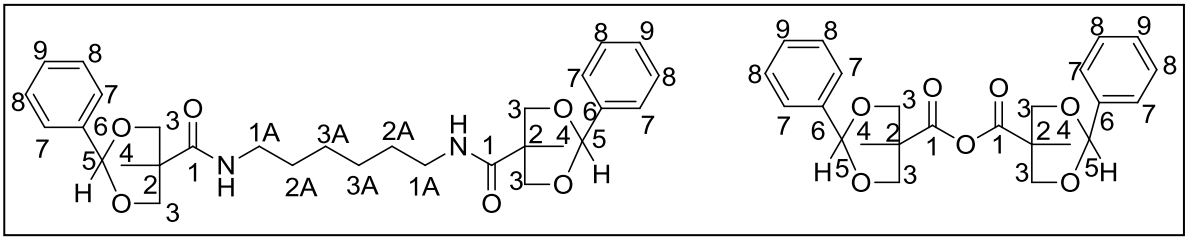
IV (ν, ATR, cm^{-1})
3381 (ν $_{NH}$ associado de amida); 2933 (ν CH_2 alifático); 2866 (ν CH_2 alifático); 1653 (ν $_{C=O}$ amida); 1548 (δ $_{NH}$ angular); 1448 (δ $_{C=C}$ aromático); 1388 (δ CH_3 angular); 910 (δ $_{CH=CH}$ angular de aromático); 761 (δ angular de anel aromático); 702 (δ angular de anel aromático).

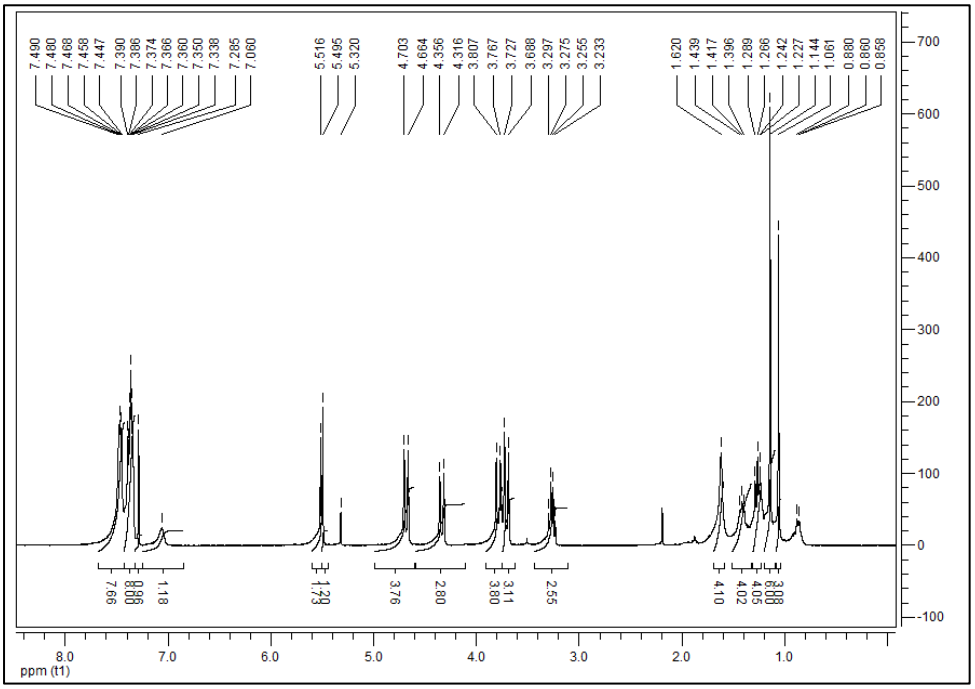
4.5.2.4.3 *Síntese do intermediário* Bis*MPAP e hexanodiamina*

Realizou-se, também, a tentativa de síntese do intermediário *Bis*MPAP acoplado a hexanodiamina. Ao término da reação, a cromatografia em camada demonstrou a presença de duas manchas, uma delas de R*f* igual 0,7, que corresponde ao anidrido do *Bis*MPAP (material de partida), e outra mancha com caráter mais polar com valor de R*f* equivalente a 0,5, que indica a obtenção do intermediário *Bis*MPAP e hexanodiamina (*Bis*MPAP-HXDA).

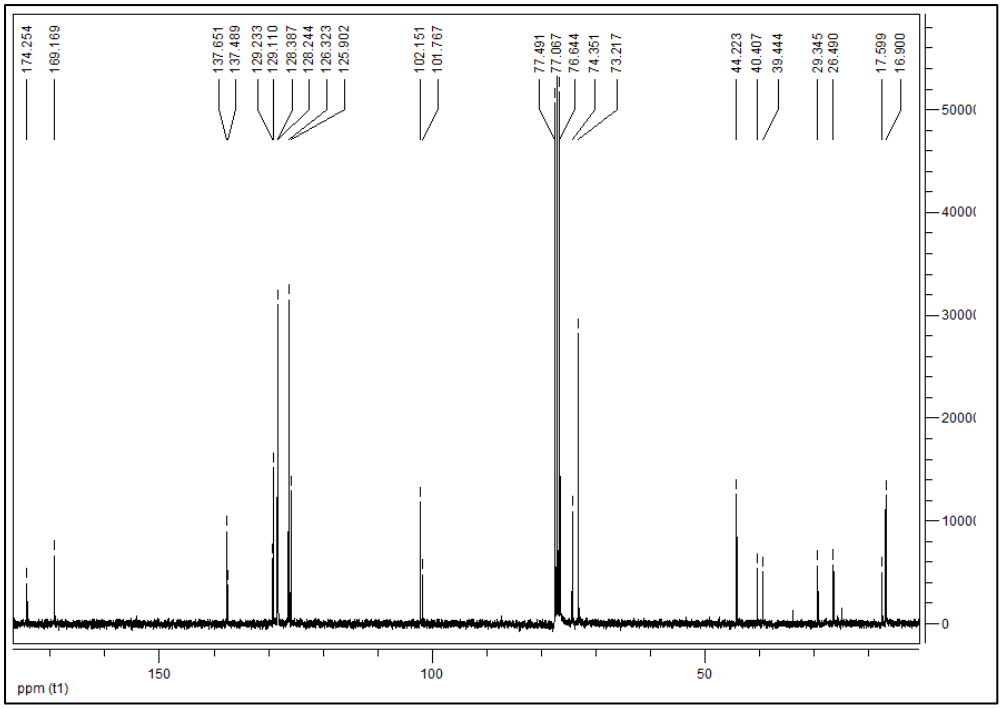
Após a purificação por precipitação, o espectro RMN ^{1}H (Espectro 58) revelou indicativos da presença de produto, devido aos hidrogênios 3A, 2A e 1A do foco central hexanodiamina, que apareceram, respectivamente, em 1,24; 1,41 e 3,23 ppm. Em 7,06 ppm observa-se sinal alargado, que pode ser relativo ao hidrogênio da função amida formada. Com relação ao *Bis*MPAP, o RMN mostrou os hidrogênios H_4, H_3, e H_5 em 1,06-1,14; 3,68-4,70 e 5,49-5,51 ppm, bem como os sinais dos hidrogênios aromáticos do grupo protetor entre 7,28-7,49 ppm. No entanto, no espectro os sinais característicos do *Bis*MPAP estão duplicados, dessa forma constata-se que há a mistura do intermediário de interesse (*Bis*MPAP-hexanodiamina) e do material de partida (anidrido do *Bis*MPAP), como tinha sido verificado na cromatografia em camada delgada.

Em adição, o espectro de RMN ^{13}C (Espectro 59), também, mostrou a obtenção da mistura formada entre o material de partida e o produto de interesse. O RMN ^{13}C (Espectro 59) apresentou os respectivos carbonos C_4, C_2, C_3 e C_5 do *Bis*MPAP duplicados em 16-17, 40-44, 73-74, 101-102 ppm. Também, são observados os sinais dos carbonos aromáticos duplicados da proteção na região de 125-137 ppm. Além disso, o espectro mostra os grupos carbonílicos da função anidrido do material de partida em 169,16 ppm e da função amida presente no produto em 174,25 ppm. Os sinais em 26, 29 e 39 ppm, caracterizam, respectivamente, os carbonos C3A, C2A e C1A da hexanodiamina. Portanto, obteve-se o intermediário *Bis*MPAP-HXDA, mas a purificação por precipitação não foi eficiente para a obtenção do composto de interesse puro.





Espectro 58: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do intermediário *Bis*MPAP-HXDA.



Espectro 59: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do intermediário *Bis*MPAP-HXDA.

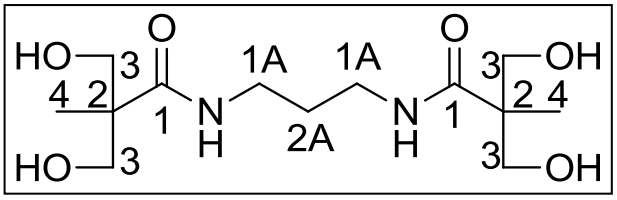
4.5.2.5 Desproteção por hidrogenólise dos intermediários *Bis*MPAP e foco central

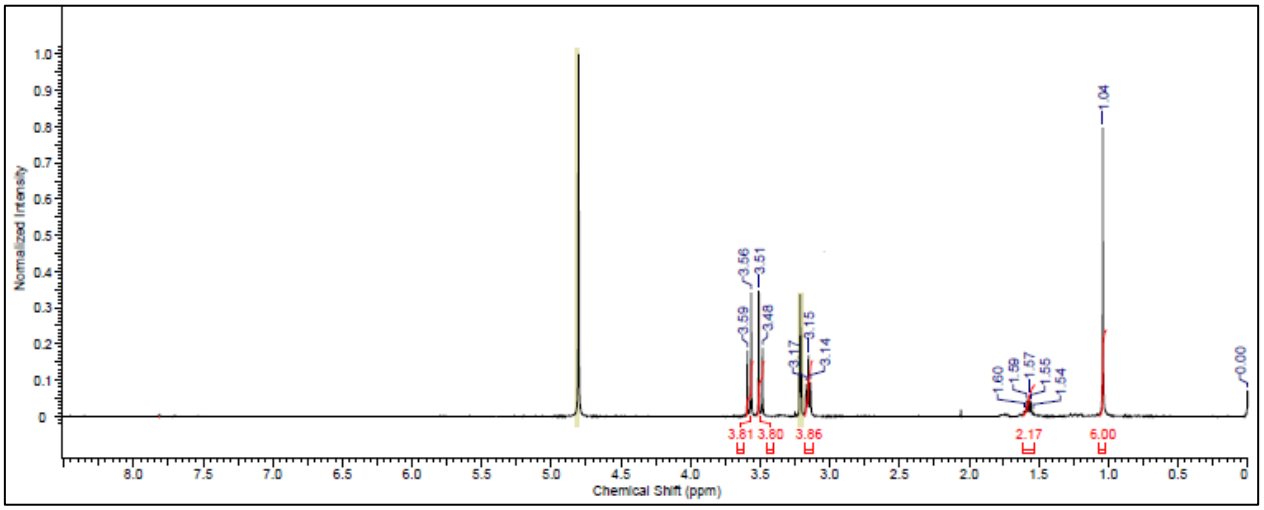
4.5.2.5.1 *Desproteção do intermediário* Bis*MPAP-PDA, obtenção do intermediário BisMPA-PDA*

Com a síntese do intermediário *Bis*MPAP-PDA, partiu-se para a etapa seguinte, a síntese do intermediário *Bis*MPA-PDA. Esta etapa consiste na desproteção do intermediário *Bis*MPAP-PDA por reação de hidrogenólise. Com esse objetivo, utilizou-se Pd/C em atmosfera de H_2. Posteriormente, a este composto poderá ser ligado o agente bioativo para a obtenção de um pró-fármaco dendrimérico de primeira geração ou pode ocorrer o crescimento da cadeia dendrimérica, com a síntese de dendrímeros de gerações maiores.

O espectro de RMN ^1H (Espectro 60) não apresentou os multipletos na região de 7,30-7,40 ppm relacionados aos hidrogênios aromáticos do grupo protetor. Além disso, também, desapareceu o singleto relativo ao grupo protetor H_5 em 5,47 ppm. Em adição, mantiveram-se os demais sinais referentes aos hidrogênios do *Bis*MPA em 3,50 ppm característicos dos hidrogênios H_3, bem como o singleto em 1,04 ppm, que corresponde ao hidrogênio H_4. A respeito do foco central amínico, observam-se os sinais na região em 3,10 e 1,50 ppm, relativos aos hidrogênios H_{1A} e H_{2A} da propanodiamina. O forte sinal em 4,80 ppm é referente à água presente no solvente deuterado metanol, utilizado no preparo da amostra.

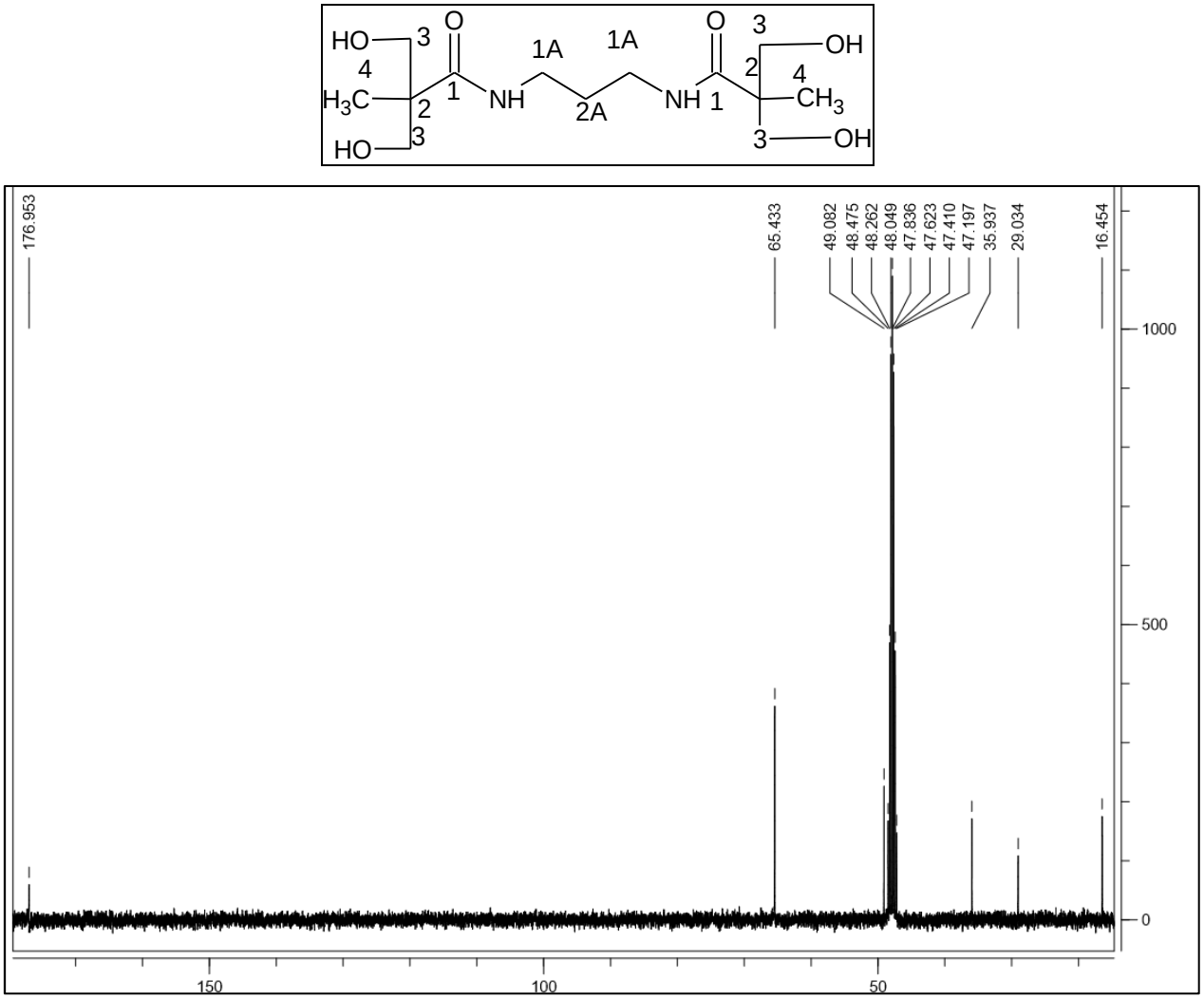
Outro resultado importante para a caracterização do intermediário desprotegido é o espectro de RMN ^{13}C (Espectro 61), no qual é possível observar, também, o desaparecimento dos carbonos relativos ao grupo protetor benzilideno em 102, 126, 128, 129 e 137 ppm, que se referem, respectivamente, aos carbonos C_5, C_6, C_7, C_8 e C_9, da proteção. Com relação ao *Bis*MPA, o espectro mostra a manutenção dos carbonos do espaçante, devido à presença dos sinais em 16, 49 e 65 ppm, relativos aos carbonos C_4, C_2 e C_3. Ademais, o carbono carbonílico de amida (C_1) apareceu em 176,95 ppm. Os sinais do foco central são visualizados em 29,03 e 35,93 ppm, relativos aos respectivos carbonos 1A e 2A da propanodiamina.





Espectro 60: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) do intermediário *Bis*MPA-PDA, produto obtido na reação de desproteção.

RMN ^{1}H (CD_3OD), 400 MHz, δ
3,20 (CD_3OD) 1,04 (s, 6H, H_4); 1,54-1,60 (m, 2H, H_{2A}); 3,15 (t, 4H, H_{1A} J=6); 3,50 (dd, 8H, H_3, J=11 Hz).

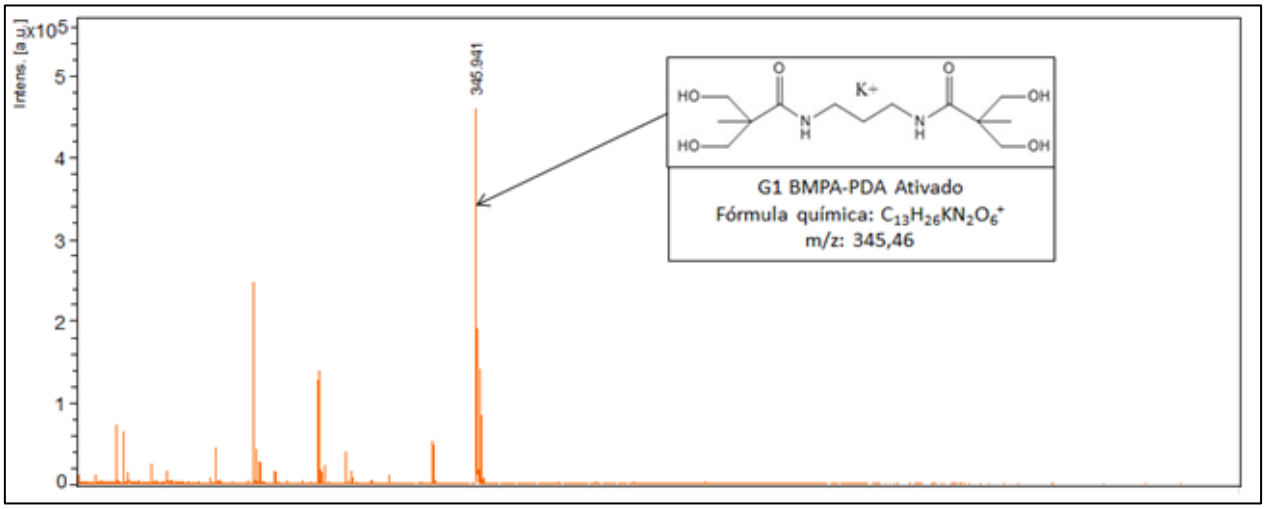


Espectro 61: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do intermediário *Bis*MPA-PDA, produto obtido na reação de desproteção.

RMN ^{13}C (CD_3OD), 100 MHz, δ
47,00 (CD_3OD); 16,45 (C_4); 29,03 (C_{2A}); 35,93 (C_{1A}); 49,08 (C_2); 65,43 (C_3); 176,95 (C_1).

Além disso, a análise por espectrometria de massas MALDI-ToF no modo positivo mostrou a síntese do intermediário do *Bis*MPA-PDA. O espectro 62 demonstra o produto de interesse cationizado com K^+ em *m/z* 345,94 $[M+K]^+$. O valor calculado para esse composto é *m/z* 345,46, o que caracteriza a síntese do derivado

desprotegido. Portanto, o intermediário *Bis*MPA-PDA foi obtido com êxito por essa metodologia, com rendimento de 60%.

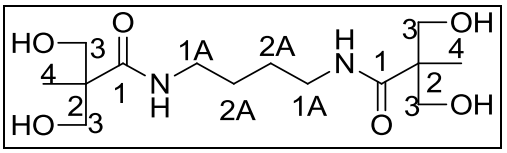


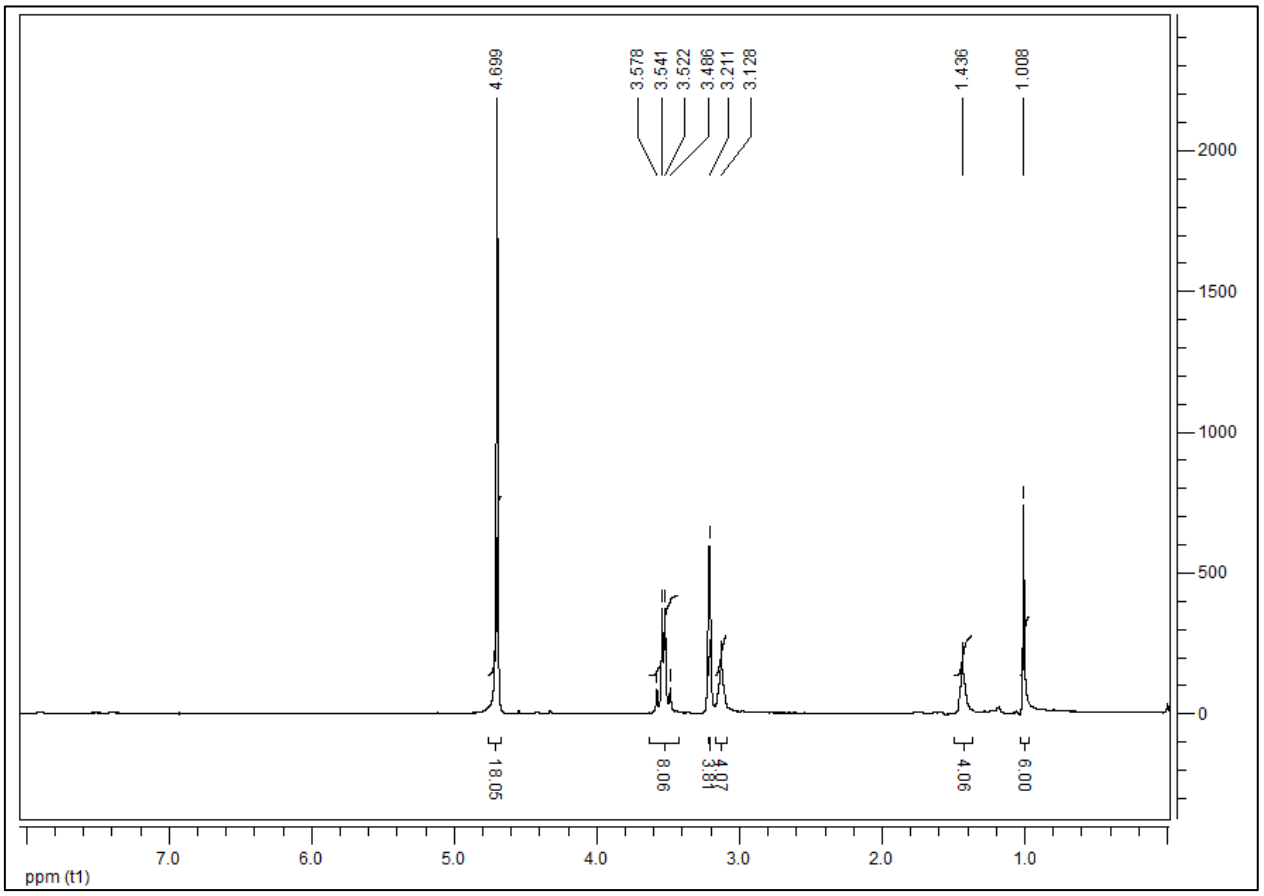
Espectro 62: Espectro de massas – MALDI-ToF (+) do intermediário BisMPA-PDA. Matriz: Grafite.

4.5.2.5.2 *Desproteção do intermediário* Bis*MPAP-BTDA, obtenção do intermediário BisMPA-BTDA*

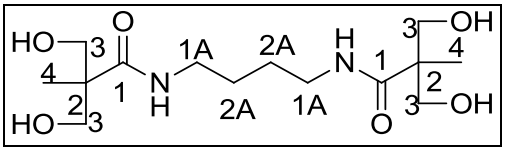
Realizou-se, também, a desproteção do intermediário *Bis*MPAP-BTDA, com as condições de hidrogenólise descritas anteriormente. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 63) mostrou o desaparecimento do singleto em 5,41 ppm referente ao H_5 da proteção, bem como os multipletos entre 7,19-7,40 ppm que correspondem os hidrogênios do grupo benzilideno, também, desapareceram. Além disso, no RMN observam-se os sinais dos hidrogênios H_4, e H_3 do *Bis*MPA. Com relação à butanodiamina, os sinais em 1,43 e 3,12 ppm mostram os hidrogênios 2A e 1A do foco central. Os sinais em 3,2 e 4,7 ppm são referentes ao solvente utilizado no preparo da amostra de RMN, respectivamente, metanol (CD_3OD) e água presente no solvente deuterado. Outro indicativo de obtenção do produto desprotegido é o espectro de RMN ^{13}C (Espectro 64), em que se observa, também, o desaparecimento dos carbonos aromáticos na região de 125-137 ppm, além do carbono 5 em 101,74 ppm. Os carbonos C_4 e C_3 do agente

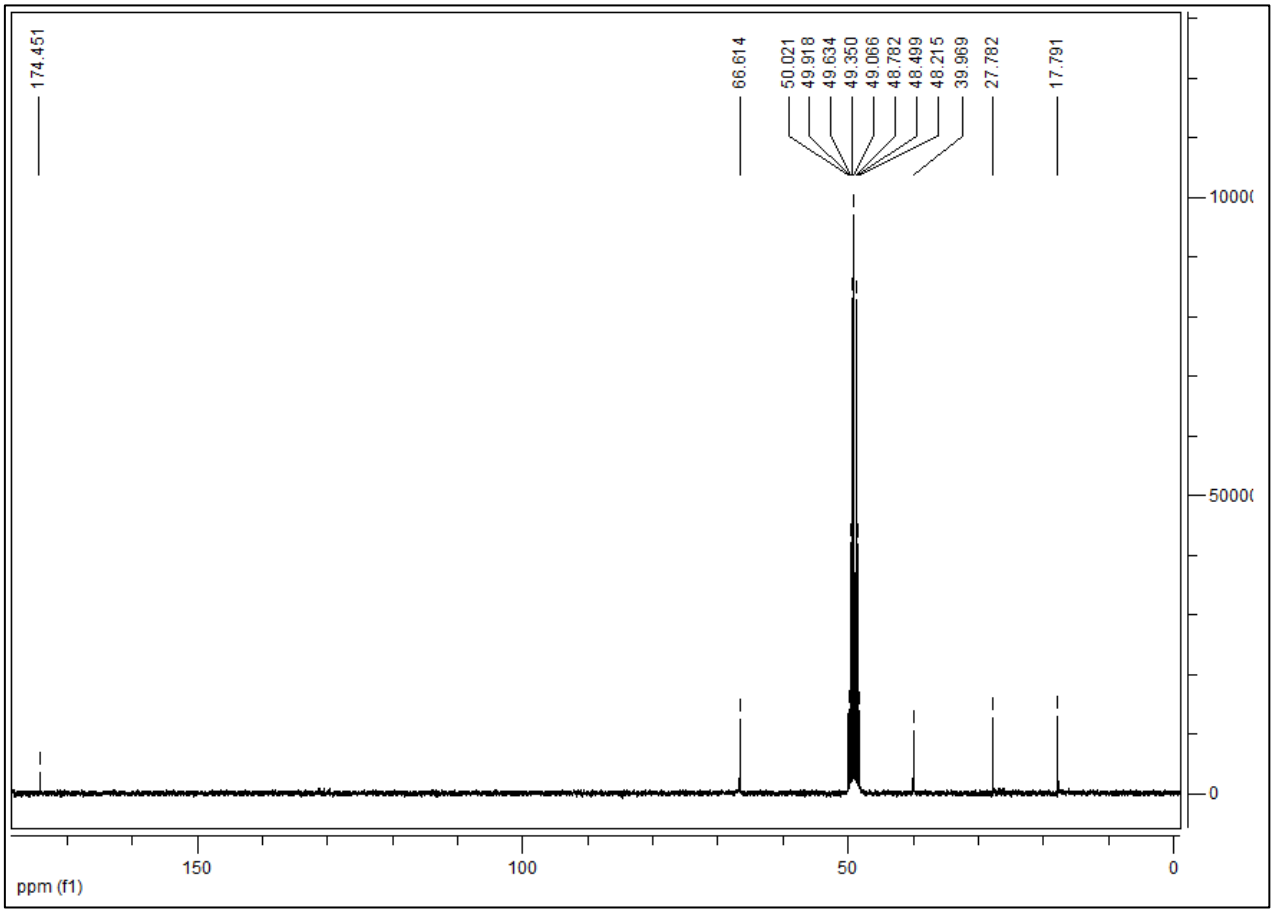
espaçante estão representados em 17,79 e 66,61 ppm. Em adição, os carbonos da butanodiamina apareceram em 27,78 e 39,96 ppm, relativos a C_{2A} e C_{1A} do foco central. E por fim, o grupo carbonílico de amida é observado em 174,45 ppm. O produto final foi obtido com 35% de rendimento e é um sólido branco higroscópico.





Espectro 63: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD) do intermediário *Bis*MPA-BTDA, produto obtido na reação de desproteção.





Espectro 64: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do intermediário *Bis*MPA-BTDA, produto obtido na reação de desproteção.

RMN ^{13}C (CD_3OD), 75 MHz, δ
49,00 (CD_3OD); 17,79 (C_4); 27,78 (C_{2A}); 39,96 (C_{1A}); 50,02 (C_2); 66,61 (C_3); 174,45 (C_1).

4.5.2.6 Funcionalização dos agentes bioativos

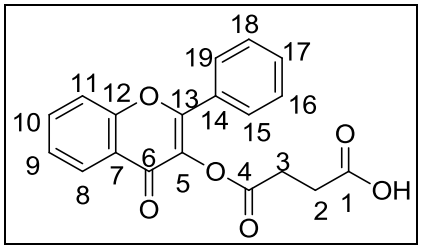
A funcionalização é importante para que ocorra a reação de acoplamento com o intermediário *Bis*MPA e os diferentes focos centrais. Para a funcionalização utilizou-se a 3-hidroxiflavona, composto estudado neste trabalho. Além desse flavonóide, realizou-se, também, a funcionalização de outros agentes com atividade antimicrobiana, como o metronidazol e a isoniazida. Neste contexto, utilizaram-se como agentes espaçantes para a funcionalização o anidrido succínico, cujo mecanismo de reação é descrito na Figura 51 e, também, o ácido málico, no qual o mecanismo de reação está representado na Figura 52.

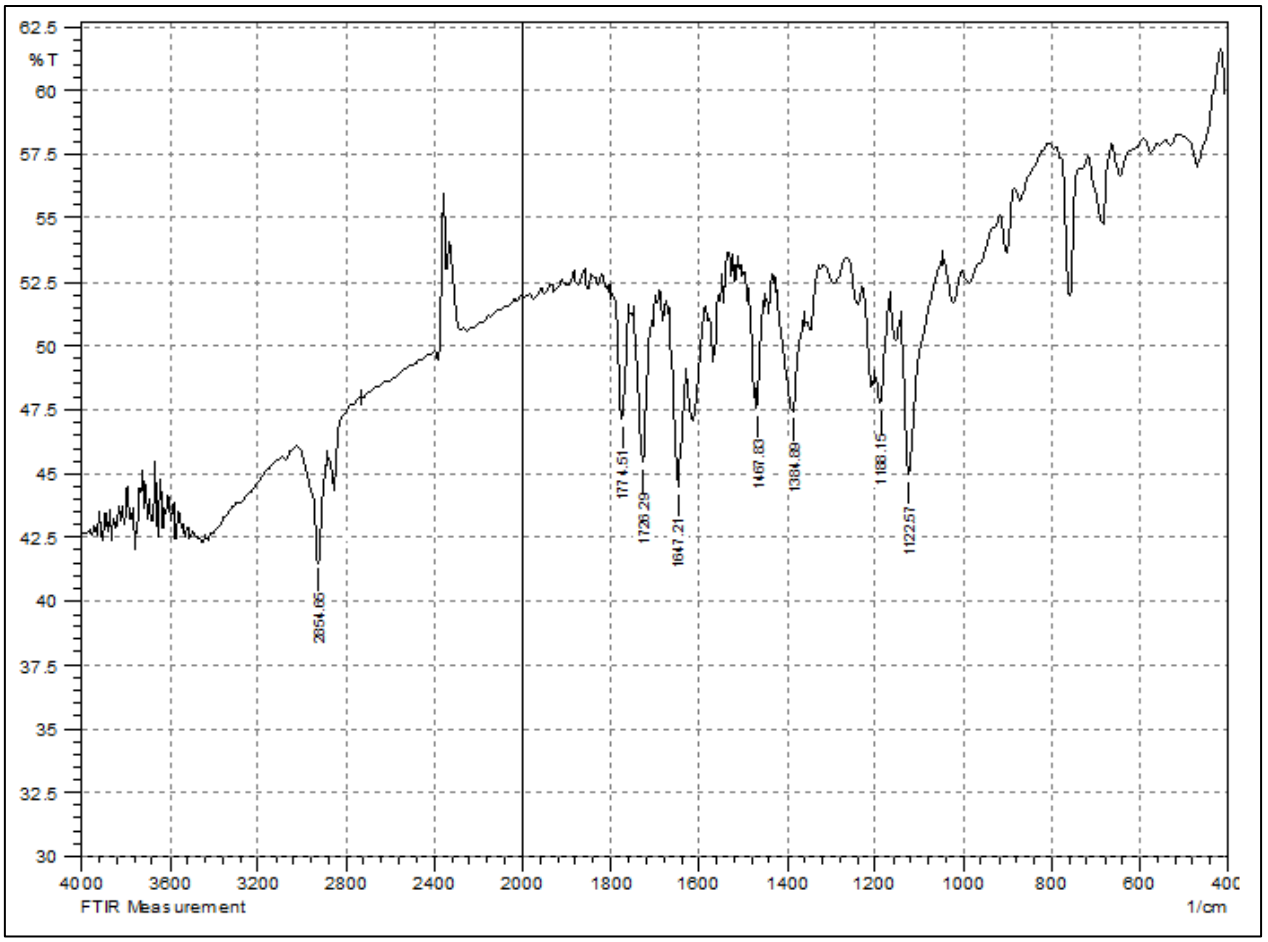
4.5.2.6.1 *Síntese do hemissucinato de 3-hidroxiflavona*

A cromatografia em camada delgada apresentou duas manchas, uma delas relativa ao material de partida, 3-hidroxiflavona, que tem R*f* igual a 0,81. A outra mancha apresentou valor de R*f* de 0,64, o que indicou a formação do produto de interesse com caráter mais polar. A coluna cromatográfica foi realizada e esse produto mostrou-se muito instável. Ambas as manchas foram devidamente separadas na purificação em coluna. No entanto, na CCD após a purificação surgiu novamente a mancha característica da 3-hidroxiflavona, o que indica a hidrólise do produto de interesse, revelando que esse produto é instável.

O espectro no IV (Espectro 65) indica a obtenção do hemissucinato de 3-hidroxiflavona. Neste espectro, observam-se bandas de estiramento relacionadas à 3-hidroxiflavona em 1647 e 1467 cm^{-1} referentes à carbonila e dupla ligação de aromáticos, bandas que caracterizam a presença deste composto bioativo. Também, observam-se bandas fortes de estiramento de CH alifático em 2854 cm^{-1}, relativa aos grupos CH_2 do ácido succínico. Em adição, são evidentes as bandas em 1774 e 1726 cm^{-1}, relacionadas à presença de carbonila do ácido carboxílico e da função éster formada, respectivamente. Além disso, observa-se a banda em 1384 cm^{-1}, referente à deformação de C-O de ácido carboxílico, e também, a banda em 1188 cm^{-1}, relativa à deformação de C-O da função éster formada.

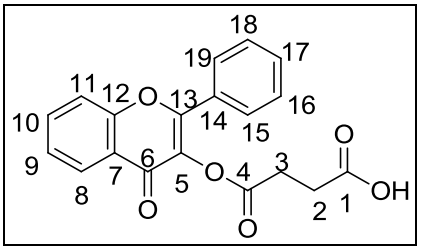
O RMN ^{1}H (Espectro 66) mostra indícios da obtenção do produto, devido à presença dos hidrogênios na região de 2,6 ppm, que podem estar relacionados aos CH_2 do ácido succínico. Com relação ao composto bioativo, estão presentes os hidrogênios aromáticos na região de 7-8 ppm. No entanto, o espectro ainda apresenta excesso de sinais mostrando que a coluna cromatográfica não foi um método eficiente para purificação do hemissucinato de 3-hidroxiflavona puro.

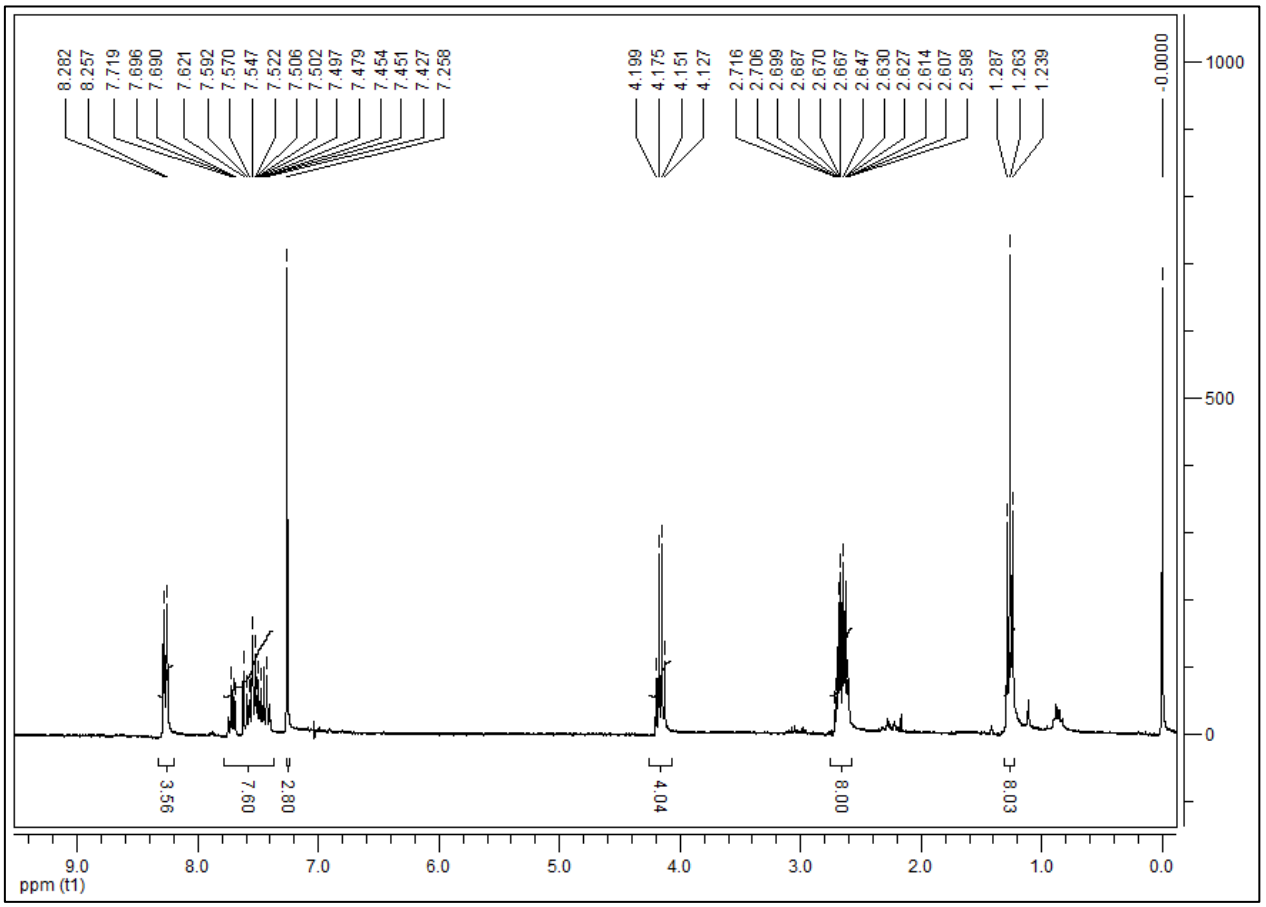




Espectro 65: Espectro no IV do hemissucinato de 3-hidroxiflavona.

IV (ν, KBr, cm^{-1})
2854 (ν CH_2 alifático); 1774 (ν $_{C=O}$ ácido carboxílico); 1726 (ν $_{C=O}$ éster); 1647 (ν $_{C=O}$ flavona); 1467 (δ CH_2 alifático angular assimétrica); 1384 (δ $_{C-O}$ de ácido carboxílico); 1188 (ν $_{C-O}$ éster).





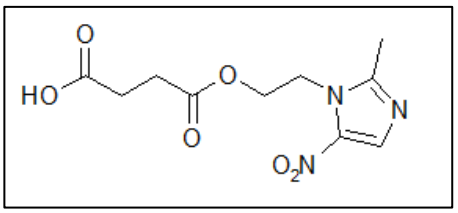
Espectro 66: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) do hemissucinato de 3-hidroxiflavona.

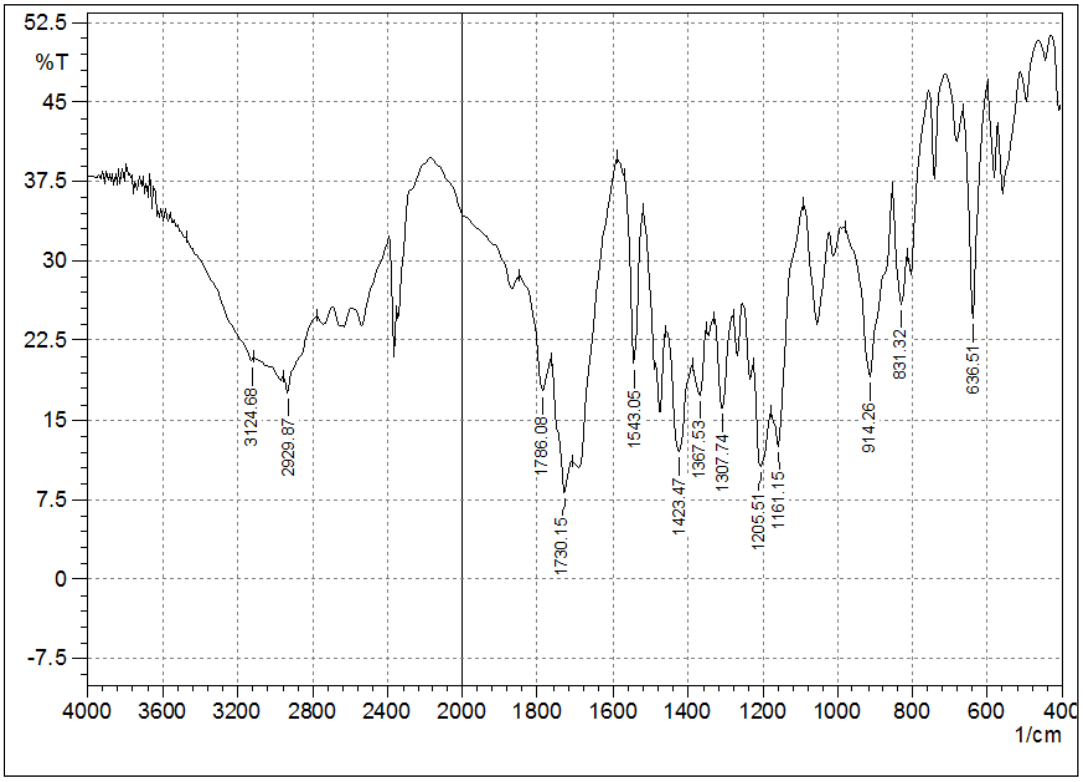
4.5.2.6.2 *Síntese do hemissucinato de metronidazol*

Em razão da dificuldade de obtenção de derivados de 3-hidroxiflavona, resolveu-se utilizar o fármaco metronidazol, que apresenta atividade antichagásica (MORELLO, 1988) e possui estrutura mais simples. Neste experimento, utilizou-se o anidrido succínico, com o intuito de se obter o hemiéster do metronidazol.

Ao término da reação, a cromatografia em camada delgada mostrou a presença de uma mancha diferente do material de partida (metronidazol R*f* de 0,82), com valor de R*f* 0,64, o que indica a obtenção do produto de interesse. O espectro no IV (Espectro 67) é mais uma evidência da síntese do hemissucinato de metronidazol. Neste espectro, observa-se banda de estiramento em 1543 cm^{-1} relativa ao grupo NO_2 do metronidazol. Ainda com relação ao composto bioativo, as bandas de deformação em 1307 e 831 cm^{-1} caracterizam, respectivamente, o grupo nitro e CH de aromático 1,4-substituído. Observam-se as bandas de estiramento do ácido succínico em 3124 e 2929 cm^{-1}, referentes OH livre do ácido e de CH alifático, respectivamente. A banda de deformação em 1423 cm^{-1} está relacionada aos grupos etilênicos do ácido succínico. Os principais indicativos de obtenção do composto de interesse são as bandas de estiramento em 1786 e 1730 cm^{-1}, relativas, respectivamente, às carbonilas do ácido carboxílico e do éster formado. Em adição, em 1205 e 1161 cm^{-1} observam-se as bandas de deformação da ligação C-O de éster.

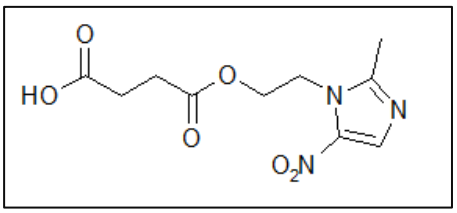
Adicionalmente, o RMN ^1H (Espectro 68) apresentou os sinais referentes ao metronidazol na região de 4,3 a 4,5 ppm, 8,03 e 2,90 ppm, que estão relacionados, respectivamente, aos hidrogênios dos grupos etilênicos do metronidazol, CH do anel aromático e da metila presente no imidazol. Com relação à ligação formada entre o metronidazol e o ácido succínico, os sinais dos CH_2 do ácido succínico, provavelmente, estão encobertos pelo DMSO no preparo da amostra de RMN em 2,50 ppm. No entanto, observa-se o deslocamento químico do CH_2 ligado a OH livre do metronidazol, que antes aparecia em 3,7 ppm e agora foi deslocada para 4,5 ppm, revelando a formação do éster de interesse. Além disso, observam-se os sinais do ácido carboxílico livre em 12 ppm. Portanto, estes indícios mostram que com esta metodologia obteve-se o hemissucinato de metronidazol, mas este método necessita de aprimoramento.

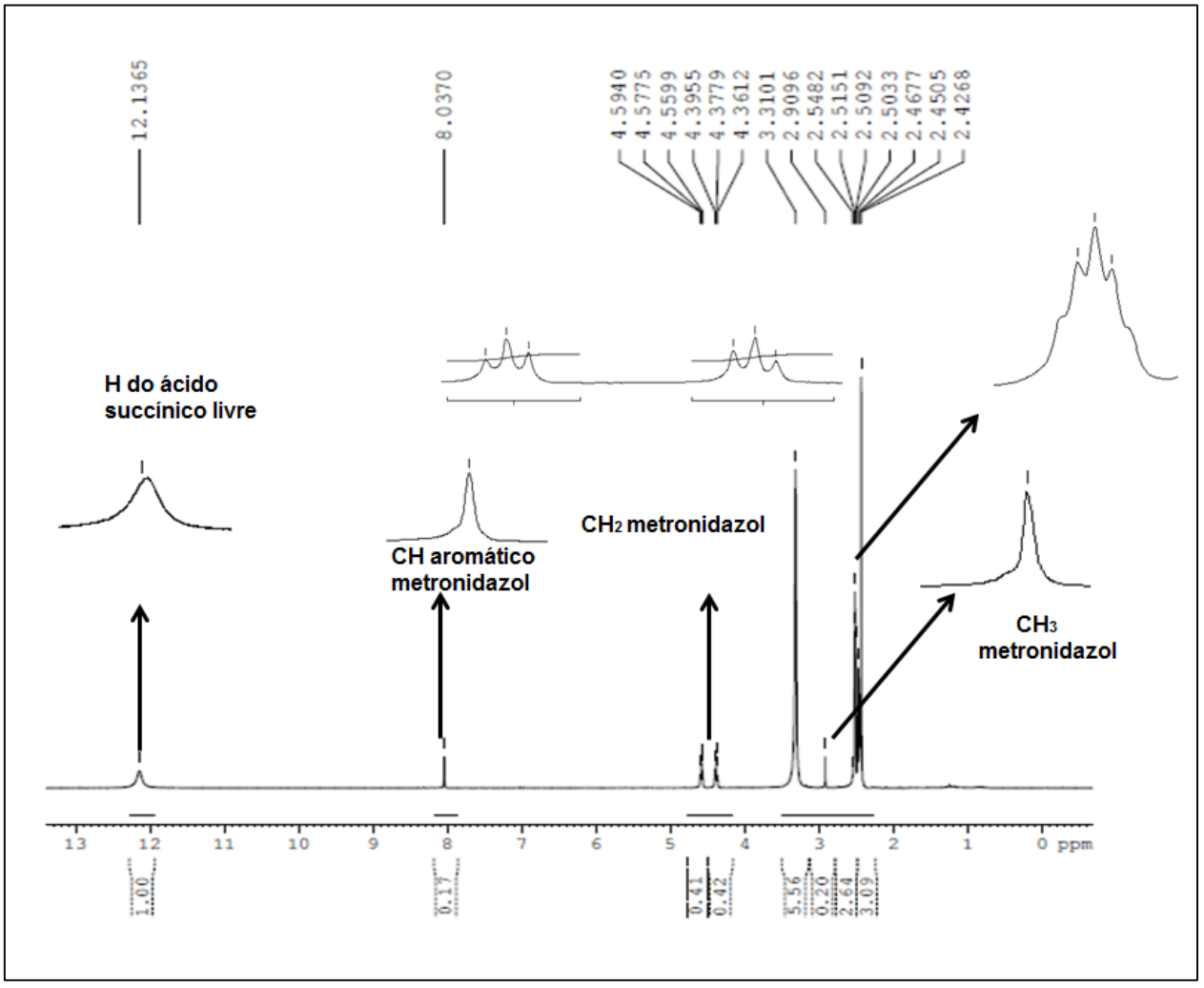




Espectro 67: Espectro no IV do hemissucinato de metronidazol.

IV (ν, KBr, cm^{-1})
3128 (ν_{OH} ácido carboxílico); 2929 (ν CH alifático); 1784 ($\nu_{C=O}$ ácido carboxílico); 1728 ($\nu_{C=O}$ éster); 1543 (ν_{N-O} nitro); 1423 (δ CH_2 angular assimétrica); 1307 (δ_{N-O} axial simétrica); 1205 (δ_{C-O} éster); 1161 (δ_{C-O} éster); 831 (δ CH aromático 1,4-substituído).



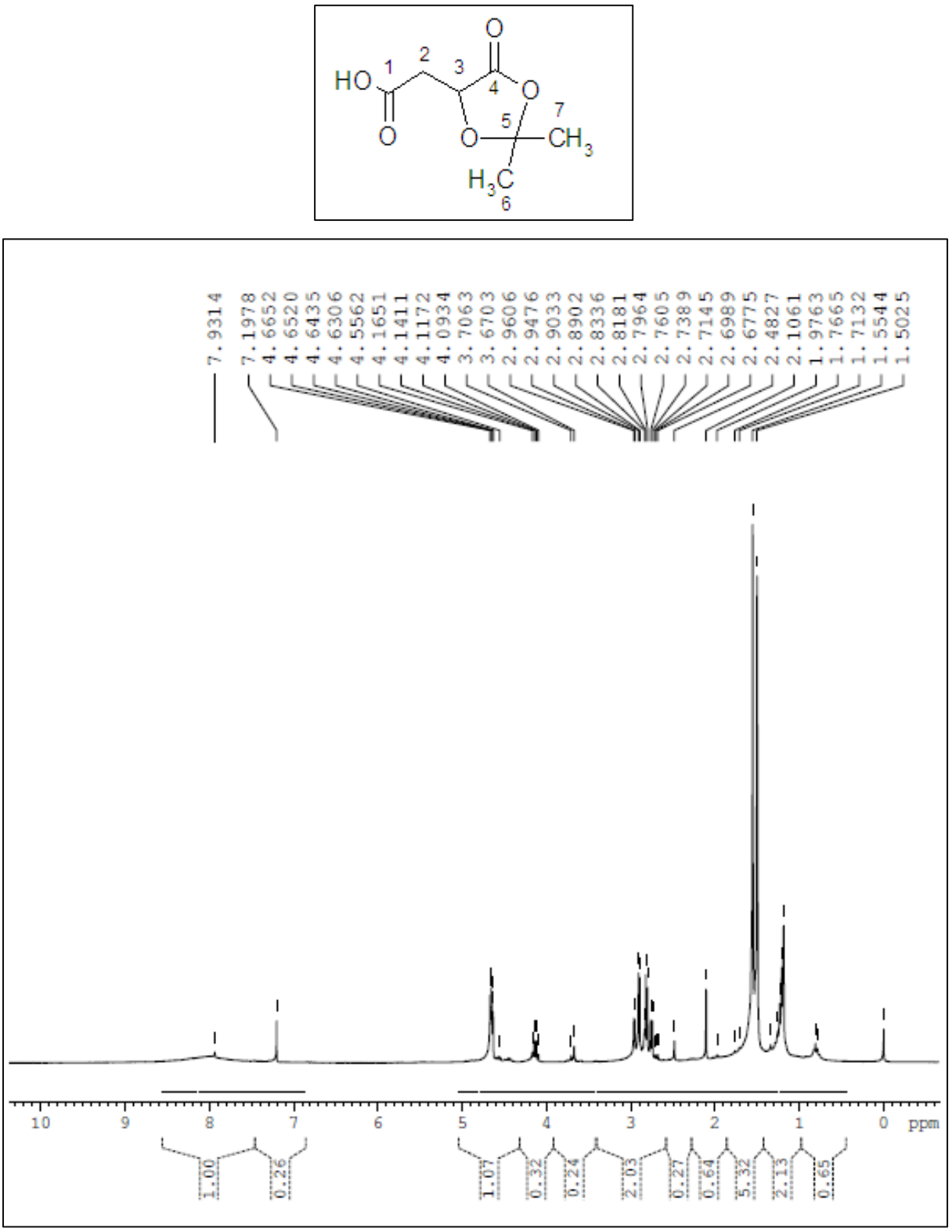


Espectro 68: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$_{d6}$) do hemissucinato de metronidazol.

4.5.2.6.3 *Síntese do intermediário AMP e metronidazol*

Devido à instabilidade apresentada pelo intermediário III (composto pelo ácido málico e 3-hidroxiflavona), outra tentativa realizada foi a substituição da 3-hidroxiflavona pelo metronidazol, com o intuito de sintetizar o intermediário resultante da ligação do AMP e o metronidazol.

A princípio, realizou-se o mesmo procedimento utilizado para a síntese do intermediário II, que foi denominado como experimento Q1. Neste método, durante a reação observou-se a formação de três manchas com R*f* equivalentes a 0,60; 0,82 (referente ao AMP e metronidazol, respectivamente) e 0,90, o que indicou a possível obtenção do intermediário de interesse. No entanto, após o processo de extração em que foram utilizadas soluções ácidas, salinas e básicas, não se observou a presença da mancha indicativa do composto de interesse. Após este processo, na CCD verificaram-se as manchas dos materiais de partida com R*f* iguais 0,60 a 0,82, respectivamente, AMP e metronidazol. Portanto, provavelmente, o produto sofreu hidrólise. Por esta razão, realizou-se o experimento Q2, em que se extraiu o conteúdo reacional apenas com solução saturada de cloreto de sódio, para evitar a hidrólise do composto de interesse. Entretanto, após o processo de extração, novamente, na cromatografia em camada delgada observou-se apenas a mancha relativa ao material de partida, AMP. Além disso, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 69) mostrou apenas a presença dos sinais relativos ao agente espaçante em 1,50 e 1,55 ppm, e nas regiões de 2,70-2,90 e em 4,60 ppm, referentes aos hidrogênios H_6 e H_7, H_2 e H_3 do ácido málico protegido, respectivamente. Neste espectro não são observados sinais do metronidazol. Acredita-se que o composto de interesse tenha sofrido hidrólise durante o processo de isolamento do produto do meio reacional. Assim, por este procedimento o intermediário formado pelo AMP e o metronidazol não foi obtido.



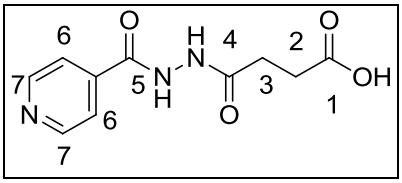
Espectro 69: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre o AMP e metronidazol, experimento Q2.

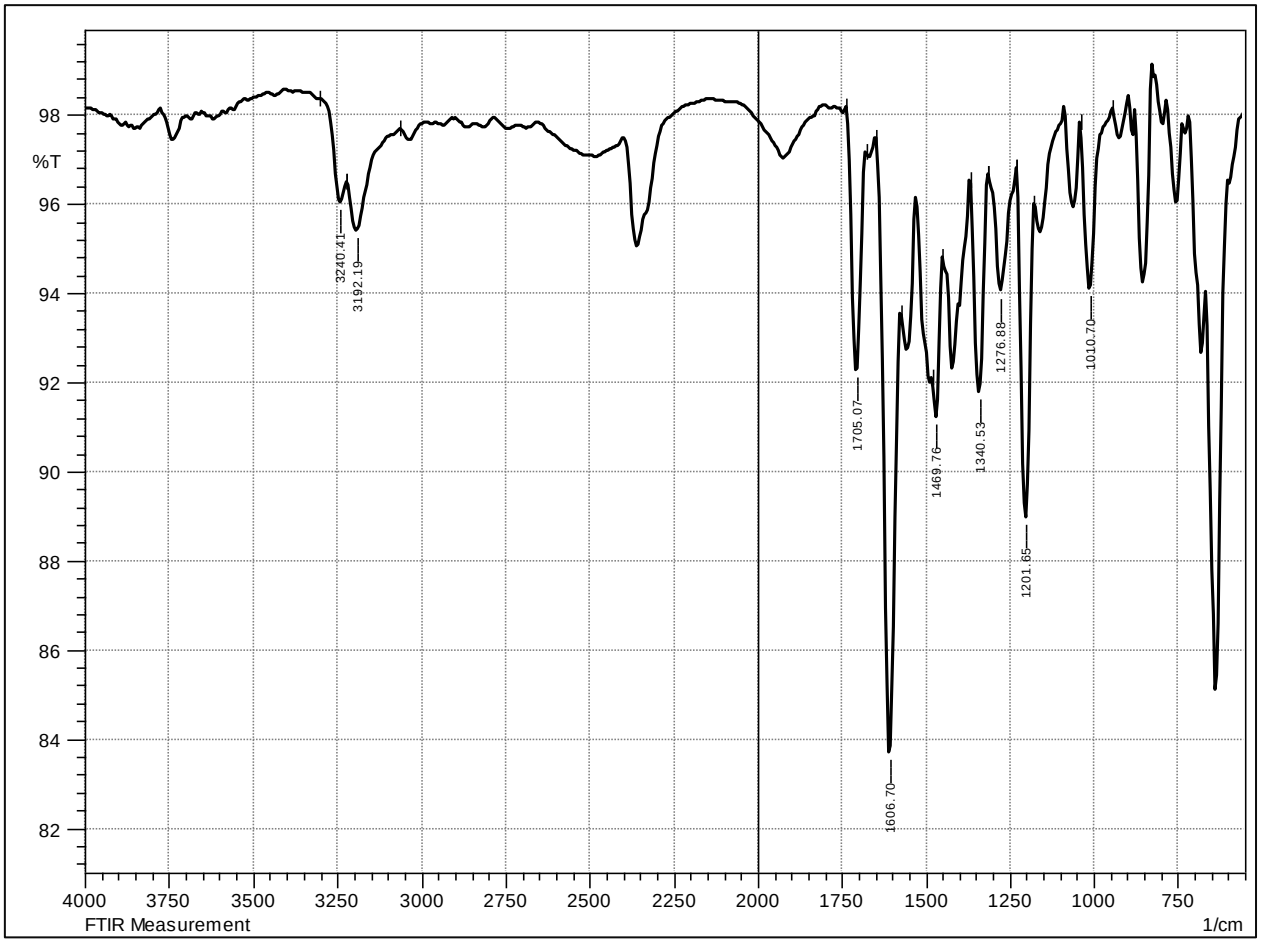
4.5.2.6.4 *Síntese da hemissucinamida de isoniazida*

Com o mesmo propósito de se testar o método com derivado mais simples, utilizou-se outro fármaco, a isoniazida, apesar de ser agente tuberculostático.

As análises espectroscópicas indicaram a obtenção da hemissucinamida de isoniazida. O IV (Espectro 70) mostrou as bandas relativas à isoniazida, em 3192, 1606 e 1276 cm^{-1}, que caracterizam, respectivamente, NH de hidrazida, carbonila da hidrazida e ligação C-N de aromático. Com relação ao ácido succínico, observam-se as bandas de deformação de CH_2 (1340 cm^{-1}) e de C-O de ácido carboxílico (1201 cm^{-1}). Em adição, as bandas de estiramento que caracterizam a obtenção da hemissucinamia de isoniazida aparecem em 3240 e 1705 cm^{-1}, que correspondem às ligações NH e carbonila de amida, respectivamente.

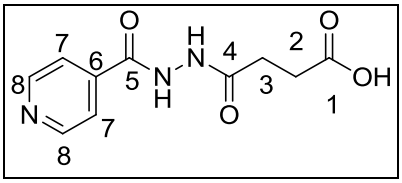
No RMN ^{1}H (Espectro 71) observaram-se os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos da isoniazida, em 7,8-8,8 ppm, bem como o sinal em 10,10 ppm do hidrogênio de OH de ácido carboxílico. Os sinais dos CH_2 do ácido succínico, provavelmente, estão encobertos pelo DMSO deuterado, utilizado para o preparo da amostra de RMN em 2,50 ppm. Em adição, o RMN ^{13}C (Espectro 72) apresentou os carbonos aromáticos da isoniazida em 121, 139, 150 e 163 ppm, que correspondem aos respectivos C_7, C_6, C_8 e carbonila de hidrazida. Com relação ao ácido succínico, os CH_2 estão nítidos em 28,14 e 28,76 ppm. As principais evidências da síntese da hemissucinamida de isoniazida são os carbonos carbonílicos em 170,42 e 173,46 ppm, que caracterizam a carbonila de amida e de ácido carboxílico, respectivamente. O produto foi obtido com rendimento de 87% como sólido branco amorfo.

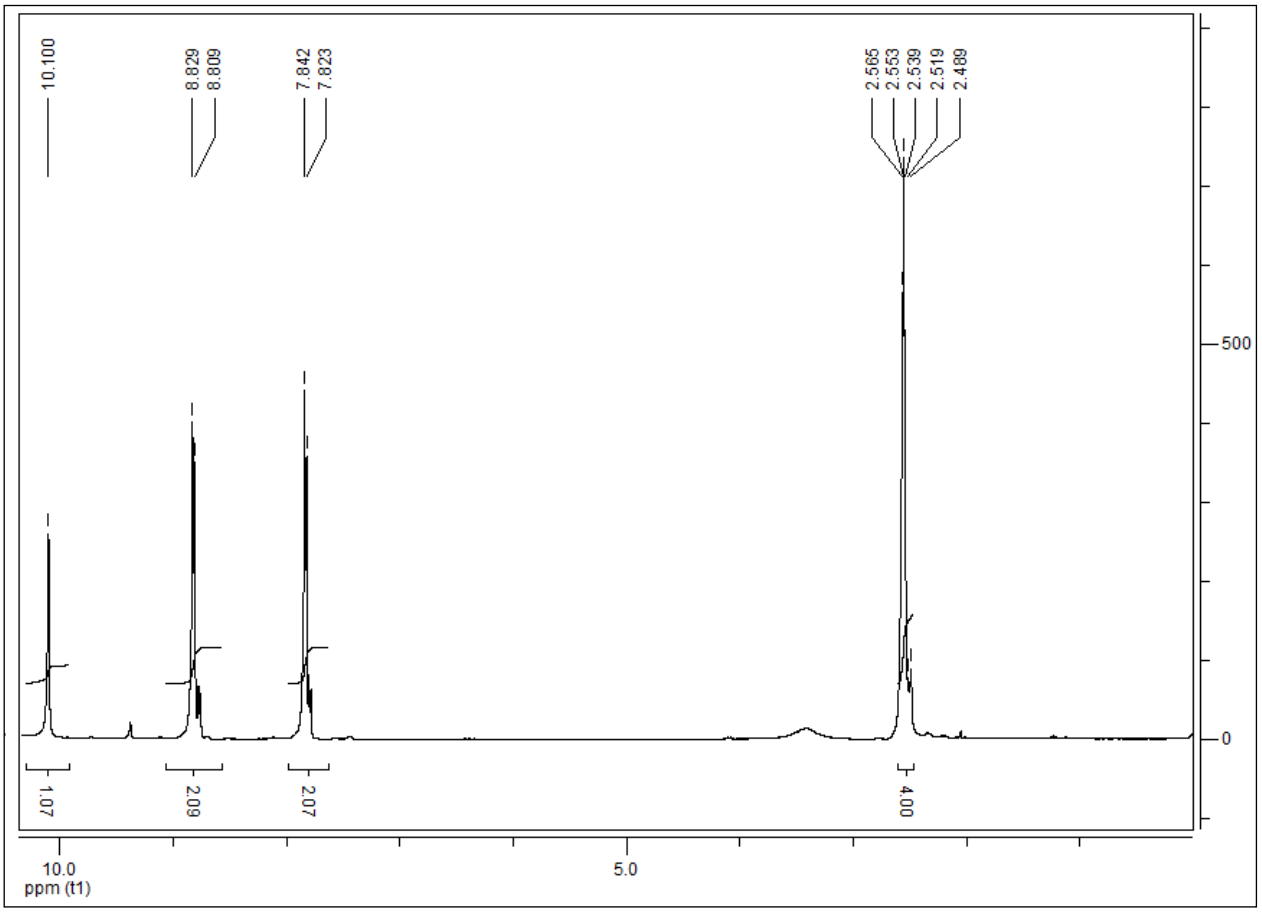




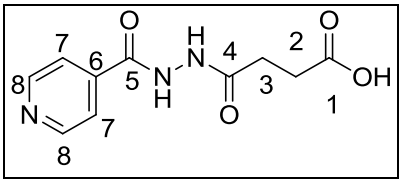
Espectro 70: Espectro no IV da hemissucinamida de isoniazida.

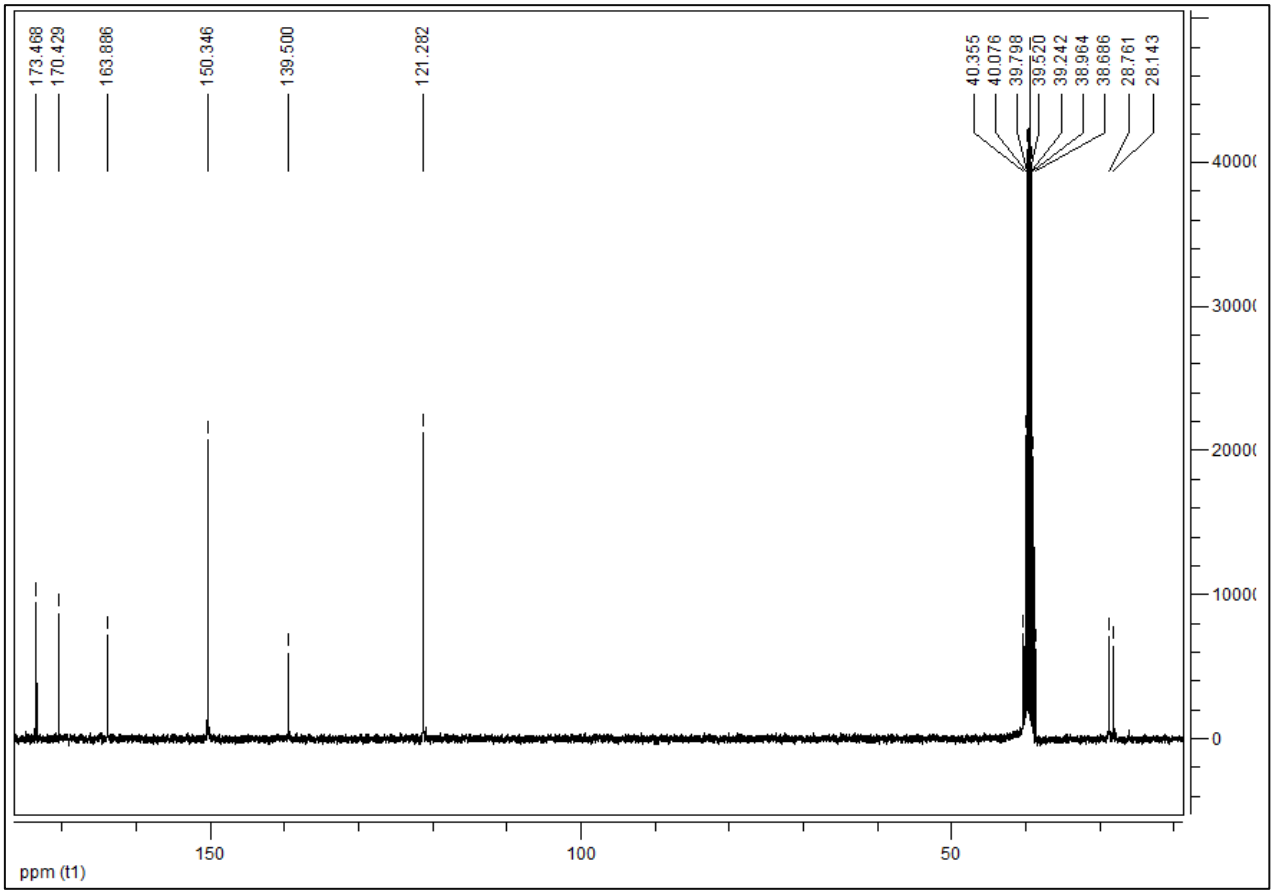
IV (ν, KBr, cm^{-1})
3240 (ν_{NH} amida); 3192 (ν_{NH} hidrazida); 1705 ($\nu_{C=O}$ amida); 1606 ($\nu_{C=O}$ hidrazida); 1469 (δ CH_2 ácido succínico); 1340 (δ_{C-O} ácido carboxílico); 1276 (δ_{C-N} aromático); 1201 (δ_{C-O} ácido carboxílico).





Espectro 71: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$_{d6}$) da hemissucinamida de isoniazida.





Espectro 72: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-$_{d6}$) da hemissucinamida de isoniazida.

RMN ^{13}C (DMSO-$_{d6}$), 75 MHz, δ
39,00 (DMSO-$_{d6}$); 28,14 (C_2); 28,76 (C_3); 121,28 (C_7); 139,50 (C_6); 150,34 (C_8); 163,88 (C_5); 170,42 (C_4); 173,48 (C_1).

Conclusões e perspectivas

"A melhor forma de prever o futuro é criá-lo."

Alan Kay

5. **CONCLUSÕES**

As etapas de síntese e purificação de dendrímeros não são processos triviais. Dois aspectos foram muito importantes e dificultaram a obtenção dos pró-fármacos dendriméricos propostos: a dificuldade de purificação e a instabilidade dos derivados de 3-hidroxiflavona. Nas etapas de purificação, esses derivados mostraram-se instáveis e observou-se a hidrólise do produto.

Na abordagem convergente, os derivados sintetizados com 3-hidroxiflavona mostraram-se instáveis nas condições sintéticas e de purificação testadas. O intermediário II (AMP e 3-hidroxiflavona) foi sintetizado e purificado com sucesso. Além disso, o intermediário III desprotegido (AM e 3-hidroxiflavona) foi obtido com pureza cromatográfica de 94,7%. No entanto, esse derivado desprotegido mostrou-se instável em condições ácidas, básicas (especialmente com a utilização de aminas), na presença de luz e temperatura e sob diferentes condições de purificação. Nestas circunstâncias, observou-se a degradação do produto, através da hidrólise da ligação éster formada entre o ácido málico e a 3-hidroxiflavona. Ainda assim, com a síntese sob refrigeração e utilizando o foco central etilenoglicol, existem indicativos da síntese de pró-fármaco dendrimérico de 3-hidroxiflavona. No entanto, mesmo após a etapa de purificação este composto ainda apresenta-se impuro.

Neste sentido, para evitar a degradação dos derivados sintéticos de 3-hidroxiflavona, bem como as dificuldades de purificação, foi realizada a síntese pela abordagem divergente. Nesta rota sintética, o composto bioativo é acoplado a estrutura do dendrímero na última etapa de síntese. Por esta metodologia, foi possível sintetizar os intermediários puros compostos pelos focos centrais (propano- e hexano-diamina) ligados ao agente espaçante (ácido málico). Devido a falta de tempo não foi possível concluir a síntese dos pró-fármacos dendriméricos pela via divergente.

6. **PERSPECTIVAS**

Método divergente

⇒ Aprimoramento das condições de purificação dos pró-fármacos dendriméricos obtidos pelo processo de aminólise da lactona.

Método convergente

⇒ Desenvolvimento de técnicas de purificação para os pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona, obtidos a partir do intermediário III.

Outras abordagens

⇒ No caso dos intermediários *Bis*MPA-PDA e *Bis*MPA-BTDA, realizar o acoplamento com os derivados funcionalizados de metronidazol e isoniazida, para a obtenção dos dendrímeros de primeira geração com potencial atividade biológica.

Referências

"O conhecimento é o alimento da alma."

Platão

7. **REFERÊNCIAS***

ABOUSSAFY, C.L.; JONES, B.P.; PRICE, K.E.; HARDINK, M.A.; McLAUGHLIN, R.W.; LILLIE, B.M.; HAWKINS, J.M.; VAIDYANATAN, R. DBU Catalysis of *N*,*N*´-carbonyldiimidazole mediates amidations. **Organic Letters**, v.12, n.2, p.324-327, 2010.

ADAMS, L.V.; TALBOT, E.A.; ODATO, K.; BLUNT, H.; STEINGART, K.R. Interventions to improve delivery of preventive therapy: an overview of systematic reviews. **BMC Infectious Diseases**, v.14, p.281-290, 2014.

AEBISCHER, T. *Leishmania* spp. proteome data sets: a comprehensive resource for vaccine development to target visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v.5, p.1-8, 2014.

AFONSO, A.M.; EBELL, M.H.; TARLETON, R.L. A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, p.e1881-e1890, 2012.

AHMED, S.; VEPURI, S.B.; KALHAPURE, S.; GOVENDER, T. Interactions of dendrimers with biological drug targets: reality or mystery – a gap in drug delivery and development research. **Biomaterials Science**, v.4, p.1032-1050, 2016.

ALAKURTTI, S.; HEISKA, T.; KIRIAZIS, A.; SIERRA, N.S.; JAFFE, C.L.; KAUHALUOMA, J.Y. Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.1573-1582, 2010.

ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; JONGH, C.R.; LEBEL, C.L.; STEVENS, C.L. **Química Orgânica.** Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978. p.472-497.

ALVES, J.L.N. **Síntese do dendrímero de primeira geração utlizando *Bis*-MPA como monômero e 1,3-propanodiamina como foco central**. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016. 54p [Trabalho de Conclusão de Curso].

AMATO NETO, V.; GRYSCHEK, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. **Parasitologia –** uma abordagem clínica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.104–110, 112–115, 118–126.

AMATO, V.S.; TUON, F.F.; SIQUEIRA, A.M.; NICODERNO, A.C.; AMATO NETO, V. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, p.266-274, 2007.

AMORA, S.S.A.; BEVILAQUA, C.M.L.; FEIJÓ, F.M.C.; ALVES, N.D.; MACIEL, M.V. Control of phlebotomine (díptera: psychodidae) leishmaniasis vectors. **Neotropical Entomology**, v.38, p.303-310, 2009.

ANDRADE, D.V.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Neglected Tropical DIseases**, v.8, p.1-10, 2014.

ANDRADE, Z. Immunopathology of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.71–80, 1999.

ARAÚJO, A. J. G.; SABROZA, P. C.; SILVA, L. F. R. F. **Doença de Chagas:** epidemiologia – situação atual. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 2012. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=131>. Acesso em: 11/06/2012 às 15h.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008. p.16-25.

ARSENEAULT, M.; WAFER, C.; MORIN, J.F. Recent advances in click chemistry applied to dendrimer synthesis. **Molecules**, v.20, p.9263-9294, 2015.

ASSIS, D.M.; GONTIJO, V.S.; PEREIRA, I.O.; SANTOS, J.A.N.; CAMPS, I.; NAGEM, T.J.; ELLENA, J.; IZIDORO, M.A.; TERSARIOL, I.L.S.; BARROS, N.M.T.; DORIGUETTO, A.C.; SANTOS, M.H.; JULIANO, M.A. Inhibition of cysteine proteases by a natural biflavone: behavioral evaluation of fukugetin as papain and cruzain inhibitor. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.28, p.661-670, 2013.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

ASTRUC, D.; BOISSELIER, E.; ORNELAS, C. Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. **Chemical Reviews**, v.110, p.1857-1959, 2010.

AYELE, H.T.; MOURIK, M.S.M.; DEBRAY, T.P.A.; BONTEN, M.J.M. Isoniazid prophylactic therapy for the prevention of tuberculosis in HIV infected adults: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **PLoS One**, v.10, p.e0142290-e0142306, 2015.

BADIEE, A.; SHARGH, V.H.; KHAMESIPOUR, A.; JAAFARI, M.R. Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: present and future trends. **Vaccine**, v.31, p.735-749, 2013.

BEAUMIER, C.M.; GILLESPIE, P.M.; HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. **Translational Research**, v.162, p.144-155, 2013.

BEER, M.F.; FRANK, F.M.; ELSO, O.G.; BIVONA, A.E.; CERNY, N.; GIBERTI, G.; MALCHIODI, E.L.; MARTINO, V.S.; ALONSO, M.R.; SÜLSEN, V.P.; CAZORLA, S.I. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids isolated from *Stevia satureiifolia* var. *satureiifolia*. **Pharmaceutical Biology**, v.17, p.1-8, 2016.

BERG, E.M.M.B.; MEIJER, E.W. Poly(propylene imine) dendrimers: large-scale synthesis by hetereogeneously catalyzed hydrogenations. **Angewandte Chemie International. Edition in English**, v.32, p.1308-1311, 1993.

BERMUDÉZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; RELA, J.P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica,** v.156, p.1-16, 2016.

BERN, C. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, v.373, p.456-466, 2015.

BERTHELOT, T.; GONÇALVES, M.; LAIN, G.; GIONNET, K.E.; DÉLÉRIS, G. New strategy towards the efficient solid phase synthesis of cyclopeptides. **Tetrahedron**, v.62, p.1124-1130, 2006.

BEZWADA, R.S. Absorbable branched polyesters and polyurethanes. US Pat. 0142199 A1. 2014. 42p.

BIASUTTO, L.; ZORATTI, M. Prodrugs of quercetin and resveratrol: a strategy under development. **Current Drug Metabolism**, v.15, p.77-95, 2014.

BOAS, U.; HEEGAARD, P.M.H. Dendrimers in drug research. **Chemical Society Reviews**, v.33, p.43-63, 2004.

BOCCHINO, M.; MATARESE, A.; SANDUZZI, A. Current treatment options for latent tuberculosis infection. **Journal of Rheumatology**, v.91, p.71-77, 2014.

BOMBARELLI, R.G.; CALLE, E.; CASADO, J. Mechanisms of lactone hydrolysis in acidic conditions. **Journal of Organic Chemistry**, v.78, p.6880-6889, 2013.

BREWSTER, M.E.; BODOR, N. Improved brain delivery of antiviral agents through the use of redox targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.14, p.177-197, 1994.

BRITO, M.E.F.; ANDRADE, M.S.; TORRES, F.D.; RODRIGUES, E.H.G.; CAVALCANTI, M.P.; ALMEIDA, A.M.P.; BRANDÃO, S.P. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, p.425-429, 2012.

BUCKNER, F.S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.23, p.609-616, 2010.

CAVILLO, S.M.; RUEDA, J.C.V.; MARTINEZ, L.E.F.; CELA, R.G.M.; ÂNGULO, E.E.F.Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, p.1-15, 2010.

CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Anti-*T. cruzi* agents: our experience in the evaluation of more than five hundred compounds. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.8, p.1355-1383, 2008.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.873-882, 2007.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, v.20, p.22-35, 2014.

CHENG, Y.; XU, Z.; MA, M.; XU, T. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.97, p.1-21, 2007.

CHOI-SLEDESKI, Y.M.; WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: WERMUTH, C.G; ALDOUS, D.; RABOISSON, P.; ROGNAN, D. (Eds.) **The practice of medicinal chemistry**. 4 ed. London: Academic Press, 2015. p.657-696.

CHRISTIE, W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. **Advances in Lipid Methodology - Two**, p.169-111, 1993.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; SANTOS, J. L.; GIAROLLA, J.; RANDO, D. G.; ALMEIDA, A.E.; BOSQUESI, P. L.; MENEGON, R. F.; BLAU, L. Prodrugs for the treatment of neglected diseases. **Molecules Online,** v.13, p.616-677, 2008.

CHUNG, M. C.; SILVA, A. T.; CASTRO, L. F.; GÜIDO, R. V. C.; NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p.155-179, 2005.

CHUNG, M.C.; BOSQUESI, P.L.; SANTOS, J.L. A prodrug approach to improve the physico-chemical properties and decrease the genotoxicity of nitro compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v.17, p.3515-3526, 2011.

CLAS, S.D.; SANCHEZ, R.I.; NOFSINGER, R. Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges. **Drug Discovery Today**, v.19, p.79-87, 2014.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Nucleophilic substitution at C=O with loss of carbonyl oxygen. In: CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. Oxford: University Press, 2008. p.341-344.

COELHO, A.C.; TOSI, L.R.O.; COTRIM, P.C. Mapping of a *Leishmania* major gene / lócus that confers pentamidine resistance by deletion and insertion of transposable element. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, n.2, p.1–4, 2004.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.31-40, 2009.

COURA, J. R.; PEREIRA, J. B. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica**, v.115, p.5-13, 2010.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.113-122, 2007.

COURA, J.R.; PEREIRA, J.B. Chagas disease. What is known and what should br improved: a systemic review. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, v.45, p.286-296, 2012.

CROFT, S.L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.10, p.1478–1483, 2011.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.111-126, 2006.

D'EMANUELE, A.D.; ATTWOOD, D. Dendrimer-drug interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.2147-2162, 2005.

D'OCA, C.R.M. **Síntese de novas amidas graxas: estudos da influência da variação estrutural na atividade antituberculose.** Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010. 171p [Dissertação de Mestrado].

DA, D.D.N. Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs. **Molecules**, v.19, p.20780-20807, 2014.

DECKER, M.; NGUYEN, T.T.H.; LEHMANN, J.; Investigation into the mechanism of lactamization of lactones yielding in a novel route to biologically active tryptamine derivatives. **Tetrahedron**, v.60, p.4567-4578, 2004.

DELONG, M.A.; McFADDEN, J.M.; ROYALTY, S.M.; TOONE, E.J.; YINGLING, J.D. Prodrug derivatives of acids using alcohols with homotopic hydroxyl groups and methods for their preparation and use. US Pat. 0254920. 2007. 46p.

DENNY, P.W.; ELDIN, H.S.; PRICE, H.P.; SMITH, D.F.; SCHWARZ, R.T.The protozoan inositol phosphorylceramide synthase: a novel drug target which defines a new class of sphingolipid synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, p.28200-28209, 2006.

DEPRE, D.P.M.; HORVATH, A.; ORMEROD, D.J. Processes and intermediates for preparing a macrocyclic protease inhibitor of HCV. nº WO2008092955 A1, 2008.

DIAS, J. C. P. Globalização, inquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, p.S13-22, 2007.

DIAS, L. C.; DESSOY, M.A.; SILVA, J.J.N.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v.32, p.2444-2457, 2009.

DORLO, T.P.C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J.H.; VRIES, P.J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, p.2576-2597, 2012.

DUMONTEIL, E.; BOTTAZZI, M.E.; ZHAN, B.; HEFFERNAN, M.J.; JONES, K.; VALENZUELA, J.G.; KAMHAWI, S.; ORTEGA, J.; ROSALES, S.P.L.; BACON, K.; FLEISCHER, B.; SLINGSBY, B.T.; CRAVIOTO, M.B.; CONYER, R.T.; HOTEZ, P. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. **Expert Reviews Vaccines**, v.11, p.1043-1055, 2012.

ELMAHALLAWY, E.K.; AGIL, A. Treatment of leishmaniasis: a review and assessment of recent research. **Current Pharmaceutical Design**, v.21, p.2259-2275, 2015.

EL-ON, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. **Israel Medical Association Journal**, v.11, p.623-628, 2009.

ENGELMANN, M.D.; HUTCHESON, R.; CHENG, F. Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxyflavone (chrysin), and 3',4'-dihydroxyflavone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2953-2960, 2005.

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, p.58-85, 2013.

ESFAND, R.; TOMALIA, D.A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical application. **Drug Discovery Today**, v.6, p.427-436, 2001.

FARIA, M.S.; REIS, F.C.G.; PEREIRA, R.L.A.; MORRISON, L.S.; MOTTRAM, J.C.; LIMA, A.P.C.A. Leishmania inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. **Journal of Immunology**, v.186, p.411-422, 2011.

FERREIRA, E.I.; GIAROLLA, J. Pró-fármaco dendrimérico, Processo para sua preparação e composições contendo os mesmos. Protocolo de nº. 018070068714 junto à delegacia do INPI, 2008.

FERREIRA, L.G.; OLIVEIRA, M.T.; ANDRICOPULO, A.D. Advances and progress in Chagas disease drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.16, p.2290-2302, 2016.

FERREIRA, M. S.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E.; DIAS, J. C. P.; OSTERMAYER, A. L. Doença de Chagas. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds.) **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2010. p.1175-1210.

FÉRRIZ, J.M.; VINŠOVÁ, J. Prodrug design of phenolic drugs. **Current Pharmaceutical Design**, v.16, p.2033-2052, 2010.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targeted and drugs. **Pharmaceutical Research**, v.28, p.2758-2770, 2011.

FISHER, M.; VÖGTLE, F. Dendrimers: from design to application: a progress report. **Angewandte Chemie International Edition**, v.38, p.884-905, 1999.

FOLEY, M.A.; JAMISON, T.F. Amide bond formation via reversible, carboxylic acid-promoted lactone aminolysis. **Organic Process Research & Development**, v.14, p.1177-1181, 2010.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R.R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v.14, p.2317-2336, 2009.

FRIEBOLIN, H. Relationships between the spectrum and the molecular structure: In:____(Ed.). **Basic one-and two-dimensional NMR spectroscopy**. 2ed. New York: VCH, 1993, p.72-74.

FRIIS, G.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U. (Eds.) **A textbook of drug design and development**. 2 ed. Amsterdam: Harwood Academic: 1996, p.351-385.

GACHET, M.S.; LECARO, J.S.; KAISER, M.; BRUN, R.; NAVARRETE, H.; MUÑOZ, R.A.; BAUER, R.; SCHÜNLY, W. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.184-197, 2010.

GARCIA, L.V.; ROURA, M.; PELL, C.; POSADA, E.; GASCÓN, J.; ALDASORO, E.; MUÑOZ, J.; POOL, R. Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, p.1–8, 2013.

GARDIKIS, K.; SCRETTAS, M.M.; DEMETZOS, C.; STEELE, B.R. Dendrimers and the development of new complex nanomaterials for biomedical applications. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.4913-4928, 2012.

GASPAR, L.; MORAES, C.B.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; FERRARI, S.; COSTANTINO, L.; COSTI, M.P.; CORON, R.P.; SMITH, T.K.; SIQUEIRA-NETO, J.L.; McKERROW, J.H.; SILVA, A.C. Current and future chemotherapy for Chagas disease. **Current Medicinal Chemistry**, v.22, p.4293-4312, 2015.

GÉNISSON, V.B.; DERAEVE, C.; CHOLLET, A.; BERNADOU, J.; PRATVIEL, G. Isoniazid: an update on the multiple mechanisms for a singular action. **Current Medicinal Chemistry**, v.20, p.4370-4385, 2013.

GETAHUN, H.; MATTEELLI, A.; CHAISSON, R.E.; RAVIGLIONE, M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **New England Journal of Medicine**, v.372, p.2127-2135, 2015.

GIANG, I. BOLAND, E.L.; POON, G.M.K. Prodrug applications for targeted cancer therapy. **The Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v.16, p.899-913, 2014.

GIAROLLA, J. **Pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofural potencialmente antichagásicos. Estudo de condições sintéticas para a primeira geração.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 155p [Dissertação de Mestrado].

GIAROLLA, J. **Síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antichagásicos e leishmanicidas derivados de hidroximetilnitrofural, 3-hidroxiflavona e quercetina.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012, 183p [Tese de Doutorado].

GIAROLLA, J.; FERREIRA, E.I. Drug design for neglected disease in Brazil. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.15, p.220-242, 2015.

GILLIES E.R.; FRÉCHET, J.M.J. Designing macromolecules for therapeutic applications: polyester dendrimers-poly(ethylene oxide) “bow-tie” hybrids with tunable molecular weight and architecture. **Journal of the American Chemical Society,** v.124, p.14137-14146, 2002.

GONZÁLEZ, U; PINART, M.; REVEIZ, L.; PARDO, M.R.; TWEED, J.; MACAYA, A.; ALVAR, J. Designing and reporting clinical trials on treatments for cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.51, p.409-419, 2010.

GRECCO, S.S.; REIMÃO, J.Q.; TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; CUNHA, R.L.O.R.; ROMOFF, P.; FERREIRA, M.J.P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC (*Asteraceae*). **Experimental Parasitology**, v.130, p.141-145, 2012.

GRECCO, S.S.; REIMÃO, J.Q.; TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; ROMOFF, P.; FERREIRA, M.J.P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. Isolation of an antileishmanial and antitrypanosomal flavanone from the leaves of *Baccharis retusa* DC (*Asteraceae*). **Parasitology Research**, v.106, p.1245-1248, 2010.

GREEN, D.L.C.; KIDDLE, J.J.; THOMPSON, C.M. Stereochemistry of remote dianion addition to imines. Application to the synthesis of (1*S*, 8a*S*)-1-hydroxyindolizidine. **Tetrahedron**, v.51, p.2865–2874, 1995.

GRIENSVEN, J.V.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics North America**, v.26, p.309-322, 2012.

GUEDES, P.M.M.; GUTIERREZ, F.R.S.; NASCIMENTO, M.S.L.; MATTA, M.A.V.; SILVA, J.A. Antiparasitical chemotherapy in Chagas’ disease cardiomyopathy: current evidence. **Tropical Medicine and International Health**, v.17, p.1057-1065, 2012.

GUINÉZ, R.F.; MATOS, M.J,.; RODRIGUEZ, S.V.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; BORGES, F.; AZAR, C.O.; MAYA, J.D. Interest of antioxidant agents in parasitic disease. The case study of coumarins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.15, p.850-856, 2015.

GULLO, C.E.; ESTOFOLETE, C.F.; GIL, C.D.; CHRISTIANO, A.B.; GOMES, J. Digestive forms of Chagas disease and carcinogenesis: a study of association. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.39, p.146-150, 2012.

GUTIÉRREZ, V.; SEABRA, A.B.; REGUERA, R.M.; KHANDARE, J.; CALDERÓN, M. New approaches from nanomedicne for treating leishmaniasis. **Chemical Society Reviews**, v.45, p.152-168, 2016.

HABERLAND, A.; SARAVIA, S.G.M.; WALLUKAT, G.; ZIEBIG, R.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas diseases: from basics to laboratory medicine. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.51, p.271–294, 2013.

HARRIES, A.D.; LAWN, S.D.; SUTHAR, A.B.; GRANICH, R. Benefits of combined preventive therapy with co-trimoxazole and isoniazid in adults living with HIV: time to consider a fixed-dose, single tablet coformulation. **Lancet Infectious Diseases**, v.15, p.1492-1496, 2015.

HATFIELD, M.J.; WIERDL, M.; WADKINS, R.M.; POTTER, P.M. Modifications of human carboxylesterase for improved prodrug activation. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v.4, p.1153-1165, 2008.

HELMS, B.; MEIJER, E.W. The dendrimer effect in homogeneous catalysis. **Science**, v.313, p.1125-1148, 2006.

HEMMIGE, V.; TANOWITZ, H.; SETHI, A. *Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. **International Journal of Dermatology**, v.51, p.501-508, 2012.

HERNANDEZ, I.Q.; DUMONTEIL, E. Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. **Human Vaccines**, v.7, p.1184-1191, 2011.

HORVATH, A.; DEPRÉ, D.P.M.; ORMEROD, D.J. Processes and intermediates for preparing a macrocyclic protease inhibitor of HCV. WO Pat. 092955. 2011. 51p.

HOSAGANDI, B.D.; DAVE, R.H. An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids. **Tetrahedron Letters**, v.37, p.6375-6378, 1996.

HSIEH, P.W.; HUNG, C.F.; FANG, J.Y. Current prodrug design for drug discovery. **Current Pharmaceutical Design**, v.15, p.2236-2250, 2009.

HUANG, X.; LUO, X.; ROUPIOZ, Y.; KEILLOUR, J.W. Controlled regioselective anilide formation from aspartic and glutamic acid anhydrides. **The Journal of Organic Chemistry**, v.62, p.8821-8825, 1997.

HUTTUNEN, K. M.; RAUNI, H.; RAUTIO, J. Prodrugs-from serendipity to rational design. **Pharmacological Reviews**, v.63, p.750-771, 2011.

IHRE, H.; JESUS, O.L.P.; FRÉCHET, J.M.J. Fast and convenient divergent synthesis of aliphatic ester dendrimers by anhydride coupling. **Journal of American Chemical Society**, v.123, p.5908-5917, 2001.

IHRE, H.; HULT, A.; FRÉCHET, J.M.J.; GITSOV, I. Double-stage convergent approach for the synthesis of functionalized dendritic aliphatic polyesters based on 2,2-*bis*(hydroxymethyl)propionic acid. **Macromolecules**, v.31, p.4061-4068, 1998.

JAIN, K.; JAIN, N.K. Vaccines for visceral leishmaniasis: a review. **Journal of Immunological Methods**, v.422, p.1-12, 2015.

JAIN, K.; KESHARWANI, P.; GUPTA, U.; JAIN, N.K. Dendrimer toxicity: Let´s meet the challenge. **International Journal of Pharmaceutics**, v.394, p.122-142, 2010.

JANA, S.; MANDLEKAR, S.; MARATHE, P. Prodrug design to improve pharmacokinetic and drug delivery properties: challenges to the discovery scientists. **Current Medicinal Chemistry**, v.17, p.3874-3908, 2010.

JOHN, W.D.; YOUNG, G.T. Amino-acids and peptides. Pat XII. α- and β-L-aspartyl-L-valine. **Journal of the Chemical Society**, v.662, p.2870-2873, 1954.

JORNADA, D.H.; FERNANDES, G.F.S.; CHIBA, D.E.; MELO, T.R.F.; SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. The prodrug approach: a successful tool for improving drug solubility. **Molecules**, v.21, p.42-72, 2016.

KAMINSKAS, L.M.; BOYD, B.J.; PORTER, C.J.H. Dendrimer pharmacokinetics: the effect of size, structure and surface characteristics on ADME properties. **Nanomedicine**, v.6, n.6, p.1063-1084, 2011.

KAMINSKAS, L.M.; McLEOD, V.M.; PORTER, C.J.H.; BOYD, B.J. Association of chemotherapeutic drugs with dendrimer nanocarriers: an assessment of the merits of covalent conjugation compared to noncovalent encapsulation. **Molecular Pharmaceutics**, v.9, p.355-373, 2012.

KANNAN, R.M.; NANCE, E.; KANNAN, S.; TOMALIA, D.A. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications. **Journal of Internal Medicine**, v.276, p.579-617, 2014.

KARAMAN, R. Prodrugs design based on inter-and intramolecular chemical processes. **Chemical Biology & Drug Design**, v.82, p.643-668, 2013.

KAUR, M.; GARG, T.; RATH, G.; GOYAL, A.K. Current nanotechnological strategies for effective delivery of bioactive drug molecules in the treatment of tuberculosis. **Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.31, p.49-88, 2014.

KERSHARWANI, P.; GAJBHIYE, V.; TEKADE, R.K.; JAIN, N.K. Evaluation of dendrimer safety and efficacy through cell line studies. **Current Drug Targets**, v.12, p.1478-1497, 2011.

KLAJNERT, B.; BRYSZEWSKA, M. Dendrimers: properties and applications. **Acta Biochimica Polonica**, v 48, p.199-208, 2001.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVÁ, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.1443-1474, 2012.

KOROLKOVAS, A. **Essentials of medicinal chemistry.** New York: Wiley-Interscience, 2ed. 1988. 1204p.

LACKOVIC, K.; PARISOT, J.O.; SLEEBS, N.; BAELL, J.B.; DEBIEN, L.; WATSON, K.G.; CURTIS, J.M.; HANDMAN, E.; STREET, I.P.; KEDZIERSKI, L. Inhibitors of *Leishmania* GDP-mannose pyrophosphorylase identified by high-throughput screening of small-molecule chemical library. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.1712-1719, 2010.

LAGE, P.S.; FUMAGALLI, M.A.C.; MESQUISTA, J.T.; MATA, L.M.; FERNANDES, S.O.A.; CARDOSO, V.N.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; LEITE, J.P.V.; TEMPONE, A.G.; COELHO, E.A.F. Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v.114, p.4625-4635, 2015.

LEIRO, V.; GARCIA, J.P.; TOMAS, H.; PÊGO, A.P. The present and the future of degradable dendrimers and derivatives in theranostics. **Bioconjugate Chemistry**, v.26, p.1182-1197, 2015.

LENNOX, H. A.; KARCZ, D. A.; TALES, H.; MASRI, M. E. Chagas´ disease: clinical overview and implications for nursing. **Medsurg Nursing**, v.16, p.229-235, 2007.

LESCURE, F.X.; LOUP, G.; FREILIJ, H.; DEVELOUX, M.; PARIS, L.; BRUTUS, L.; PIALOUX, G. Chagas disease: changes in knowledge and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v.10, p.556-570, 2010.

LIM, J.; SIMANEK, E.E. Triazine dendrimers as drug delivery systems: from synthesis to therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.826-835, 2012

LINDOSO, J.A.L.; LINDOSO, A.A.B.P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.51, p.247-253, 2009.

LINETZKY, B.; KONFINO, J.; CASTELLANA, N.; MAIO, F.; BAHIT, M.C.; ORLANDINI, A.; DIAZ, R. Risk of cardiovascular events associated with positive serology for Chagas: asystematic review. **International Journal of Epidemiology**, v.41, p.1356-1366, 2012.

LIU, M.; FRÉCHET, J.M.J. Designing dendrimers for drug delivery. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v.2, p.393-401, 1999.

LIU, Y.; TEE, J.K.; CHIU, G.N.C. Dendrimers in oral drug delivery application: current explorations, toxicity, issues and strategies for improvement. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, p.2629-2642, 2015.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonóides. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.3, p.18-22, 2000.

LUO, J.S.; SUN, B.; HE, Z. Prodrug-based nanoparticulate drug delivery strategies for cancer therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.35, p.556-566, 2014.

MACHADO, C.M.; MARTINS, T.C.; COLTURATO, I.; LEITE, M.S.; SIMIONE, A.J.; SOUZA, M.P.; MAUAD, M.A.; COLTURATO, V.R. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of Brazilian HSCT center. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.51, p.309-324, 2009.

MACHADO, F.S.; DUTRA, W.O.; ESPER, L.; GOLLOB, K.J.; TEIXEIRA, M.M.; FACTOR, S.M.; WEISS, L.M.; NAGAJYOTHI, F.; TANOWITZ, H.B.; GARG, N.J. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in Immunopathology**, v.34, p.753-770, 2012.

MAHATO, R.; TAI, W.; CHENG, K. Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, p.659-670, 2011.

MAKANJUOLA, T.; TADDESE, H.B.; BOOTH, AN. Factors associated with adherence to treatment with isoniazid for the prevention of tuberculosis amongst people living with HIV/AIDS: a systematic review of qualitative data. **PLoS One**, v.9, p.e87166-e87179, 2014.

MALIK, L.H.; SINGH, G.D.; AMSTERDAM, E.A. Chagas heart disease: an update. **The American Journal of Medicine**, v.128, p.1251e7-1251e9, 2015.

MALTEZOU, H.C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, p.1-8, 2010.

MANTELL, S.J. Amino acid derivatives. US Pat. 057767, 2007.

MARÍN, C.; MACÍAS, I.R.; CÉSPEDES, A.L.; OLMO, F.; VILLEGAS, N.; DÍAZ, J.G.; ROSALES, M.J.; SÁNCHEZ, R.G.; MORENO, M.S. In vitro and in vivo trypanocidal activity of flavonoids from *Delphinium staphisagria* against Chagas disease. **Journal of Natural Products**, v.74, p.744-750, 2011.

MARKELL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTOSKI, W. A. **Parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.136–149, 2003.

MARZOCHI, M.C.A.; FAGUNDES, A.; ANDRADE, M.V.; SOUZA, M.B.; MADEIRA, M.F.; CONFORT, E.M.; SCHUBACH, A.O.; MARZOCHI, K.B.F. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.570-580, 2009.

MAURER, M.; DONDJI, B.; STEBUT, E.V. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v.198, p.137-146, 2009.

MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.1–16, 2006.

MAZZAFERRO, S. BOUCHEMAL, K.; PONCHEL, G. Oral delivery of anticancer drugs II: the prodrug strategy. **Drug Discovery Today**, v.18, p.93-98, 2013.

McNERNY, D. Q.; MULLEN, D. G.; MAJOROS, I. J.; HOLL, M. M. B.; BAKER, J.R.. Dendrimer synthesis and funcionalization by click chemistry for biomedical applications. In: LAHANN, J. **Click Chemistry for biotechnology and materials science.** New Jersey: John Wiley & Sons. 2009. p.177-193.

McNERNY, D.Q.; LEROEIL, P.R.; BAKER, J.R. Understanding specific and nonspecific toxicities: a requirement for the development of dendrimer-based pharmaceuticals. **Advanced Reviews**, v.2, p.249-259, 2010.

MEDINA, S.H.; SAYED, M.E.H. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. **Chemical Reviews**, v.109, p.3141-3157, 2009.

MELLO, T.F.P.; BITENCOURT, H.R.; PEDROSO, R.B.; ARISTIDES, S.M.A.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania* (*viannia*) *braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v.136, p.27-34, 2014.

MELO, E.C.; FORTALEZA, C.M.C.B. Challenges in the therapy of visceral leishmaniasis in Brazil: a public health perspective. **Journal of Tropical Medicine**, v.2013, p.1-5, 2013.

MÉNDEZ, A.R.; ALDASORO, E.; LAZZARI, E.; SICURI, E.; CROWN, M.; MOORE, D.A.; GASCON, J.; MUÑOZ, J. American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected tropical Diseases**, v.9, p.1-5, 2015.

MENG, Z.; LV, Q.; LU, J.; YAO, H.; LV, X.; JIANG, F.; LU, A.; ZHANG, G. Prodrug strategies for paclitaxel. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.796-819, 2016.

MESSENGER, L.A.; MILES, M.A.; BERN, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.13, p.995-1029, 2015.

MIGNANI, S,; KAZZOULI, S.E.; BOUSMINA, M.; MAJORAL, J.P. Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: a concise overview. **Advanced Drug Delivery**, v.65, p.1316-1330, 2013.

MOLINA, J.A.P. Management of *Trypanosoma cruzi* coinfection in HIV-positive individuals outside endemic areas. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.27, p.9-15, 2014.

MONAGLE, J.J. Carbodiimides. III. Conversion of isocyanates to carbodiimides. Catalyst studies. **Journal of Organic Chemistry**, v.27, p.3851-3855, 1962.

MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A.; VELOSO, D. P. Sistemas transportadores de drogas. **Química Nova**, v.21, p.470–476, 1998.

MOREL, C. M.; LAZDINS, J. **Chagas disease.** Nature Reviews Microbiology. London: Nature Publishing Group, 2003. p.14-15.

MORELLO, A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.90, p.1-12, 1988.

MORILLA, M.J.; ROMERO, E.L. Nanomedicine against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, v.10, p.465-481, 2015.

MÜLLER, C.E. Prodrug approaches for enhancing the bioavailability of drugs with low solubility. **Chemistry & Biodiversity**, v.6, p.2071-2083, 2009.

MURA, C.; VALENTI, D.; FLORIS, C.; SANNA, R.; DE LUCCA, M.A.; FADDA, A.M.; LOY, G. Metronidazole prodrugs: synthesis, physicochemical properties, stability and ex vivo release studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p.4142-4150, 2011.

MURA, S.; BUI, D.T.; COUVREUR, P.; NICOLAS, J. Lipid prodrug nanocarriers in cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 208, p.25-41, 2015.

MURRAY, H.W. Review: Leishmaniasis in the United States: treatment in 2012. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, v.86, n.3, p.434-440, 2012.

MUZITANO, M.F.; TINOCO, L.W.; GUETTE, C.; KAISER, C.R.; BERGMANN, B.R.; COSTA, S.S. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry**, v.67, p.2071-2077, 2006.

NAGAJYOTHI, F.; MACHADO, F.S.; BURLEIGH, B.A.; JELICKS, L.A.; SCHERER, P.E.; MUKHERJEE, S.; LISANTI, M.P.; WEISS, L.M.; GARG, N.J.; TANOWITZ, H.B. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, v.14, p.634-643, 2012.

NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; ATTWOOD, D.; D'EMANUELE, A. Synthesis and assessment of first-generation polyamidoamine dendrimer prodrugs to enhance the cellular permeability of P-gp substrates. **Bioconjugate Chemistry**, v.18, p.937-946, 2007.

NANJWADE, B.K.; BECHRA, H.M.; DERKAR, G.K.; MANVI, F.V.; NANJWADE, V.K. Dendrimers: emerging polymers for drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.38, p.185-196, 2009.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v.17, p.522-524, 1978.

NICOLAS, J. Drug-initiated synthesis of polymer prodrugs: combining simplicity and efficacy in drug delivery. **Chemistry of Materials**, v. 28, p.1591-1606, 2016.

NOURBAKHSH, B.; STÜVE, O. Isoniazid in autoimmunity: a trigger for multiple sclerosis? **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v.7, p.253-256, 2014.

NUNES, M.C.P.; DONES, W.; MORILLO, C.A.; ENCINA, J.J.; RIBEIRO, A.L. Chagas diseases: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v.62, p.767-776, 2013.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.94, p.489-493, 2016.

OSORIO, L.; RÍOS, I.; GUTIERREZ, B.; GONZÁLEZ, J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? **Microbes and Infection**, v.14, p.1390-1402, 2012.

PAHO (ORGANIZACIÓN PANAMERICAN A DE LA SALUD). Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=3591&Itemid=3921&lang=es>. Acesso em: 22/08/2016 às 14h.

PAILA, Y.D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, A. Amphotericin B inhibits entry of Leishmania donovani into primary macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.399, p.429-433, 2010.

PALUMBO, E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.2-4, 2008.

PARAT, A.; BORDEIANU, C.; DIB, H.; GAROFALO, A.; WALTER, A.; COLIN, S.B.; FLESCH, D.F. Dendrimer-nanoparticle conjugates in nanomedicine. **Nanomedicine (London)**, v.10, p.977-992, 2015.

PATIL, S.J.; SHIROTE, P.J. Prodrug approach: an effective solution to overcome side-effects. **International Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences**, v.1, p.1-13, 2011.

PEREZ, C.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? **Trends in Parasiytology**, v.30, p.176-182, 2014.

PEREZ, C.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. Reactivation of Chagas disease: implications for global health. **Trends in Parasiytology**, v.31, p.595-603, 2015.

PIETRO, A.D.; CONSEIL, G.; VICTORIA, J.M.P.; DAYAN, G.; CORTAY, H.B.; TROMPIER, D.; STEINFELS, E.; JAULT, J.M.; WET, H.; MAITREJEAN, M.; COMTE, G.; BOUMENDJEL, A.; MARIOTTE, A.M.; DUMONTET, C.; McINTOSH, D.B.; GOFFEAU, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BARRON, D. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.59, p.307-322, 2002.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p.447-451, 2001.

PINAZO, M.J.; ESPINOSA, G.; LLETGET, C.C.; POSADA, E.J.; ALDASORO, E.; OLIVEIRA, I.; MUÑHOZ, J.; GÁLLEGO, M.; GASCON, J. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, p.e1965-e1974, 2013.

PORCHEDDU, A.; GIACOMELLI, G.; DE LUCA, L. New pentamidine analogues in medicinal chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.5819-5836, 2012.

QUADIR, M.A.; HAAG, R. Biofunctional nanosystems based on dendritic polymers. **Journal of Controlled Release**, v.161, p.484-495, 2012.

RASSI-JÚNIOR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J.M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics North America**, v.26, p.275-291, 2012.

RAUTIO, J.; KUMPULAINEN, H.; HEIMBACH, T.; OLIYAI, R.; OH, D.; JÄRVINEN, T.; SAVOLAINEN, J. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.7, p.255-270, 2008.

READY, P.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v.6, p.147-154, 2014.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, p.581-596, 2007.

REVZAN, H.; MOAFI, M. An overview on *Leishmania* vaccines: a narrative review article. **Veterinary Research Forum**, v.6, p.1-7, 2015.

REYMOND, J.L.; DARBRE, T. Peptide and glycopeptides dendrimers apple trees as enzyme models and for biomedical applications. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.10, p.1483-1492, 2012.

RODRIGUES, I.A.; MAZOTTO, A.M.; CARDOSO, V.; ALVES, R.L.; AMARAL, A.C.F.; SILVA, J.R.A.; PINHEIRO, A.S.; VERMELHO, A.B. Natural products: insights into leishmaniasis inflammatory response. **Mediators of Inflammation**, v.2015, p.1-12, 2015.

ROMERO, E.L.; MORILLA, M.J. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. **Expert Opinion Drug Delivery**, v.5, p.805-823, 2008.

ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, N. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, p.584-601, 2010.

SALEM, M.M.; WERBOVETZ, K.A. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, p.2571-2598, 2006.

SALOMON, C.J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, p.888-894, 2012.

SÁNCHEZ, L.V.; RAMÍREZ, J.D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. **Parasitology**, v.140, p.147-159, 2013.

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.R.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; REAL, S.C.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v.103, p.1-10, 2008.

SANTOS, S.S. **Leishmanicidas potenciais:** estudo da síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração com hidroximetilnitrofural. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. 200p [Dissertação de Mestrado].

SANTOS, S.S.; FERREIRA, E.I.; GIAROLLA, J. Dendrimer prodrugs. **Molecules**, v.21, p.686-708, 2016.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.9, p.588-596, 2015.

SCHCHARBIN, D.; JANASZEWSKA, A.; MACULEWICZ, B.K.; ZIEMBA, B.; DZMITRUK, V.; HALETS, I.; LOZNIKOVA, S.; SCHCHARBINA, N.; MILOWSKA, K.; IONOV, M.; SHAKHBAZAU, A.; BRYSZEWSKA, M. How to study dendrimers and dendriplexes III. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity in vivo. **Journal of Controlled Release**, v.181, p.40-52, 2014.

SCHIMDT, M.; GEILENKEUSER, W.J.; SIREIS, W.; SEIFRIED, E.; HOURFAR, K. Emerging pathogens – how safe is blood? **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v.41, p.10-17, 2014.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M.E.; CARVALHO, E.M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.21, p.483-488, 2008.

SEBESTIK, J.; NIEDERHAFNER, P.; JEZEK. J. Peptide and glycopeptides dendrimers and analogous dendrimeric structures and their biomedical applications. **Amino Acids**, v.40, p.301-370, 2011.

SEN, G.; MANDAL, S.; ROY, S.S.; MUKHOPADHYAY, S.; BISWAS, T. Therapeutic use of quercetin in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis. **Free Radical Biology & Medicines**, v.38, p.1257-1264, 2005.

SEN, G.; MUKHOPADHYAY, S.; RAY, M.; BISWAS, T. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exertrol leishmanicidal activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, p.1066-1075, 2008.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. **Phytomedicine**, v.18, p.1056-1069, 2011.

SERVICE, M. W.; ASHFORD, R. W.; CALISHER, C. H.; ELDRIDGE, B. F.; JONES, T. W. WYATT G. **The encyclopedia of Arthropod transmitted infections.** Cambridge: C.A.B. I. 2006. p.269–279.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v.45, p.255-272, 2008.

SHIROZU, K.; HIRAI, S.; TANAKA, T.; HISAKA, S.; KANENI, M.; ICHINOSE, F. Farnesyltransferase inhibitor, tipifarnib, prevents galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure. **Shock**, v.42, p.570-577, 2014.

SHIVAHARE, R.; KORTHIKUNTA, V.; CHANDASANA, H.; SUTHAR, M.K.; AGNIHOTRI, P.; VISHWAKARMA, P.; CHAITANYA, T.K.; KANCHARLA, P.; KHALIQ, T.; GUPTA, S.; BHATTA, R.S.; PRATAP, J.V.; SAXENA, J.K.; GUPTA, S. TADIGOPPULA, N. Synthesis, structure-activity relationship and biological studies of chromenochalcones as potential antileishmanial agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.57, p.3342-3357, 2014.

SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GUIDO, R. V. C.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. Advances in prodrug design. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry,** v. 5, p. 893-914, 2005.

SILVA, E.R.; MAQUIAVELI, C.C.; MAGALHÃES, P.P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania amazonensis* arginase. **Experimental Parasitology**, v.130, p.183-188, 2012.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v.30, p.3834-3842, 2012.

SINGH, G.; SHARMA, P.D. Mutual prodrugs – a recent trend in prodrug design. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**, v.56, p.69-79, 1994.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B.; Ácidos carboxílicos e seus derivados. Adição nucleofílica – eliminação no carbono acílico. In:____(Ed.). **Química Orgânica**. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. p.110-112.

SOUZA, A.S.; GIUDICE, A.; PEREIRA, J.M.B.; GUIMARÃES, L.H.; JESUS, A.R.; MOURA, T.R.; WILSON, M.E.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. Resistance of *Leishmania* (*viannia*) *braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-α production. **BMC Infectious Diseases**, v.209, p.1-11, 2010.

SRIVASTAVA, S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J.; SINGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v.9, p.277-292, 2016.

SRIVIDYA, G.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitology Research**, v.110, p.1065-1078, 2012.

STANAWAY, J.D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease. Estimates and challenges. **Global Heart**, v.10, p.139-144, 2015.

STELLA, V.J.; NTI-ADDAE, K.W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.677-694, 2007.

SUCRE, A. P.; CAMPOS, Y.; VÁSQUEZ, J.; MOLL, H.; LEÓN, A. M. Sensitivity os *Leishmania* spp. to glibenclamide and 4-Aminopiridine: a tool for the study of drug resistance development. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.601–606, 1997.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; SINGH, O. Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness. **Journal of Tropical Medicine**, v.2014, p.1-7, 2014.

SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, p.445-462, 2009.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structureactivity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.1352-1364, 2006.

TASHIMA, T. Intriguing possibilities and beneficial aspects of transporter-conscious drug design. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.23, p.4119-4131, 2015.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos.** São Paulo: Atheneu, 2001. 992p.

TEMPONE, A.G.; MORTARA, R.A.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; REIMÃO, J.Q. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.36, p.159-163, 2010.

TEMPONE, A.G.; PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A.L.; MORTARA, R.A.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.A. Targeting *Leishmania* (L.) *chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.60-68, 2004.

TESTA, B. Prodrug research: futile or fertile? **Biochemical Pharmacology**, v.68, p.2097-2106, 2004.

TESTA, B.; CALDWELL, J. Prodrugs revisited: the “ah doc” approach as a complement to ligand design. **Medicinal Research Reviews**, v.16, p.233-241, 1996.

TESTA, B.; KRÄMER, S.D. The biochemistry of drug metabolism – An introduction. **Chemistry and Biodiversity**, v.6, p.591-684, 2009.

TIUMAN, T.S.; SANTOS, A.O.; NAKAMURA, T.U.; FILHO DIAS, B.P.; NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v.15, p.525-532, 2011.

TOMALIA, D.A.; BAKER, H.; DEWALD, J.; HALL, M.; KALLOS, G.; MARTIN, S.; ROECK, J.; RYDER, J.; SMITH, P. A new class of polymers: starbust dendritic macromolecules. **Polymer Journal**, v.17, p.117-132, 1985.

TRACY, J.W.; WEBSTER, L. I. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P**.** (Eds) **Goodman & Gilman:** As bases farmacológicas da terapêutica*.* 10 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2003. p.825, 826, 831-838.

UENO, N.; BRATT, C.L.; RODRIGUEZ, N.E.; WILSON, M.E. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum chagasi* promastigotes. **Cellular Microbiology**, v.11, p.1827-1841, 2009.

URBINA, J.A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.62, p.149-156, 2015.

VARGAS, F. **Síntese e aplicação de β-calcogeno amidas quirais em alquilações alílicas assimétricas**. Universidade de Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007, 188p [Tese de Doutorado].

VERMA, A.; VERMA, B.; PRAJAPATI, S.K.; TRIPATHI, K. Prodrug as a chemical delivery system: a review. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v.2, p.100-103, 2009.

WANG, H.; HUANG, Q.; CHANG, H.; XIAO, J.; CHENG, Y. Stimuli-responsive dendrimers in drug delivery, **Biomaterials Science**, v.4, p.375-390, 2016.

WANG, Y.; QUÉLÉVER, G.; PENG, L. The seemingly trivial yet challenging synthesis of poly(aminoester) dendrimers. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.5011-5028, 2012.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: JOLLE, G., WOOLDRIGE, K.R.M. (Eds.) **Drug design: fact or fantasy?** London: Academic Press, 1984. p.47-72.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2014. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/>. Acesso em: 20/08/2014 às 11h.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acesso em: 22/08/2016 às 10ha.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 22/08/2016 às 12hb.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2016. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html>. Acesso em: 22/08/2016 às 13hc.

WIJAGKANALAN, W.; KAWAKAMI, S.; HASHIDA, M. Designing dendrimers for drug delivery and imaging: pharmacokinetic considerations. **Pharmaceutical Research**, v.28, p.1500-1519, 2011.

WU, L.P.; FICKER, M.; CHRISTENSEN, J.B.; TROHOPOULOS, P.N.; MOGHIMI, S.M. Dendrimers in medicine: therapeutic concepts and pharmaceutical challenges. **Bioconjugate Chemistry**, v.26, p.1198-121, 2015.

YANG, H.; KAO, W. J. Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications.**Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v.17, p.3-19, 2006.

YAVUZ, B.; PEHLIVAN, S.B.; ÜNLÜ, N. Dendrimeric systems and their applications in ocular drug delivery. **The Scientific World Journal**, v.2013, p.1-13, 2013.

YEOH, K.K.; CHAN, M.C.; THALHAMMER, A.; DEMETRIADES, M.; CHOWDHURY, R.; TIAN, Y.M.; STOLZE, I. McNEIL, L.A.; LEE, M.K.; WOON, E.C.Y.; MACKEEN, M.M.; KAWAMURA, A.; RATCLIFFE, P.J.; MECINOVIC, J.; SCHOFIELD, C.J. Dual-action inhibitors of HIF prolyl hydroxylases that induce binding of a second iron ion. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.11, p.689-860, 2013.

YONEYAMA, K.A.G.; TANAKA, A.K.; SILVEIRA, T.G.V.; TAKAHASHI, H.K.; STRAUS, A.H. Characterization of *Leishmania* (*viannia*) *braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. **Journal of Lipid Research**, v.47, p.2171-2178, 2006.

YAN, L.; JIA, G.K.; ZHANG, M.; YUAN, Y. Crystal structure of 3-ethyl-1,5-dioxaspiro[5,5]undecane-3-carboxylic acid, $C_{12}H_{20}O_4$. **Zeitschrift für Kristallographie – New Crystal Structures**, v.229, p.197-198, 2014.

YUEN, C.M.; JENKINS, H.E.; RODRIGUEZ, C.A.; KESHAVJEE, S. BECERRA, M.C. Global and regional burden of isoniazid-resistant tuberculosis. **Pediatrics**, v.136, p.e50-e59, 2015.

ZARO, J.L. Lipid-based carriers for prodrugs to enhance delivery. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v.17, p.83-92, 2015.

ZAWILSKA, J.B.; WOJCIESZAK, J.; OLEJNICZAK, A.B. Prodrugs: a challenge for the drug development. **Pharmacological Reports**, v.65, p.1-14, 2013.

ZHOU, P.; SUN, X.; ZHANG, Z. Kidney-targeted drug delivery systems. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v.40, p.37-42, 2014.

Anexo I

Instruções para os membros de bancas julgadoras de doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo II

Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 6754829/2 - Soraya da Silva Santos

Email:	soraya.ssantos@usp.br
Data de Nascimento:	23/01/1986
Cédula de Identidade:	RG - 43.634.908-5 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Católica de Santos - São Paulo - Brasil - 2009
Mestrado:	Mestra em Ciências - Área: Insumos Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

Curso:	Doutorado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula:	15/10/2012
Início da Contagem de Prazo:	15/10/2012
Data Limite para o Depósito:	17/10/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 15/10/2012 até o presente. Email: hajudan@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 15/10/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 10/10/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 15/10/2012

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2016
Impresso em: 25/08/2016 11:27:38

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 6754829/2 - Soraya da Silva Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5794-2/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	06/03/2013	14/05/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5779-2/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	16/08/2013	17/10/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5786-3/1	Metodologias e Modelagem Molecular no Planejamento de Fármacos	17/09/2013	18/11/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5754-1/1	Atualização em Ciências Farmacêuticas	21/10/2013	27/10/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5708-5/2	Relação entre Estrutura Química e Atividade Biológica	21/02/2014	15/05/2014	120	8	100	A	N	Concluída
QFL5963-1/1	Dendrímeros como Nanocarreadores para “drug delivery” celular: Síntese, Caracterização e sua Interação com Interfaces Biológicas (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	08/12/2014	14/12/2014	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	26
Estágios:			
Total:	0	20	26

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2016
Impresso em: 25/08/2016 11:27:38

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 6754829/2 - Soraya da Silva Santos

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
43287	Elizabeth Igne Ferreira	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2016
Impresso em: 25/08/2016 11:27:38

Anexo III

Currículo Lattes

Currículo Lattes

Imprimir currículo

Soraya da Silva Santos

Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/8477112493124911

Última atualização do currículo em 25/08/2016

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Católica de Santos, mestrado em Fármacos e medicamentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Atualmente é doutoranda em Fármacos e Medicamentos pela FCF-USP atuando nos seguintes temas: dendrímeros, antichagásicos, leishmanicidas, latenciação e síntese de fármacos. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Química Farmacêutica, Dendrímeros, Latenciação, Planejamento e síntese de Fármacos, Doenças Negligenciadas, Análise e Controle de Medicamentos, Farmacotécnica e Farmácia Hospitalar.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Soraya da Silva Santos

Filiação Alencastro Oliveira Santos e Maria Aparecida da Silva Santos

Nascimento 23/01/1986 - São Vicente/SP - Brasil

Carteira de Identidade 436349085 SSP - SP - 01/07/1999

CPF 228.178.058-95

Formação acadêmica/titulação

2012 Doutorado em Ciências Farmacêuticas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
com **período sanduíche** em Tulane University (Orientador : Scott M. Grayson)
Título: ANTICHAGÁSICOS E LEISHMANICIDAS POTENCIAIS: SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS DE 3-HIDROXIFLAVONA
Orientador: Elizabeth Igne Ferreira
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2010 - 2012 Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Leishmanicidas potenciais:estudo da síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração com hidroximetilnitrofural, Ano de obtenção: 2012
Orientador: Elizabeth Igne Ferreira
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2009 - 2010 Especialização em Farmácia Hospitalar - Introdução Farmácia Clínica.
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, HC-FMUSP, Brasil
Título: Análise do processo de unitarização automatizado de medicamentos sólidos de um hospital público terciário de grande porte.
Orientador: Cleuber Esteves Chaves e Lidiane Baltieri Gomes
Bolsista do(a): Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Administrativo

2009 - 2010 Especialização em Lato sensu em química.
Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Sao Paulo, Brasil
Título: Desenvolvimento de fármaco diurético: potencial anti-hipopotassêmico
Orientador: Patricia Busko Di Vitta

2004 - 2008 Graduação em farmácia.
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Santos, Brasil
Título: Proposta de desenvolvimento de um novo fármaco análogo da indometacina com doador de óxido nítrico
Orientador: Prof. Dr. Antônio José Calixto de Souza
Bolsista do(a): PROGRAMA UNIVERSIDADE PARA TODOS

Formação complementar

2014 - 2014 Curso de curta duração em Nuevas metodologías em síntesis orgánica y sus apl. (Carga horária: 7h).
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

2014 - 2014 Curso de curta duração em Introdução à Química Medicinal. (Carga horária: 10h).
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

2014 - 2014 Curso de curta duração em Highlights in Medicinal Chemistry. (Carga horária: 7h).
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em História da descoberta dos fármacos. (Carga horária: 6h).
Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Sao Paulo, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Structure-based virtual ligand screening. (Carga horária: 10h).
Universidade Federal do ABC, UFABC, Santo Andre, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Solvation continuum models. (Carga horária: 10h).
Universidade Federal do ABC, UFABC, Santo Andre, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Dinâmica molecular básica. (Carga horária: 6h).
Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Petropolis, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Predição de estruturas de proteínas. (Carga horária: 6h).
Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Petropolis, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Análise instrumental. (Carga horária: 8h).
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Santos, Brasil

2008 - 2008

Curso de curta duração em Armazenamento, embalagem e estabilidade fármacos.
Anfarmag, SINAMM, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Documentos e registros da qualidade (elaboração).
Anfarmag, SINAMM, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Princípios básicos de atendimento a clientes e a.
SENAC, SENAC, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em RDC 214 e Programa 5S.
Anfarmag, SINAMM, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Noções de administração e introdução à farmacolo.
SENAC, SENAC, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em PDCA – Planejamento.
Anfarmag, SINAMM, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Gestão da qualidade e RDC-214.
Anfarmag, SINAMM, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Curso de fitoterapia.
Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa, HERBARIUM, Colombo, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Auto-inspeção na indústria.
Conselho Regional de Farmácia do Estado de São paulo, CRF-SP, Sao Paulo, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Anemias: aspecto clínicos e laboratoriais.
Roche Diagnostics Brasil, ROCHE, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Técnicas e prática para aplicação de injeção.
Sindicato dos práticos de farmácia, SINPRAFRAMAS, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Atualização em dermocosmética.
La Roche Posay, LA ROCHE POSAY, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Bases dermatológicas.
Farmácia Homeofórmula, HOMEOFÓRMULA, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Energia nuclear – Aplicações médicas e rejeitos ra.
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Santos, Brasil

Atuação profissional

1. Tulane University - TULANE

Vínculo institucional

2015 - 2015 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutoranda , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Desenvolvimento do projeto: "Potential antichagasic and leishmanicide compounds: Synthesis and characterization by MALDI-ToF MS of 3-hydroxyflavone dendrimer prodrugs". Durante o meu período de estágio sanduíche na Tulane University orientei o aluno de Iniciação Científica: Jorge Luis Alves, projeto: "Synthesis of first generation Bis-MPA dendrimer containing diaminopropane as the core".

2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estágio no Programa PAE , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio em docência na disciplina de Química Farmacêutica sob a orientação da profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel-Yagui.

2012 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutoranda , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2010 - 2012 Vínculo: Pós-graduando (Mestrado) , Enquadramento funcional: Aluna / Pesquisadora , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2010 - 2010 Vínculo: Estágio no PAE , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
PAE (Programa de Aperfeiçoamento do Ensino)

3. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HC-FMUSP

Vínculo institucional

2009 - 2010 Vínculo: Especialização e Aprimoramento , Enquadramento funcional: Farmacêutica especializanda , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

4. Hemonúcleo de Santos - Hospital Guilherme Álvaro - HEMONÚCLEO

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 60, Regime: Integral

5. Centro de Referência em DST/Aids - SECRAIDS

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estagiária serviço ambulatorial , Carga horária: 44, Regime: Integral

6. Universidade Católica de Santos - UNISANTOS

Vínculo institucional

2006 - 2007 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Monitora de Química Farmacêutica I e II , Carga horária: 12, Regime: Parcial

7. Ao Pharmacêutico - AO PHARMACÊUTICO

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estagiária em laboratório de homeopatia , Carga horária: 44, Regime: Integral

2006 - 2006 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estagiária em laboratório de manipulação , Carga horária: 44, Regime: Integral

2003 - 2009 Vínculo: Empregatício , Enquadramento funcional: Farmacêutica Trainee , Carga horária: 44, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Co-responsável pelo setor de produção; Controle de produção e produtividade; Planejamento e desenvolvimento de atividades de melhoria contínua para os setores de produção; Realização de treinamentos; Organização de laboratório e de documentos do sistema de qualidade; Triagem inicial de receitas; Inspeção final de medicamentos acabados; Recebimento e inspeção final de produtos e matérias-primas; Fracionamento e dispensação de medicamentos

Projetos

Projetos de pesquisa

2012 - Atual ANTICHAGÁSICOS E LEISHMANICIDAS POTENCIAIS: SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS DE 3-HIDROXIFLAVONA

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Doutorado (1);
Integrantes: Soraya da Silva Santos; Elizabeth Igne Ferreira (Responsável)

Revisor de periódico

1. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening

Vínculo

2013 - Atual Regime: Parcial

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2011 Menção Honrosa com o trabalho: "Molecular modeling as a tool to study target dendrimer potentially leishmanicide, Seminário Internacional de Nanotecnologia

2009 Impositora de grau da XVII Turma de Formandos de Farmácia da Universidade Católica de Santos, título concedido ao melhor aluno da turma, em 06 de janeiro de 2009, UNISANTOS

2008 Bolsa Mérito - Elaborada pela Universidade para premiar o melhor aluno da turma (dois últimos anos) em todos os períodos letivos da concessão - 1º semestre 2008, Universidade Católica de Santos

Producão

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. doi **DA SILVA SANTOS, SORAYA**; IGNE FERREIRA, ELIZABETH; GIAROLLA, JEANINE
Dendrimer Prodrugs. Molecules (Basel. Online). JCR, v.21, p.686 - , 2016.

2. doi **DA SILVA SANTOS, SORAYA**; GIAROLLA, JEANINE; PASQUALOTO, KERLY F.M.; FERREIRA, ELIZABETH I.
In silico study to analyse the disassembly of quercetin-targeted dendrimers potentially leishmanicide.
Molecular Simulation (Print). JCR, v.41, p.1495 - 1508, 2015.

3. doi **DA SILVA SANTOS, SORAYA**; GIAROLLA, JEANINE; PASQUALOTO, KERLY F.M.; FERREIRA, ELIZABETH I.
Molecular modelling as a tool for studying the disassembly of potentially leishmanicide-targeted dendrimer.
Molecular Simulation (Print). JCR, v.xxx, p.1 - 9, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **SANTOS, S. S.**; ALVES, J. L.; FERREIRA, E.I.; GRAYSON, S. M.
Synthesis of first generation Bis-MPA dendrimer containing diaminopropane as the core In: 5th International Symposium on Biomedical Applications of Dendrimers, 2016, Copenhagen, Dinamarca.
5th International Symposium on Biomedical Applications of Dendrimers. , 2016.

2. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Conformational profile evaluation of 3-hydroxyflavone dendrimeric prodrugs potentially antichagasic and leishmanicide In: IV Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases, 2015, São Paulo.
IV Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases,. , 2015.

3. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Conformational profile evaluation of 3-hydroxyflavone dendrimeric prodrugs potentially antichagasic and leishmanicide In: XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry, 2014, Lisboa, Portugal.
XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry. , 2014.

4. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Estudo de dinâmica molecular para avaliação conformacional de pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona, potencialmente antichagásicos e leishmanicidas. In: 37ª Reunião Anual da Sociedade

Brasileira de Química, 2014, Natal.
37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2014.

5. POLIDORO, A.; **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, JEANINE; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Computational release study of potential cardiovascular dendrimer prodrugs containing aspirin and rosuvastatin. In: 8th International Dendrimer Symposium, 2013, Madri.
8th International Dendrimer Symposium. , 2013.

6. GIAROLLA, J.; **SANTOS, S. S.**; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular properties evaluation of a second generation dendrimers potentially antichagasic and leishmanicide In: XLVIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2013, São Paulo.
XLVIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. , 2013.

7. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, JEANINE; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular properties evaluation of a second generation dendrimers potentially antichagasic and leishmanicide. In: XLVIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2013
XLVIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. , 2013.

8. POLIDORO, A.; **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Estudo in silico de liberação de fármacos dendriméricos dirigidos de primeira geração de 3-hidroxiflavona In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia.
35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2012.

9. POLIDORO, A.; **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
In silico release study of first generation targeted dendrimers with 3-hydroxyflavone In: XLVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2012, São Paulo.
XLVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. , 2012.

10. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Modelagem molecular na liberação de fármacos dendriméricos dirigidos de quercetina de primeira geração In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.
34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2011.

11. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular modeling applied to the first generation of quercetin targeted dendrimer as drug delivery system In: II International Symposium on Drug Discovery, 2011, Araraquara.
II International Symposium on Drug Discovery. , 2011.

12. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular modeling applied to the first generation of quercetin targeted dendrimer as drug delivery system In: XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2011, São Paulo.
XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. , 2011.

13. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular modeling as a tool for studying a potentially leishmanicide targeted dendrimer In: Seminário Internacional de Nanotecnologia, 2011, São Paulo.
Seminário Internacional de Nanotecnologia. , 2011.

14. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide In: I Escola Brasileira de Modelagem Molecular (EBMM 2011), 2011, Santo André.
I Escola Brasileira de Modelagem Molecular (EBMM 2011),. , 2011.

15. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide In: : São Paulo School on Natural Porducts, Medicinal Chemistry and Organic Synthesis Integrated solution for tomorrow s world (ESPCA Chemistry), 2011, Campinas.
: São Paulo School on Natural Porducts, Medicinal Chemistry and Organic Synthesis Integrated solution for tomorrow s world (ESPCA Chemistry),. , 2011.

16. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide In: II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, 2011, São Paulo.
II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas. , 2011.

17. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide In: 5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2010, Ouro Preto.
5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry. , 2010.

18. SANTOS, S. S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular modelling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide. In: Molecular Modelling 2010: Advances in Biomolecular and Materials Modelling (MM2010), 2010, Melbourne.
Abstracts of Molecular Modelling 2010: Advances in Biomolecular and Materials Modelling (MM2010). Melbourne: Monash Institute of Pharmaceutical Sciences, 2010.

19. **SANTOS, S. S.**; RENNOVATO, R. A.; DIOGO, M.
Proposta de desenvolvimento de um novo fármaco análogo da indometacina com doador de óxido nítrico In: V Encontro de TCC's do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Católica de Santos, 2008, Santos.
V Encontro de TCC's do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Católica de Santos. , 2008.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. GIAROLLA, J.; **SANTOS, S. S.**; POLIDORO, A.; PEREIRA, T. A. M.; PAES, L. C.; CADORE, A. L.; KASSAB, G.; GOMES, R.; VARGAS, F.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Dendrimer prodrugs as potential agents against neglected diseases In: 8th International Dendrimer Symposium, 2013, Madri.
8th International Dendrimer Symposium. , 2013.

Artigos em jornal de notícias

1. SANTOS, S. S.; DIOGO, M.
O uso indiscriminado de medicamentos para emagrecer. Real notícias. Itanhaém, p.9 - 9, 2006.

Apresentação de trabalho e palestra

1. SANTOS, S. S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I.
Molecular modeling applied to the first generation of quercetin targeted dendrimer as drug delivery system, 2011. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

2. SANTOS, S. S.; RENNOVATO, R. A.; DIOGO, M.
Proposta de desenvolvimento de um novo fármaco análogo da indometacina com doador de óxido nítrico, 2008. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Trabalhos técnicos

1. DIOGO, M.; SANTOS, S. S.; RENNOVATO, R. A.
Proposta de desenvolvimento de um novo farmáco análogo da indometacina com doador de NO, 2008

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Esther Letícia Amorim Ribeiro. **Síntese de pró-fármacos dendriméricos de primeira geração de 3-hidroxiflavona potencialmente leishmanicidas.** 2016. Iniciação científica (Farmácia) - Universidade de São Paulo
2. Jorge Luis Alves. **Synthesis of first generation Bis-MPA dendrimer containing diaminopropane as the core.** 2015. Iniciação científica (Química) - Tulane University
3. Heloisa Fernanda Aug. **Leishmanicidas potenciais: síntese e ensaios de estabilidade química de fármaco dirigido dendrimérico de 3-hidroxiflavona para liberação específica em macrófagos.** 2013. Iniciação científica (Farmácia) - Universidade de São Paulo
4. Renan Augusto Gomes. **. Leishmanicidas potenciais: síntese de fármaco dirigido dendrimérico de 3-hidroxiflavona para liberação específica em macrófagos..** 2012. Iniciação científica (Farmácia) - Universidade de São Paulo

Orientações e supervisões em andamento

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Stefani Fernanda Figueiredo. **Síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos para tuberculose contendo isoniazida.** 2016. Curso (Farmácia) - Universidade Paulista

Iniciação científica

1. Renan Sousa Silva. **Síntese de pró-fármacos dendriméricos de primeira geração de 3-hidroxiflavona potencialmente leishmanicidas.** 2016. Iniciação científica (Farmácia) - Universidade de São Paulo

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IV Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases**, 2015. (Simpósio)
Conformational profile evaluation of 3-hydroxyflavone dendrimeric prodrugs potentially antichagasic and leishmanicide.
2. **XIII National Meeting of Medicinal Chemistry Professors**, 2015. (Encontro)
.
3. **37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2014. (Congresso)
.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XX Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal e II Escuela Internacional de Química Medicinal y Farmacología**, 2014. (Congresso)
Estudo de dinâmica molecular para avaliação conformacional de pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxiflavona, potencialmente antichagásicos e leishmanicidas..
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry**, 2014. (Simpósio)
Conformational profile evaluation of 3-hydroxyflavone dendrimeric prodrugs potentially antichagasic and leishmanicide.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases**, 2013. (Simpósio)
Molecular properties evaluation of a second generation dendrimers potentially antichagasic and leishmanicide.
7. **Simpósio de Nanotecnologia**, 2013. (Simpósio)
.
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XLVIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2013. (Congresso)
Molecular properties evaluation of a second generation dendrimers potentially antichagasic and leishmanicide..
9. **I Simpósio de Dendrímeros: Importância no Contexto da Nanotecnologia**, 2012. (Simpósio)
.
10. **XLVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2012. (Simpósio)
.
11. **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2011. (Congresso)
.
12. **I Escola Brasileira de Modelagem Molecular**, 2011. (Oficina)
.
13. **II International Symposium on Drug Discovery**, 2011. (Simpósio)
.
14. **II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas**, 2011. (Simpósio)
.
15. **International Seminar of Nanotechnology**, 2011. (Seminário)
.
16. **Sao Paulo Advanced School on Chemistry**, 2011. (Congresso)
.
17. **XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2011. (Congresso)
.
18. **XVI Congresso Paulista de Farmacêuticos, VII Seminário Internacional de Farmacêuticos**, 2010. (Congresso)

.

19. **5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry**, 2010. (Simpósio)
.

20. **V Escola de Modelagem Computacional em Sistemas Biológicos**, 2010. (Oficina)
.

21. **XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2010. (Congresso)
.

22. **Congresso Interdisciplinar de Assistência Domiciliar**, 2009. (Congresso)
.

23. **Programa de Atualização Farmacêutica "Uso de dispositivo Inalatório para tratamento de doenças respiratórias"**, 2009. (Outra)
.

24. **Programa de Atualização Farmacêutica da Divisão de Farmácia do HC-FMUSP "Eficácia, segurança e mecanismo de ação de Tocilizumab no tratamento de Artrite Reumatóide"**, 2009. (Outra)
.

25. **Programa de Atualização Farmacêutica ¨Atualização em Insulinas"**, 2009. (Outra)
.

26. Apresentação de Poster / Painel no(a) **V Encontro de TCC do Centro de Ciências da Saúde da Unisantos**, 2008. (Encontro)
Proposta de desenvolvimento de um novo fármaco análogo da indometacina com doador de óxido nítrico.

27. **Jornada farmacêutica da Saúde Unisantos**, 2007. (Outra)
.

28. **XV Congresso Paulista de Farmacêuticos**, 2007. (Congresso)
.

29. **4º Ciclo Racine para universitários**, 2005. (Simpósio)
.

30. **Semana Farmacêutica Unisantos**, 2004. (Outra)
.

Organização de evento

1. Ferraz, H.G.; **SANTOS, S. S.**
Escola de Inverno em Fármacos e Medicamentos (EPIFAR), 2016. (Congresso, Organização de evento)

2. **SANTOS, S. S.**; GIAROLLA, J.; FERREIRA, E.I.; PRIMI, M. C.
IV Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases, 2015. (Congresso, Organização de evento)

3. **SANTOS, S. S.**; PRIMI, M. C.; GIAROLLA, J.; FERREIRA, E.I.
XIII National Meeting of Medicinal Chemistry Professors, 2015. (Congresso, Organização de evento)

4. FERREIRA, E.I.; RANGEL-YAGUI, C. O.; **SANTOS, S. S.**
III Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases, 2013. (Congresso, Organização de evento)

5. FERREIRA, E.I.; GIAROLLA, J.; POLIDORO, A.; **SANTOS, S. S.**
Simpósio de Dendrímeros: Importância no contexto da Nanotecnologia, 2012. (Congresso, Organização de evento)

6. FERREIRA, E.I.; TROSSINI, G.; ANDRICOPULO, A. D.; VAZ, B. A.; SANTOS, S. S.; BRITO, C. L.; SILVA, F.; LEMES, J. P.; GIAROLLA, J.; PACHIONI, J.; ARRIBAS, M. A.; PRIMI, M. C.; SA, M. M.; SEGRETTI, N.; SERAFIM, R. A. M.; OTELO, V. A.
II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, 2011. (Congresso, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. **SANTOS, S. S.**; Cunha, T.K.; SOUZA, A. J. C.
Participação em banca de Gabriel L. C. Greco e Levi M. R. dos Santos. **Quimioterapia da tuberculose: aplicação de dendrímeros na busca de novos tuberculostáticos**, 2016
(farmácia) Universidade Católica de Santos

2. CRAVEIRO, M.V.; BIANCO, G.G.; **SANTOS, S. S.**
Participação em banca de Aline de Paula Fonseca. **Estudos visando à síntese total da(+)-xilarenona e estudo de modelagem molecular**, 2014
(Farmácia e Bioquímica) Universidade Federal de São Paulo

3. SANTOS, S. S.; GIAROLLA, J.; RANDO, D. G.
Participação em banca de Vinícius de Matos. **Avaliação in silico de aspectos toxicológicos de fármacos e outros compostos bioativos**, 2013
(Farmácia e Bioquímica) Universidade Federal de São Paulo

4. SANTOS, S. S.; GIAROLLA, J.; RANDO, D. G.
Participação em banca de Fernanda Rosa Andre. **S-nitrosilação da Src Quinase: estudos teóricos do papel das cisteínas C-terminais no processo regulatório da atividade enzimática**, 2013
(Farmácia e Bioquímica) Universidade Federal de São Paulo

5. SANTOS, S. S.; POLLI, M. C.
Participação em banca de Mariana Bertini Teixeira. **Avaliação do custo benefício do tratamento com pró-fármacos clássicos e recíprocos e seus precursores disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro**, 2011
(Ciências Farmacêuticas) Pontifícia Universidade Católica de Campinas

6. SANTOS, S. S.; POLLI, M. C.
Participação em banca de Bruna Taliani Tuan; Natália Grasiela Mendes. **Fármacos aprovados pelo FDA no período de 2006 a junho de 2011**, 2011
(Ciências Farmacêuticas) Pontifícia Universidade Católica de Campinas

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 29/08/2016 às 08:45:23.